

Enumeração e identificação de vibrios sacarose-positivos em amostras de lulas frescas comercializadas no município de Niterói-RJ

(Enumeration and identification of sucrose-positive vibrios in samples of fresh squids commercialized at Niterói county-RJ)

Francisco Carlos de Lima*, Luiz Antônio Trindade de Oliveira** e Rosana Rangel Duarte***

Resumo

Foi efetuado um estudo sobre a enumeração e a identificação de vibrios sacarose-positivos em lulas frescas obtidas no comércio varejista do município de Niterói-RJ. No experimento, em 50 amostras de lulas, identificadas como pertencentes à espécie *Dorytheutis brasiliensis* Blainville, 1823, foram isoladas Unidades Formadoras de Colônias (UFC) sacarose-positivas em 28 (56%) amostras. Destas, foram identificados o *Vibrio alginolyticus* e vibrios do grupo NAG (não aglutináveis). A média dos Números Mais Prováveis (NMP) dos vibrios totais (com exceção da amostra com NMP > 2400 bacts./g) foi 101,70 bacts./g. Do total de 29 isolamentos nas 28 amostras, o *V. alginolyticus* do grupo I de Heiberg obteve o maior percentual (62,07%), o *V. alginolyticus* do grupo III apenas 10,30% e os vibrios NAG com 27,63%.

Palavras-chave: vibrios marinhos, *Vibrio alginolyticus*, vibrios NAG, vibrios sacarose-positivos.

Introdução

O gênero *Vibrio* engloba uma gama de espécies bastante semelhantes fenotipicamente (Johnson et al., 1971; Liston e Baross, 1973). Nos estudos sobre vibrios halofílicos na costa japonesa, Sakazaki et al. (1963) descreveram três biotipos, sendo que o biotipo II, o *Vibrio alginolyticus*, era também capaz de originar toxinfecção alimentar, além de ser o único a mostrar o fenômeno do "swarming" (crescimento abundante com espalhamento) sobre a superfície do agár com 2 a 7% de NaCl (Sakazaki, 1968; Johnson et al., 1971). Dos organismos halofílicos, o *V. alginolyticus* é a espécie mais comumente isolada do ambiente marinho (Bockemuhl e Triemer, 1974; Gjerde e Böe, 1981; Zebral, 1988; Chan, 1989). No Japão, Zen-Yoji et al. (1965) consi-

taram que o *V. alginolyticus* era responsável por 0,8% dos casos de toxinfecções alimentares.

A maioria dos trabalhos sobre a patogenicidade do *V. alginolyticus* reporta a predominância do organismo em lesões superficiais (Rubin e Tilton, 1975). Na Inglaterra, Ryan (1976) isolou o vibrio em três casos de lesões sépticas superficiais, sendo duas em feridas de extremidades e uma de secreção oriunda de otite externa. Pien et al. (1977), no Hawai, em oito casos estudados, isolaram a bactéria de três pacientes com otite externa e cinco a partir de lacerações e ferimentos superficiais, todos originados no ambiente marinho. Outros casos de infecções de ouvido pelo *V. alginolyticus* foram assinalados por Olsen (1968) e Hansen et al. (1979), com os últimos identificando, na Bélgica, uma linhagem com características incomuns, como encapsulamento e imobilidade. Ainda em 1979, Schimidt et al., isolaram o organismo de secreção ocular em um caso de conjuntivite e Pezzlo et al., (1979) em um paciente com lesão ulcerativa na perna.

Os vibrios NAG (non-agglutinable) ou NVC (non-cholerae vibrio), assim designados por Chatterjee et al. (1970), não sofrem aglutinação pelo antisoro O/subgrupo I do *V. cholerae* (Aldova et al., 1968; Chatterjee et al., 1970; Muller, 1978), embora possuam reações similares às apresentadas por este. Os vibrios NAG são encontrados, com frequência significativa, em pacientes com síndrome coleriforme (Aldova et al., 1968), podendo provocar diarreia grave semelhante à causada pelo biotipo El Tor do *V. cholerae* (Zafari et al., 1973). Dakin et al. (1975) cita um surto de gastroenterite envolvendo 64 pessoas, em que a presença de vibrios NAG foi detectada em alimentos de origem não marinha. Fearrington et al. (1974) e Prats et al. (1975) isolaram o microrganismo em dois casos distintos de septicemia seguida de encefalomielite.

