

Vibrio cholerae O₁ em amostras de ambientes aquáticos e de alimentos analisados no Estado de Pernambuco, Brasil

Isolation of *Vibrio cholerae* O₁ from aquatic environments and foods in Pernambuco State, Brazil

Waldêny Colaço ¹
Sandoval Vieira da Silva Filho ¹
Dália dos Prazeres Rodrigues ²
Ernesto Hofer ³

¹ Departamento de Bromatologia e Química, Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral, Lacen/PE.
Rua Fernandes Vieira s/nº, Boa Vista, Recife, PE 50050-210, Brasil.
² Laboratório de Enterobactérias, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brasil.
³ Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brasil.

Abstract Incidence of *Vibrio cholerae* O₁ was studied in 2,585 samples from different aquatic environments and 91 from foods in Pernambuco State, northeastern Brazil, from 1992 to 1994. A total of 193 (7.21%) samples of *V. cholerae* were isolated with a higher prevalence of the Inaba serovar (183-94.8%) than the Ogawa serotype (10-5.1%). All isolates were classified as biotype El Tor, and resistance patterns to antibiotics showed that all strains were susceptible tetracycline. Some 70 random samples of *Vibrio cholerae* proved toxigenic, including all the Ogawa serovars. Incidence of *V. cholerae* O₁ in river water and sewage (86.0%) pointed to fecal contamination as the most common source and vehicle for rapid spread of the microorganism in the aquatic environment. The vibrio was isolated in 2.1% of all food examined, which was less than expected.
Key words Cholera; *Vibrio cholerae*; Food Contamination; Biological Contamination; Environmental Pollution

Resumo No período de 1992 a 1994, foram analisadas 2.585 amostras de águas de diferentes ecossistemas, acrescidas de 91 espécimens de alimentos visando ao monitoramento de *Vibrio cholerae* O₁ no Estado de Pernambuco. Nas 2.676 amostras foram detectadas 193 cepas de *Vibrio cholerae* O₁ (7,21%) com predominância do sorovar Inaba (183-94,8%) sobre Ogawa (10-5,1%), todas classificadas no biotipo El Tor e sensíveis à tetraciclina. Numa parcela de setenta amostras selecionadas ao acaso, mas incluindo todas do sorovar Ogawa, foi evidenciada a produção de toxina colérica. A maior incidência do vibrião colérico em águas de rios, canais e de esgoto, representando 86% dos isolados, indicou a contaminação fecal por excretadores como a causa preponderante na disseminação da bactéria nos sistemas aquáticos. Assinala-se a discreta ocorrência de *V. cholerae* O₁ nos alimentos processados (2,1%).

Palavras-chave Cólera; *Vibrio cholerae*; Contaminação de Alimentos; Contaminação Biológica; Poluição Ambiental

Introdução

A emergência da cólera no hemisfério ocidental, desde o seu aparecimento no Peru em 1991, evidenciou uma rápida propagação para os países vizinhos, incluindo o Brasil (Tauxe & Blake, 1992; Blake, 1993; Hofer, 1993; Mujica et al., 1994). Em nosso meio, a introdução do vibrião colérico se deu através da região amazônica (Hofer, 1993), e, em um espaço de tempo inferior a um ano, já se implantava no Nordeste (MS, 1993; SSEPE, 1993).

Como um dos pontos básicos instituídos para o rastreamento de *Vibrio cholerae* O₁ em uma área, recorre-se ao monitoramento bacteriológico de ecossistemas aquáticos, particularmente na fase que antecede a eclosão de surtos ou de sua proliferação na população (Feachem, 1982; WHO, 1992). Por outro lado, quando da implantação do vibrião colérico em uma comunidade, as pesquisas ambientais são dirigidas no sentido de investigar a sobrevivência e um possível nicho da bactéria na tentativa de explicar a endemicidade, ou não, da doença na região (WHO, 1992; MS, 1993).

Tomando por base estas premissas, relata-se na presente investigação a frequência e distribuição de *V. cholerae* O₁ em diferentes sistemas aquáticos e certos alimentos, analisados no Estado de Pernambuco, no período de 1992 a 1994.

