

## GASTROENTERITIS HUMANAS ASSOCIADAS A *Vibrio parahaemolyticus* NO RECIFE, BRASIL(1)

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

### RESUMO

Realizou-se estudo sobre a ocorrência do *Vibrio parahaemolyticus* em 1.100 fezes diarréicas, enviadas rotineiramente a laboratório clínico privado do Recife, para diagnóstico microbiológico. Isolou-se o *V. parahaemolyticus* de 14 (1,3%) amostras fecais. Entretanto, se nós consideramos apenas os espécimes dos pacientes adultos, a taxa de isolamento do *V. parahaemolyticus* elevou-se para 7,1%. Na maioria dos casos (92,86%), o *V. parahaemolyticus* foi o único enteropatógeno reconhecido. Demonstraram-se sete antígenos K entre as cepas isoladas e três não puderam ser sorotipadas. Apenas duas linhagens, ambas ureolíticas, não produziram a toxina direta termoestável. Nós concluímos que o *V. parahaemolyticus* é importante causa de diarréia do adulto no Recife, em consumidores de frutos do mar.

**UNITERMOS:** Gastroenterites; *Vibrio parahaemolyticus*; Toxinfecção alimentar.

### INTRODUÇÃO

O *Vibrio parahaemolyticus* é um microrganismo halofílico, habitante natural do ambiente marinho, isolado pela primeira vez em 1950, durante extenso surto de gastroenterite em Osaka<sup>13</sup>. Atualmente, ele é responsabilizado por 40 a 70% de todos os casos de toxinfecção alimentar ocorrentes no Japão<sup>11, 19</sup>, é importante causa da diarréia dos viajantes<sup>2</sup>, e tem distribuição cosmopolita<sup>21</sup>.

Apesar de vários estudos comprovando sua existência no ambiente e animais marinhos do Brasil<sup>5, 12, 15, 16, 17, 25, 26</sup> a publicação de apenas dois casos incidentais de infecção humana<sup>12, 18</sup>

evidencia que as gastroenterites a *V. parahaemolyticus* não suscitaram qualquer interesse aos infectologistas brasileiros. Fato injustificado, se levarmos em conta que o país oferece condições propícias àquelas infecções, tais como: grande número de cidades litorâneas, temperatura da água, especialmente no Nordeste, sempre acima de 20°C, elevado consumo de mariscos e peixes pela população e precárias condições de controle sanitário.

Essa carência de informação sobre as gastroenterites a *víbrio*, em nosso meio, justificou a realização do presente trabalho.

(1) Trabalho financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proj. 416241/89) e Japan International Cooperation Agency (JICA).

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

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

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

Endereço para correspondência: Vera Magalhães. Rua Aquidaban, 70, apto. 1102. Boa Viagem. 51021 Recife, Pernambuco, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Espécimes fecais

Selecionaram-se para o estudo 1100 espécimes fecais diarréicos, recebidos rotineiramente em laboratório privado de patologia clínica, para esclarecer eventual etiologia infecciosa. O estudo foi realizado no período compreendido entre abril de 1989 e março de 1990 e o uso de drogas antimicrobianas, pelo paciente, não invalidou a inclusão de suas fezes no estudo. Os pacientes que forneceram coprocultura positiva para *V. parahaemolyticus* foram inquiridos quanto à alimentação nos dias que antecederam o episódio diarréico e seus médicos assistentes contactados para a obtenção de informações quanto à sintomatologia clínica.

### Pesquisa de leucócitos fecais

Pequena gota de fezes líquidas, ou de homogeneizado de fezes pastosas ou mucosangüinolentas foi misturada com uma gota da solução de azul de metileno a 0,1% e examinada ao microscópio, entre lâmina e lamínula.