*Prof. Adjunto - Dep. de Tecnologia de Alimentos/Fac. Vet. UFF

**Prof. Titular - Dep. de Tecnologia de Alimentos/Fac. Vet. UFF

***Médica Veterinária e Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Higiene Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal/Fac. Vet. UFF - Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ/Brasil CEP: 24230-340

O objetivo desta pesquisa é a identificação de vibrios sacarose-positivos potencialmente patogênicos, presentes no pescado comercializado no município de Niterói-RJ.

Material e Métodos

Foram utilizadas 50 amostras de lulas frescas, obtidas no mercado varejista do município de Niterói-RJ, no período de março a dezembro. As amostras, acondicionadas em isopor com gelo, foram levadas para o Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, onde após fragmentação e pesagem, foram homogeneizadas em liquidificador, por dois minutos em rotação média.

A enumeração dos vibrios sacarose-positivos foi feita de acordo com a metodologia prescrita pela International Commission on Specifications for Foods (ICMSF) de 1983, com as seguintes modificações:

a) Para a enumeração optou-se pelo meio GSTB (glucose-salt-teepol broth) (Akiyama et al., 1963, citado por Barros, 1977, p. 25) ao invés do caldo polimixina;

b) Na prova de Voges-Proskauer foi usada a temperatura de 35°-37°C/24-48 horas, segundo MacFaddin (1985), ao invés de 27°-29°C/18 horas;

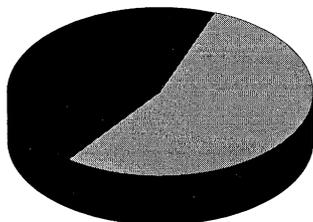
c) Na formulação do GSTB usou-se o Tween 80 (Merck - art. 822187) em substituição ao teepol. Ambas as substâncias têm a função de aumentar a tensão superficial do meio, dificultando a motilidade, o que evita a formação do "swarming" propiciando maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas.

Como teste complementar na identificação dos vibrios sacarose-positivos foi utilizada a Classificação de Heiberg (1936), baseada na resposta à fermentação dos açúcares manose, sacarose e arabinose. Segundo esta classificação, o *V. alginolyticus* pode pertencer a dois grupos distintos: o I (manose +/- sacarose +/- arabinose -) e o III (manose +/- sacarose +/- arabinose +); e os vibrios NAG, por sua vez aos grupos I (já citado), ao II (manose -/ sacarose +/- arabinose -) e ao V (linhagens sacarose-negativas) (Chatterjee, 1974).

Resultados

Todas as amostras, quando inoculadas no meio GSTB, apresentaram crescimento. Em 35 amostras, equivalentes a um percentual de 70%, foi observado o desenvolvimento

PLACAS SEM
CRESCIMENTO
44%



SACAROSE +
56%

Fig. 1 - Percentual de frequência de bactérias sacarose positivas em 50 amostras de lulas.

Tabela 1 - Enumeração de vibrios totais, vibrios NAG e *Vibrio alginolyticus*, em amostras de lulas.

| Nº | Vibrios Totais NMP bacts./g | Vibrios NAG NMP bacts./g | <i>Vibrio alginolyticus</i> NMP bacts./g |
|----|--------------------------------|-----------------------------|---|
| 01 | 15 | - | 15 |
| 02 | 4 | - | 4 |
| 03 | 15 | - | 15 |
| 04 | 93 | - | 93 |
| 05 | 43 | - | 43 |
| 06 | 23 | 23 | - |
| 07 | 460 | - | 460 |
| 08 | 15 | - | 15 |
| 09 | 4 | - | 4 |
| 10 | 4 | 4 | - |
| 11 | 4 | - | 4 |
| 12 | 11 | - | 11 |
| 13 | 3 | - | 3 |
| 14 | 23 | - | 23 |
| 15 | 7 | - | 7 |
| 16 | 150 | - | 150 |
| 17 | 21 | - | 21 |
| 18 | 15 | - | 15 |
| 19 | 93 | - | 93 |
| 20 | 11 | 11 | - |
| 21 | 21 | 21 | - |
| 22 | 75 | - | 75 |
| 23 | 460 | - | 460 |
| 24 | 39 | 39 | - |
| 25 | 9 | 9 | - |
| 26 | 1100 | 1100 | - |
| 27 | 28 | 28 | - |
| 28 | > 2400 | - | > 2400 |