Material e métodos

Um total de 2.676 espécimens, sendo 2.585 de águas de diferentes categorias e origens, foram analisadas no período compreendido entre janeiro de 1992 a dezembro de 1994 pelo Departamento de Bromatologia e Química do Laboratório Central de Saúde Pública "Dr. Milton Bezerra Sobral", Recife, Pernambuco. Nessa fase também foram processadas 91 amostras de alimentos, representadas por alimentos prontos, hortaliças e pescado.

As águas classificadas como doce foram caracterizadas como: 1) brutas (de mananciais e subterrâneas) e 2) tratadas, sendo as primeiras oriundas de rios, lagoas, açudes, poços freáticos, cacimbas, barragens, barreiros, fontes, reservatórios domiciliares, chafarizes, carros-pipa e da estação de tratamento antes da cloração. No caso da tratada, enquadrou-se a água de abastecimento público, sob a responsabilidade do Estado, incluindo-se ainda a água de piscina. Como água do mar ou costeiras, foram consideradas as de praias, de marés e de estuários e aquelas rotuladas como cloacais, além de

esgoto, incorporou-se a água de canais, tendo em vista a recepção de uma carga considerável de matéria orgânica, lançada na maioria das vezes *in natura* pela população ribeirinha.

As colheitas dos espécimens foram realizadas de modo aleatório, quase sempre indicadas pelas Vigilâncias Epidemiológica e Sanitária, não obedecendo a um critério de periodicidade que pudesse abranger toda uma sazonalidade ou que estivesse relacionado a uma pesquisa de caso-controle. Acrescenta-se ainda que as amostras colhidas eram provenientes das diferentes sedes regionais (Dires) em que o Estado de Pernambuco está dividido (Figura 1). Procurou-se, também, estabelecer no mapa uma correspondência das áreas das sedes com aquelas fisiográficas.

O processo de coleta utilizado para veículos aquosos consistiu na técnica de Moore, mantendo a mecha por três a quatro dias mergulhada nas águas, a qual, após recolhimento, foi colocada em recipientes estéreis de boca larga contendo 500ml de água peptonada alcalina, pH 8,5 (Hofer, 1974; APHA, 1989; MS, 1992). Neste conteúdo, a mecha era remetida para o Laboratório Central.

Os alimentos foram coletados em quantidades de 25g a 50g, transportados para o laboratório sob refrigeração (4º-8º), sendo processados bacteriologicamente seguindo as orientações ou normas técnicas clássicas (APHA, 1992). Em relação às hortaliças, procedeu-se previamente à enxaguadura dos vegetais em água peptonada alcalina (APA) pH 8,5 (MS, 1993).

Quanto à análise bacteriológica, com características qualitativas, adotaram-se, em linhas gerais, as orientações de Hofer (1974), do MS (1992) e de Elliot et al. (1992), recorrendo-se sempre a dois enriquecimentos sucessivos em APA, pH 8,5 e passagem para o meio seletivo-indicador, Agar TCBS. Normalmente, três colônias suspeitas de *Vibrio cholerae*, crescidas no meio seletivo (amarelas, sacarose positivas), eram selecionadas e transferidas para o meio de triagem IAL (Pessoa & Silva, 1974). Naqueles tubos apresentando um perfil compatível para o gênero *Vibrio*, verificava-se a presença de oxidase e, quando positiva, efetuava-se a sorroaglutinação em lâmina, frente aos antissoros polivalente (O₁) e monovalentes, Inaba e Ogawa, tomando-se sempre a precaução de excluir as culturas auto-aglutináveis em salina a 2g%.

A confirmação definitiva das amostras foi realizada pelo Laboratório de Referência Nacional de Cólera, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, complementadas com a biotipificação (Hofer, 1974) e teste de sensibili-

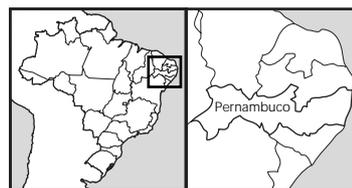
Figura 1

Divisão do estado de Pernambuco em Sedes Regionais (Dires I a X).