### Isolamento e caracterização dos víbrios

Aproximadamente 0,5 g de fezes foi inoculado em tubos de ensaio contendo 10 ml de água peptonada alcalina (pH 8,5), a que se adicionaram 2% de cloreto de sódio. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente, durante 8 a 12 h, e o material enriquecido inoculado em placas de ágar tiossulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS; Difco Laboratories, Michigan). Após 18 a 24 h de incubação a 35°C, as placas apresentando colônias verdes (indicativo de não fermentação da sacarose) foram separadas e as colônias suspeitas isoladas e transferidas para tubos de ensaio contendo os meios tríplice açúcar ferro (TSI; Nissui, Tóquio) e lisina-indolmotilidade (LIM; Nissui), adicionados de 1% de cloreto de sódio. As culturas que fermentaram a glicose, descarboxilaram a lisina, produziram oxidase e que não atacaram a lactose ou sacarose foram presuntivamente classificadas como *V. parahaemolyticus* e submetidas aos testes bioquímicos<sup>10</sup> para identificação definitiva. Outras bactérias, potencialmente enteropatogênicas, assim como rotavírus e enteroparasitas foram também pesquisados usando-se métodos convencionais<sup>8, 9, 10, 23, 28</sup>.

No estudo sorológico seguiram-se recomendações técnicas previamente publicadas<sup>11</sup>. Na análise antigênica empregaram-se antisoros polivalentes e monovalentes (01 a 011 e K1 a K71) comerciais (Denka Seiken, Co. Tóquio).

A capacidade de produzir hemolisina direta termoestável (HDT) foi pesquisada em ágar de Wagatsuma (Teste Kanagawa)<sup>10, 27</sup>.

### Antibiograma

Os isolados de *V. parahaemolyticus* foram submetidos ao teste de susceptibilidade a 10 drogas antimicrobianas pelo método de BAUER et al<sup>6</sup>. As drogas e respectivas concentrações em ug/disco foram as seguintes: ampicilina (10), cefalotina (30), estreptomomicina (10), neomicina (30), gentamicina (10), tetraciclina (30), cloranfenicol (30), cotrimoxazol (25), nitrofurantoína (300) e lomefloxacina, uma nova fluorquinolona, (10). Os antibiogramas foram realizados em meio de Müller-Hinton (Difco), meio que não contém cloreto de sódio.

## RESULTADOS

Dos 1.100 espécimes fecais diarréicos, submetidos à coprocultura, 198 foram provenientes de indivíduos maiores de 18 anos. Dentre esses, 61 foram líquidos, 96 pastosos e 41 mucosangüinolentos. Do total das fezes examinadas, 14 (1,3%) forneceram *V. parahaemolyticus*. O microrganismo, entretanto, somente foi isolado dos espécimes aquosos dos pacientes adultos (22,9%). Não se observou qualquer correlação entre a ocorrência do microrganismo e sazonalidade. O *V. parahaemolyticus* sempre foi isolado sozinho, exceto numa ocasião em que ele esteve associado a *Salmonella* spp. Em nenhum dos espécimes positivos para *V. parahaemolyticus* observaram-se leucócitos, inclusive no que forneceu *Salmonella*.

Os sintomas clínicos, mais freqüentemente observados nos portadores de diarreia a *V. parahaemolyticus*, foram cólica abdominal (78,6%); náusea (64,2%); vômito (42,8%); febre (35,7%); calafrio (28,6%) e cefaléia (42,8%). Todos os pacientes, inquiridos a respeito da fonte de infecção, informaram o consumo de mariscos ou peixe entre seis e 36 h antes do início da sintomatologia. Os alimentos marinhos mais freqüentemente

responsabilizados foram ostra, cinco casos, camarão, quatro casos, peixe, três casos e polvo, dois casos.

Todas as cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas, independentemente da proveniência, mostraram uniformidade de comportamento frente aos testes bioquímicos utilizados, exceto no que concerne à produção de urease (Tabela 1).

As cepas urease positivas distribuíram-se em quatro diferentes sorovars e demonstraram fraca ou nenhuma atividade hemolítica (Tabela 2).

Salvo duas cepas urease positivas, todas as outras foram reativas no ágar de Wagatsuma.