Tabela 2 - Perfil bioquímico do *Vibrio alginolyticus*, e vibrios NAG isolados de amostras de lulas

| Provas bioquímicas | <i>Vibrio alginolyticus</i> | Vibrios NAG |
|--------------------|-----------------------------|-------------|
| Citocromo-oxidase | + | + |
| VP | + | 6-/2+ |
| Crescimento a 42°C | + | + |
| Lisina | + | + |
| Arginina | 16-/4+ | - |
| Halofilismo | 0% | 7-/1+ |
| | 6% | + |
| | 8% | + |
| | 10% | 7+/1- |
| Glicose | + | + |
| Sacarose | + | + |
| Manitol | + | 7+/1- |

(+) amostra positiva
(-) amostra negativa

máximo (crescimento nos três tubos das três séries) e em 47 amostras, nas diluições de 10⁻¹ e 10⁻².

Na semeadura em agár TCBS (tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose), 28 amostras apresentaram formação de UFCs amarelas (sacarose-positivas), como pode ser observado na Fig. 1. Estas unidades eram de tamanhos variados com tendência a grandes.

Tabela 3 - Diferenciação do *Vibrio alginolyticus* dos vibrios NAG, em amostras de lulas

| Provas | Microorganismos isolados | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | <i>V. alginolyticus</i> | NAG1 | NAG2 | NAG3 | NAG4 | NAG5 | NAG6 | NAG7 | NAG8 |
| Bioquímicas | | | | | | | | | |
| Halofilismo 0% | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Halofilismo 10% | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Manitol VP | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

Tabela 4 - Distribuição das 29 amostras de lulas segundo a Prova de Heiberg

| Espécies | Sacarose | Manose | Arabinose | Nº de isolamentos | % |
|-----------------------------------|----------|--------|-----------|-------------------|---------------|
| <i>Vibrio alginolyticus</i> (I) | + | + | - | 18 | 62,07 |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> (III) | + | + | + | 03 | 10,30 |
| Vibrios NAG (II) | + | - | - | 08 | 27,63 |
| TOTAL | | | | 29 | 100,00 |

O exame morfológico evidenciou que todas as UFCs eram formadas por bactérias Gram negativas, pleomórficas, porém com número significativo de organismos em forma de bastões curvos.

Pelas características tintoriais e morfológicas, os microrganismos isolados foram considerados como pertencentes ao grupo *Vibrio*. As amostras, com exceção de uma com NMP (Número Mais Provável) máximo (> 2.400 bacts./g) (Tabela 1), apresentaram o NMP médio de 101,70 bacts./g, e 23 (85,18%) com NMP abaixo do índice médio.

No agár motilidade todas as bactérias mostraram-se móveis e apresentaram crescimento no caldo e no agár tripticase soja. Nas semeaduras em TSI, houve acidificação tanto na base quando no bisel, tornando o meio totalmente amarelo.

Os testes bioquímicos evidenciaram que das 28 amostras com UFCs sacarose-positivas no meio TCBS, 20 (71,40%) continham vibrios que apresentaram um perfil bioquímico semelhante ao do *V. alginolyticus* (Tabela 2). Os oito restantes, correspondendo a 28,60%, embora possuidores de respostas bioquímicas bastante semelhantes às daquelas do *V. alginolyticus* (Tabela 2), foram diferenciados através de testes associados (Tabela 3) e identificados pela prova de Heiberg (Tabela 4) como pertencentes ao grupo NAG.