Localização da Dires nas áreas fisiográficas

- | | |
|-------------------------------------|--|
| I) Litoral | VI) Sertão do Moxoto |
| II) Mata seca. Agreste setentrional | VII/VIII) Sertão pernambucano do São Francisco |
| III) Mata úmida | IX) Sertão pernambucano. Araripina |
| IV) Vale do Ipojuca | X) Alto do Pajeú |
| V) Agreste meridional | |



dade aos antimicrobianos com discos impregnados, de acordo com as recomendações do NCCLS (1991). Os discos de antimicrobianos da marca Cecon tinham as seguintes concentrações: Ampilicina, 10mcg; Cloranfenicol, 30mcg; Eritromicina, 15mcg; Sulfametoxazol-trimetoprim, 23,75mcg + 1,25mcg e Tetraciclina, 30mcg.

A prospecção da toxina colérica (CT) foi efetuada numa parcela da amostragem (setenta cepas - 36,2%, incluindo todas as dez do sorovar Ogawa), por meio do processo de aglutinação passiva reversa em latex (Vet-RPLA, Oxoid, England), obedecendo às orientações prescritas pelo fabricante nas várias etapas.

Resultados

Segundo os dados apresentados na Tabela 1, verifica-se que os 2.676 espécimens analisados no período de 1992 a 1994 resultaram no isolamento de 193 amostras (7,21%) de *Vibrio cholerae* O₁. Na complementação bacteriológica, observou-se a predominância do sorovar Inaba (183 - 94,8%) sobre Ogawa (10 - 5,1%), assim como a caracterização absoluta do biotipo El

Tor e da total sensibilidade à tetraciclina. Dentre as setenta amostras selecionadas, todas revelaram a produção da toxina colérica.

Por outro lado, na análise das 2.585 amostras de águas de diferentes origens (Tabela 1), ficou evidente que o isolamento do vibrião colérico estava relacionado com o maior nível de contaminação fecal que certos sistemas ou mananciais sofriam, como nos casos dos rios, canais e do próprio esgoto, que praticamente revelaram 86% dos vibrios isolados.

Tomando por base a investigação na água utilizada para o consumo humano, verifica-se que, nas 721 amostras qualificadas como não tratadas e provenientes de mananciais de águas de subsolo e de superfície (excetuando dos rios), foram detectadas 13 estirpes de *V. cholerae* O₁, ou 6,7% no cômputo geral dos isolamentos. Já nas 294 águas de abastecimento público, foram evidenciadas apenas duas cepas do vibrião colérico, ou 1,03% do total de isolados.

Quanto à frequência de isolamentos de *V. cholerae* O₁ de acordo com as sedes regionais (Dires), observa-se na Tabela 2 que as áreas I, II e III, englobando as regiões fisiográficas do litoral, a mata seca pernambucana-agreste setentrional e a mata úmida pernambucana, res-

Tabela 1

Frequência de isolamentos de *Vibrio cholerae* O₁ em amostras ambientais e de alimentos processadas no período de 1992 a 1994 em Pernambuco.

Origem	1992		1993		1994		Total	
	Analizadas	Positivas	Analizadas	Positivas	Analizadas	Positivas	Analizadas	Positivas
Águas brutas e tratadas								
Rio	673	70	44	7	22	2	739	79
Poço	96	0	53	0	28	0	177	0
Abastecimento público	115	0	15	0	22	0	152	0
Reservatório domiciliar	70	0	54	0	18	2	142	2
Cacimba	62	0	45	1	33	1	140	2
Açude	72	1	45	1	12	0	129	2
Barragem	43	3	33	0	13	0	89	3
Barreiro	31	1	5	0	6	0	42	1
Lagoa	25	4	5	0	1	0	31	4
Chafariz	12	0	11	0	4	0	27	0
Fonte	17	0	6	0	4	0	27	0
Outras	40	0	2	1	5	0	47	1
Subtotal	1.256	79	318	10	168	5	1.742	94
Água de mar								
Praia	238	8	49	1			287	9
Maré	22	1	1	0	2	0	25	1
Estuário	3	0					3	0
Subtotal	263	9	50	1	2	0	315	10
Águas cloacais								
Esgoto	337	55	52	8	16	7	405	70
Canal	107	16	12	1	4	0	123	17
Subtotal	444	71	64	9	20	7	528	87
Alimentos prontos								
Hortaliças	34	0	4	0			38	0
Pescado	8	0			1	0	9	0
Subtotal	60	0	30	2	1	0	91	2
Total								
n	2.023	159	462	22	191	12	2.676	193
%	75,59	82,38	17,26	11,39	7,13	6,21	99,98	99,98