Excetuando-se a ampicilina, observou-se uniforme susceptibilidade em relação às demais drogas testadas.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que a ocorrência do *V. parahaemolyticus*, nos espécimes fecais,

TABELA 1  
Características bioquímicas das linhagens de *V. parahaemolyticus* isoladas dos casos clínicos.

Teste	% de linhagens positivas	
	Previsto*	Isolados (n = 14)
Oxidase	100	100
Arabinose	80	85,7
Esculina	1	0
Glicose	100	100
Inositol	0	0
Lactose	1	0
Manitol	100	100
Sacarose	1	0
Salicina	1	0
Arginina	0	0
Lisina	100	100
Ornitina	95	100
Indol	98	100
Beta galactosidase	5	0
Urease	15	28,6
Voges-Proskauer	0	0
Cresc. em caldo contendo C1Na:		
0%	0	0
8%	80	92,9

\* Porcentagem de reações positivas para *V. parahaemolyticus* usando-se os métodos de FARMER et al<sup>10</sup>.

TABELA 2  
Associação entre sorovar, produção de urease e de hemólise em cepas humanas de *V. parahaemolyticus*.

Sorovar	Nº cepas	Urease	Hemólise
01: K56	1	+	±
03: K5	1	-	+
03: K58	4	-	+
03: KNT	1	+	-
04: K4	2	-	+
04: K10	1	-	+
04: K12	1	-	+
04: K53	1	+	-
05: KNT	1	-	+
010: KNT	1	+	±

NT = não tipável; + = positivo; - = negativo; ± = positivo fraco.

submetidos rotineiramente para diagnóstico microbiológico, nos laboratórios clínicos, é baixa (1,3%). Entretanto, se é levado em consideração que a grande maioria desses espécimes foram provenientes de crianças e avaliarmos apenas os espécimes de indivíduos acima de 18 anos, verificamos que o *V. parahaemolyticus* é importante causa de diarreia aguda do adulto, responsabilizando-se por 7,1% dos casos. Realmente, no Recife, o *V. parahaemolyticus*, diferentemente de outras espécies de *Vibrio*, não parece ser uma causa de diarreia infantil. Em estudo sobre a etiologia da gastroenterite, em crianças menores de um ano, que se está realizando no Laboratório Keizo Asami da UFPE, não se conseguiu isolar nenhuma amostra de *V. parahaemolyticus* dentre 250 espécimes fecais já analisados, embora outras espécies de *Vibrio* o tenham sido (M. MAGALHÃES et al, observações não publicadas).

Contrariando esse achado, em oito surtos de gastroenterite a *V. parahaemolyticus*, investigados nos Estados Unidos, não se notou predileção por idade<sup>4</sup>. Talvez, a ocorrência exclusiva do *V. parahaemolyticus*, em adultos, seja uma característica da doença diarreica esporádica e indique uma fonte de infecção extradomiciliar. Todos os nossos pacientes parecem ter adquirido a infecção fora de suas residências.

Mesmo que se considerem os índices de isolamento dos espécimes fecais, apenas dos pacientes adultos, eles podem estar aquém da realidade. As infecções intestinais a *V. parahaemolyticus* são geralmente autolimitadas<sup>4</sup>, daí ser possível que somente os casos mais graves e de

maior duração tenham procurado cuidados médicos. Além disso, excetuando-se a ampicilina, as linhagens de *V. parahaemolyticus* mostraram-se susceptíveis às drogas antimicrobianas usadas corriqueiramente no tratamento das gastroenterites. Desse modo, a automedicação poderia ter influído no controle da sintomatologia evitando a coprocultura.

No único caso em que o *V. parahaemolyticus* foi encontrado, em associação com outro enteropatógeno, a ausência de leucócitos fecais no espécime, e a observação sobre a elevada frequência de *Salmonella* em controles de casos de diarreia infantil, em nosso meio (M. MAGALHÃES et al, observações não publicadas), sugerem que o *V. parahaemolyticus* foi o agente etiológico desse caso de diarreia. Ademais, o estado de portador de *V. parahaemolyticus* parece inexistir<sup>3</sup>.