Estação de tratamento de água (afluente): 34 análises com uma positiva.
Carro-pipa (8); água de bica (4) e água de piscina (1).
Arroz e macarrão, prontos.

pectivamente, contribuíram com 88,4% ou 171 amostras isoladas.

Finalmente, situa-se a discreta ocorrência do agente da cólera nos 91 alimentos, evidenciando somente dois espécimens contaminados (2,1%).

Discussão

Com a perspectiva da propagação de *Vibrio cholerae* O₁ pelo Nordeste do País e, em particular, no Estado de Pernambuco, já no final de

1991, o Laboratório Central de Saúde Pública adotou as medidas de vigilância epidemiológica recomendadas. Um dos pontos fundamentais instituídos consistiu no monitoramento regular de ecossistemas aquáticos e de certos alimentos com maior risco de contaminação.

No início de 1992, eclode a epidemia de cólera em Pernambuco, atingindo inicialmente a população do vale do Ipojuca e da zona da mata úmida, com rápida expansão para as áreas dos tabuleiros litorâneos, em particular naquelas circunvizinhas à foz do rio Capibaribe (SSE-PE, 1993). Nesta fase, segundo os dados apre-

Tabela 2

Isolamento de *Vibrio cholerae* O₁ em amostras ambientais e de alimentos distribuídos pelas sedes regionais (Dires) do Estado de Pernambuco, no período de 1992 a 1994.

Origem	Sedes regionais (Dires)/Ano																		Total				
	I			II			III			IV			VIII			IX			X			n	%
	92	93	94	92	93	94	92	93	94	92	93	94	92	93	94	92	93	94	92	93	94		
Rio	39	-	-	11	-	-	18	5	1	-	1+	1	-	1	-	-	-	-	2	-	-	79	40,93
Esgoto	43*	2	7**	8	-	-	-	-	-	-	3	-	-	2	-	3	-	-	2	1	-	70	36,26
Canal	14	1**	-	1																		16	8,29
Praia	8																					8	4,14
Lagoa	3																		1	-	-	4	2,07
Barragem	-			1															2	-	-	3	1,55
Açude	-															1	1	-				2	1,03
Cacimba			1																	1	-	2	1,03
Maré	1	1																				2	1,03
Reservatório domiciliar	-		2****																			2	1,03
Alimentos	-	2																				2	1,03
Barreiro	1	-																				1	0,51
Estação de tratamento de água	-	-						1														1	0,51
Total	109	6	10	21	-	-	18	6	1	-	4	1	-	3	-	4	1	-	7	2	-	193	

+ uma amostra de sorovar Ogawa (Caruaru)

* duas amostras do sorovar Ogawa (Recife e Itamaracá)

** cinco amostras do sorovar Ogawa (Recife)

*** uma amostra do sorovar Ogawa (Paulista)

**** uma amostra do sorovar Ogawa (Recife)

sentados pelo Cenepi/FNS/Ministério da Saúde, foi registrado um coeficiente de incidência (por cem mil habitantes) dos casos confirmados em 125,4. Já em 1993, 1994 e primeiro semestre de 1995, os coeficientes atingiram 90,5; 86,8 e 6,1, respectivamente, envolvendo 164 municípios.