A sintomatologia apresentada pelos pacientes foi bastante uniforme e não se diferenciou do quadro clínico clássico relatado por outros autores<sup>4, 7, 20, 24</sup>. Isso independeu de se a cepa causal foi ou não Kanagawa positiva.

A única discrepância, no que concerne às características bioquímicas previstas<sup>10, 14</sup>, foi a produção de urease por quatro linhagens.

Na Costa Oeste dos Estados Unidos e México, as cepas de *V. parahaemolyticus*, mais frequentemente isoladas, na atualidade, pertencem ao biosorovar 04:K12 urease positivo. Essas cepas, entretanto, são Kanagawa positivas<sup>1</sup>. O sorovar 04:K12 foi também detectado no Recife; a linhagem brasileira, todavia, foi urease negativa.

Em contraste com aquela observação<sup>1</sup>, as cepas urease positivas de *V. parahaemolyticus*, isoladas no Recife, distribuíram-se em diferentes sorovars e duas não puderam ser sorotipadas, apesar de termos empregado 65 antisoros K. Isso indica que não houve aqui a disseminação de um único clone. Curiosamente, essas cepas não produziram hemólise ou foram fracamente hemolíticas. Essa aparente incompatibilidade entre a produção da urease e da hemolisina está sob investigação.

O encontro dessas duas cepas Kanagawa negativas, e de duas outras exibindo baixa produ-

ção de HDT, confirma observações anteriores<sup>22</sup> de que o fenômeno Kanagawa não é indicador absoluto da patogenicidade do *V. parahaemolyticus*. Na verdade, o mecanismo de produção de doença pelo *V. parahaemolyticus* permanece ainda uma incógnita. Recentemente, demonstrou-se em cepa Kanagawa negativa, oriunda da epidemia ocorrida na República Maldivas, a produção de uma outra hemolisina, relacionada antigenicamente com a HDT, porém diferente<sup>19</sup>.

Em conclusão: nossos achados indicam que o *V. parahaemolyticus* é importante causa de diarreia aquosa do adulto, no Recife e, provavelmente, em outras cidades brasileiras, sugerindo a necessidade da introdução de métodos adequados, ao seu isolamento, nos laboratórios de bacteriologia do país.

#### SUMMARY

*Vibrio parahaemolyticus* associated with human gastroenteritis in Recife, Brazil.

A study was carried out on the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in 1.100 diarrheal feces, routinely sent to a private clinical laboratory for microbiologic diagnosis, in Recife. *V. parahaemolyticus* was isolated from 14 (1.3%) fecal samples. However, if we considered only the specimens from adult patients, the isolation rate of *V. parahaemolyticus* rose to 7.1%. In most cases (92.86%), *V. parahaemolyticus* was the only enteropathogen recognized. Among the isolates, seven K antigen serovars were demonstrated, and three were untypable. Only two human isolates, both ureolytic, did not produce the thermostable direct hemolysin. We concluded that *V. parahaemolyticus* is an important cause of sea food linked diarrhea among adults in Recife.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, S. L.; POWERS, C.; KAYSNER, C. A.; TAKE-DA, Y.; ISHIBASHI, M.; JOSEPH, S. W. & JANDA, M. — Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J. clin. Microbiol.*, 27: 2891-2893, 1989.
2. ABE, H.; ICHIKI, S.; HASHIMOTO, S.; NAKANO, N.; SA-TO, K.; KANDA, T.; YANAI, Y.; TSUKAMOTO, T.; KINO-SHITA, Y.; ARITA, M.; HONDA, T.; TAKEDA, Y. & MI-WATANI, T. — Isolation and characterization of enteroto-