Esta situação epidemiológica está até certo ponto retratada nos resultados da Tabela 1, tendo em vista que, em 1992, o monitoramento laboratorial foi muito intenso, constituindo-se em 75,5% do total de exames realizados. Isso possibilitou um discernimento dos vários veículos propagadores do vibrião colérico, considerando as 159 amostras isoladas, que representaram 82,3% total de vibrios. Um outro aspecto importante nos dados coligidos em 1992, refere-se à detecção do sorovar Ogawa em esgotos das regiões de Recife e Itamaracá (Tabela 2), como um prenúncio de uma possível circulação futura na população receptível. Destaca-se que todas as dez amostras do sorovar Ogawa identificadas no período produziram a toxina colérica, como as sessenta outras da ração epidêmica do sorotipo Inaba.

O envolvimento da água na transmissão da cólera foi reconhecido há mais de um século

no trabalho clássico de John Snow (1855). Apesar do tempo passado, continua proeminente a veiculação hídrica, tendo como causa primordial o lançamento de dejetos *in natura* em coleções d'água pelas populações urbana e periurbanas, marginalizadas. Esta assertiva é evidente na presente investigação pelo nível de detecção do vibrião colérico nos rios e canais (Tabela 1), que funcionam como verdadeiras valas a céu aberto (Tampling & Carrillo, 1991). Aliando-se a esta forma de esgotamento não sanitário, salienta-se que as águas dos rios do nordeste brasileiro, em particular de Pernambuco, tendem a neutralidade ou alcalinidade, como resultado da natureza ecológica do solo. Este elemento abiótico favorece a maior viabilidade da bactéria no meio e, por conseguinte, a disseminação por outras áreas ribeirinhas situadas à jusante, onde as populações mais carentes comumente se abastecem. Assim ocorreu nas comunidades localizadas às margens dos rios Ipojuca, Capibaribe, Pajeú, Una, entre outros.

Como uma repercussão deste problema ambiental, no levantamento apresentado pela Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (dados não publicados), observa-se que os ca-

chos humanos acumulados de 1992 até o primeiro semestre de 1994, mas enfatizando-se 1992, tiveram maior incidência nas sedes regionais IV, II e I (Dires), com 1.078, 943 e 749 ocorrências confirmadas, respectivamente. Destaca-se que em 1994 os novos acontecimentos se concentraram mais nas Dires IV e I (noventa e 33 casos, respectivamente).

A situação focalizada é idêntica àquelas abordadas em Bangladesh (Hughes et al., 1982), onde 44% das águas de superfície revelaram o vibrião colérico, bem como às descritas em Trujillo e Piura no Peru, onde a contaminação fecal da água de consumo era comum e o isolamento da raça epidêmica de *V. cholerae* O₁ não se caracterizava como um fato inusitado (Swerdlow et al., 1992).

Em contraposição, no meio rural existe uma conceituação arraigada de preservar os mananciais de água, mediante a adoção de preceitos higiênicos básicos no sentido de evitar a contaminação fecal. Por sinal, os resultados apresentados na Tabela 1 refletem esta orientação, pois, das 246 amostras de águas de poços, cacimbas e açudes analisadas, foram detectadas apenas quatro (2,07%) com *V. cholerae*, enquanto os 739 exames de águas de rios revelaram uma positividade de 40,9%, ou 79 amostras.

Com a aplicação das medidas higiênicas, como no caso da água distribuída pelo sistema de abastecimento público, dificilmente se isola o vibrião colérico, mesmo na fase epidêmica (Feachem, 1982; Blake, 1993; MS, 1993). Na presente investigação o caráter de excepcionalidade ocorreu, registrando-se em duas oportunidades a presença da bactéria em um reservatório, antes de se instituir a cloração. Do ponto de vista de engenharia sanitária, a reservação é identificada como uma etapa crítica de exposição da água aos contaminantes (MS, 1991).

De modo análogo ao problema apontado, tal situação destaca-se nas áreas urbanas mais carentes, onde raramente a rede de abastecimento alcança domicílio, obrigando desta forma a população a recorrer às torneiras ou charizes públicos para sua manutenção de reserva na habitação. Via de regra isto implica o manuseio freqüente da coleção d'água, que, mesmo previamente tratada, poderá se constituir em risco potencial de disseminação de enteropatógenos no ambiente intradomiciliar (Swerdlow, 1992; WHO, 1992; Blake, 1993; MS, 1993).