- xigenic *Escherichia coli* from patients with traveler's diarrhoea in Osaka. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, 2: 83-87, 1984.
3. BARKER, W. H.; WEAVER, R. E.; MORRIS, G. K. & MARTIN, W. T. — Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* infections in humans. In: SCHLESSINGER, D. ed. *Microbiology-1974*, Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1975. p. 257-262.
  4. BARKER Jr., W. H. — *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. *Lancet*, 1: 551-554, 1974.
  5. BARROS, G. C. & VIANNI, M. C. E. — *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em águas da baía de Guanabara. *Rev. lat.-amer. Microbiol.*, 22: 163-169, 1980.
  6. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. clin. Path.*, 45: 493-496, 1966.
  7. BLAKE, P. A.; WEAVER, R. E. & HOLLIS, D. G. — Diseases of humans other than cholera caused by vibrios. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34: 341-367, 1980.
  8. BRANDT, C. D.; ARNDT, C. W.; EVANS, G. L.; KIM, W. H.; STALLINGS, E. P.; RODRIGUES, W. J. & PARROTT, R. H. — Evaluation of a latex test for rotavirus detection. *J. clin. Microbiol.*, 25: 1800-1802, 1987.
  9. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — *Identification of enterobacteriaceae*. 3. ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
  10. FARMER, J. J. III; 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, D.C., American Society for Microbiology, 1985. p. 282-301.
  11. FISHBEIN, M. & WENTZ, B. — Enumeration, laboratory identification, and serotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus*. In: SCHLESSINGER, D., ed. *Microbiology*, 1974. Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1985. p. 246-256.
  12. FRANCA, S. M. C.; GIBBS, D. L.; SAMUELS, P. & JOHNSON, D. — *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. *J. Amer. med. Ass.*, 244: 587-588, 1980.
  13. 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.
  14. 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.
  15. GELLI, D. S.; TACHIBANA, T. & SAKUMA, H. — Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em ostras. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39: 61-66, 1979.
  16. GELLI, D. S.; TACHIBANA, T. & SILVA, T. M. P. — Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras e outros produtos marinhos no Litoral de São Paulo, Brasil. Revisão e consideração sobre o risco potencial para a Saúde Pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35-36: 9-15, 1975/76.
  17. HOFER, E. & SILVA, C. H. D. — Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no Litoral Brasileiro. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 17: 327-331, 1986.
  18. HOFER, E. — Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 14: 174-175, 1983.
  19. HONDA, T.; NI, Y. & MIWATANI, T. — Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.*, 56: 961-965, 1988.
  20. HUGHES, J. M.; BOYCE, J. M.; ALEEM, A. R. M. A.; WELLS, J. G.; RAHMAN, A. S. M. M. & CURLIN, J. T. — *Vibrio parahaemolyticus* enterocolitis in Bangladesh: report of an outbreak. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 27: 106-112, 1978.
  21. JOSEPH, S. W.; COLWELL, R. R. & KAPER, J. B. — *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 10: 77-124, 1983.
  22. KELLY, M. T. & STROH, E. M. D. — Urease-positive, Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *J. clin. Microbiol.*, 27: 2820-2822, 1989.
  23. MORIS, G. K. & PATTON, C. M. — *Campylobacter*. In: LENNETTE, E. H.; HAUSLER Jr., W. J. & SHADOMY, H. J., ed. *Manual of clinical microbiology*. 4. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1985. p. 302-308.
  24. MORRIS Jr., J. G. & BLACK, R. — Cholera and other vibrioses in the United States. *New Engl. J. Med.*, 312: 343-350, 1985.
  25. RODRIGUES, D. P. — *Deteção de bactérias patogênicas no ecossistema água-ostra da baía de Sepetiba, Rio de Janeiro - RJ*. Rio de Janeiro, 1983. (Dissertação de mestrado — Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense).
  26. RODRIGUES, D. P. & HOFER, E. — *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba bay in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 17: 332-338, 1986.
  27. SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAI, S. & HOB0, K. — Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 21: 325-331, 1968.
  28. SMITH, J. W. & BARTLETT, M. S. — Diagnostic parasitology: introduction and methods. In: LENNETTE, E. H.; HAUSLER Jr., W. J. & SHADOMY, H. J., ed. *Manual of clinical microbiology*. 4. ed. Washington, D. C., American Society for Microbiology, 1985. p. 595-611.

Recebido para publicação em 06/7/1990.

Aceito para publicação em 28/11/1990.