De qualquer maneira, é interessante destacar, sob os prismas epidemiológico e ecológico, que a situação retratada no ambiente urbano, como, por exemplo, na cidade do Recife, fa-

vorece a endemicidade da doença, coadunando-se com a hipótese de Swaroop et al. (1951), que enfatizaram os seguintes fatores comuns para as áreas endêmicas na Índia:

- 1) Elevada densidade demográfica, localizada às margens de rios.
- 2) Elevada umidade absoluta. Sem dúvida que outros parâmetros também estão associados ao processo, como o número excessivo de excretos fecais de *V. cholerae* O₁ na fase epidêmica, contaminando ecossistemas aquáticos, onde o fito e zooplânctons, como certas algas, possibilitariam a sobrevivência e multiplicação da bactéria no período silente (Islam et al., 1993, 1994; Araújo et al., 1996).

A projeção desse acontecimento ecológico resultaria na propagação do agente através da cadeia alimentar de diferentes sistemas, tendo como consequência a contaminação de frutos do mar. A ingestão deste tipo de alimento cru ou insuficientemente cozido se constituiu num mecanismo muito importante na veiculação do vibrião colérico (Blake, 1993). Todavia, apesar do isolamento da bactéria em água do mar (praías) em Recife e arredores, como uma consequência natural das descargas de esgotos em rios e canais, não foi possível evidenciar *V. cholerae* O₁, em pescados (Tabela 1), nem tampouco em outra investigação correlata (Lima, 1995).

Pelos resultados consignados para os alimentos (Tabela 1), depreende-se uma participação discreta desta via de transmissão, a qual não deve ser negligenciada, considerando a ocorrência em alimentos prontos (arroz e macarrão), provavelmente decorrente da participação de um manipulador assintomático ou do uso de água contaminada. É oportuno salientar as observações de Makukutu & Guthrie (1986), que, ao contaminarem arroz e macarrão prontos com vibrião colérico, verificaram que, após aquecimento por uma hora até 60°C, ainda foi possível detectar bactérias viáveis.

Em síntese, os resultados das análises efetuadas demonstraram a importância das águas não tratadas como veículos preponderantes da propagação ambiental de *Vibrio cholerae* O₁, no Estado de Pernambuco, durante a fase epidêmica.

Agradecimentos

Ao CNPq (auxílio parcial), COLAB/FNS, Ministério da Saúde; às técnicas Cristina Durão do Lacen/PE, Lilliane M. Seki e Darcília Maria de Andrade do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz.

Referências

- APHA (American Public Health Association), 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17th ed., New York: APHA/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation.
- APHA (American Public Health Association), 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3rd ed., Washington, DC: American Public Health Association.
- ARAÚJO, D. B.; MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. & HOFER, E., 1996. Influence of the copepod *Mesocyclops longisetus* (Crustacea: Cyclopidae) on the survival of *Vibrio cholerae* O₁ in fresh water. *Cadernos de Saúde Pública*, 12:551-554.
- BLAKE, P. A., 1993. Epidemiology of cholera in the Americas. *Gastroenterology Clinics of North America*, 22:639-660.
- ELLIOT, E. L.; KAYSNER, C. A. & TAMPLIN, M. L., 1992. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. In: *U. S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual*, 7th ed., pp. 111-140, Arlington, USA: AOAC International/Association of Official Analytical Chemists.
- FEACHEM, R. G., 1982. Environmental aspects of cholera epidemiology. III Transmission and control. *Tropical Diseases Bulletin*, 79:1-47.
- HOFER, E., 1974. Métodos utilizados para o isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. *Informe de Patologia Clínica*, 1:5-18.
- HOFER, E., 1993. Cholera in Brazil: analysis of some bacteriologic clinical, and epidemiologic characteristics. In: *Cholera on the American Continents* (A. F. Pestana de Castro & W. F. Almeida, eds.), pp. 167-170, Washington, DC: International Life Sciences Institute/ILSI Press.
- HUGHES, J. M.; BOYCE, J. M.; LEVINE, R. J.; KHAN, M.; AZIZ, K. M. A.; HUQ, M. I. & CURLIN, G. T., 1982. Epidemiology of eltor cholera in rural Bangladesh: importance of surface water in transmission. *Bulletin of the World Health Organization*, 60:395-404.
- ISLAM, M. S.; DRASAR, B. S. & SACK, R. B., 1993. The aquatic environment as a reservoir of *Vibrio cholerae*: a review. *Journal of Diarrhoeal Disease Research*, 11:197-206.
- ISLAM, M. S.; DRASAR, B. S. & SACK, R. B., 1994. The aquatic flora and fauna as a reservoirs of *Vibrio cholerae*: a review. *Journal of Diarrhoeal Disease Research*, 12:87-96.
- LIMA, N. V., 1995. *Pesquisa de Vibrio cholerae em Ostras, Mariscos e Peixes Capturados no Litoral de Pernambuco*. Dissertação de Mestrado, Recife: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.
- MUJICA, O. J.; QUICK, R. E.; PALACIOS, A. M.; BEINGOLEA, L.; VARGAS, L.; MORENO, D.; BARRET, T. J.; BEAN, N. H.; SEMINARIO, L. & TAUXE, R. V., 1994. Epidemic cholera in the Amazon: the role of produce in disease risk and prevention. *Journal of Infectious Diseases*, 169:1381-1384.
- MAKUKUTU, C. A. & GUTHRIE, R. K., 1986. Behavior of *Vibrio cholerae* in hot foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 52:824-831.
- MS (Ministério da Saúde), 1991. *Manual de Saneamento*. 2^a ed., Brasília: Fundação Nacional de Saúde. Coordenação de Saneamento.
- MS (Ministério da Saúde), 1992. *Cólera – Manual de Diagnóstico Laboratorial*. Brasília: Comissão Nacional de Prevenção da Cólera, Ministério da Saúde.
- MS (Ministério da Saúde), 1993. *Cólera – Transmissão e Prevenção em Alimentos e Ambiente*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1991. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. NCCLS Publication M2-A4. Villanova: NCCLS.
- PESSÔA, G. V. A. & SILVA, E. A. M., 1974. Milieu pour l'identification présumptive rapide des entérobactéries, des aeromonas et des vibrions. *Annales de Microbiologie*, 125A:341-347.
- SSEPE (Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco), 1993. *Manual de Procedimentos da Cólera*. Recife: Fundação de Saúde Amaury de Medeiros, Comissão Estadual de Prevenção e Controle da Cólera, SSEPE.
- SNOW, J., 1855. *On the Mode of Communication of Cholera*. 2nd ed., London: J. Churchill.
- SWAROOP, S., 1951. Endemicity of cholera in India. *Indian Journal of Medical Research*, 39:141-183.
- SWERDLOW, D. L.; MINTZ, E. D.; RODRIGUEZ, M.; TEJADA, E.; OCAMPO, C.; ESPEJO, L.; GREENE, K. D.; SALDANA, W.; SEMINARIO, L.; TAUXE, R. V.; WELLS, J. G.; BEAN, N. H.; RIES, A. A.; POLLACK, M.; VERTIZ, B. & BLAKE, P. A., 1992. Waterborne transmission of epidemic cholera in Trujillo, Peru: lessons for a continent at risk. *Lancet*, 340:28-32.
- TAMPLIN, M. L. & CARRILLO, P. C., 1991. Environmental spread of *Vibrio cholerae* in Peru. *Lancet*, 338:1216-1217.
- TAUXE, R. V. & BLAKE, P. A., 1992. Epidemic cholera in Latin America. *Journal of the American Medical Association*, 267:1388-1390.
- WHO (World Health Organization), 1992. *Guidelines for cholera control. Programme for Control of Diarrhoeal Diseases*. Geneva: WHO/CDD/SER/80.4 Rev. 3.