Segundo a Classificação de Heiberg, das 20 amostras positivas para o *V. alginolyticus*, uma desenvolveu UFCs com resposta distinta em relação à utilização da arabinose. Destes 21 isolamentos do *V. alginolyticus*, 18 pertenciam ao grupo I e três ao grupo III de Heiberg. Os organismos do grupo NAG, identificados pelo teste de Heiberg, foram diferenciados dos grupos aos quais pertenciam O *V. alginolyticus* pela não utilização da manose (Tabela 4), o que os caracterizavam como pertencentes ao grupo II de Heiberg.

Discussão

Os cefalópodes, e em especial, as lulas, foram substratos raramente utilizados em estudos microbiológicos até a presente data, acarretando uma limitação muito grande na comparação dos parâmetros analisados.

A maioria das pesquisas envolvendo os vibrios sacarose-positivos tomou amostras coletadas no ambiente marinho, enquanto neste trabalho as amostras foram coletadas em bancas de revenda ao consumidor, estando sujeitas a vários fatores que poderiam acarretar modificações em sua carga microbiana.

Em relação ao meio TCBS, não foi registrado nenhum crescimento anormal das UFCs sacarose-positivas no tempo de incubação preconizado. A formação de "swarming" só foi verificada nas UFCs do *V. alginolyticus*, em placas incubadas em um tempo mínimo de 48 horas. A substituição do "teepol" pelo "tween 80", no meio GSTB, pareceu não modificar a característica desejada de inibir a formação do "swarming".

O *V. alginolyticus* pode ser identificado por meio de poucas características bioquímicas e morfológicas, sendo facilmente diferenciável de outros vibrios (Pezllo et al., 1979). No entanto, várias pesquisas têm mostrado que algumas provas podem apresentar respostas incomuns que dificultam a sua identificação. A literatura cita linhagens sacarose-negativas do *V. alginolyticus* (Sakazaki et al., 1963; Zen-Yoji et al., 1965), além do teste VP negativo (Zen-Yoji et al., 1965; Pien et al., 1977; Schmidt et al., 1979) e sem crescimento em meio salino a 10% (Zen-Yoji et al., 1965) e a 8% (Schmidt et al., 1979).

As 20 amostras de *V. alginolyticus* isoladas em lulas apresentaram o padrão normal nas três provas citadas, ou seja, positivas para sacarose, VP e halofilismo a 10%, não tendo

sido observadas cepas imóveis como relatado por Hansen et al. (1979) e sem crescimento a 42°C como as citadas por Kristensen (1974) e Ryan (1976). Os testes básicos aplicados a estas amostras apresentaram os resultados esperados para a caracterização da espécie, exceção feita somente à prova da arginina, normalmente negativa (Kampelmacher e Jansen, 1972; Zen-Yoji et al., 1973; Kristensen, 1974; Ryan, 1976; Pezzlo et al., 1979; Blake et al. 1980), mas que apresentou resultado positivo em quatro das amostras analisadas. Este resultado indica uma frequência bastante alta em relação ao obtido por Baumann et al. (1973) que encontraram, em 30 amostras do *V. alginolyticus*, apenas uma arginina positiva.

A posição do *V. alginolyticus* dentro da classificação de Heiberg é dada, principalmente, pela prova de fermentação de arabinose, já que a da manose pareceu ser positiva em todos os trabalhos consultados e a da sacarose, em razão da rara incidência de negativos, não é significativa para a criação de um novo grupo. Na maioria das pesquisas, as amostras do *V. alginolyticus* são arabinose-negativas, o que as situam no grupo I de Heiberg.

Neste trabalho foram verificadas linhagens do *V. alginolyticus* fermentadoras da arabinose, semelhantes às relatadas por Kampelmacher e Jansen (1972) e Chatterjee (1974), que isolaram duas destas linhagens em dez e 16 em 43 amostras examinadas, respectivamente. Dos 21 isolados do *V. alginolyticus* obtidos das amostras de lulas, três foram arabinose-positivos, sendo incluídos no grupo III de Heiberg e os 18 arabinose-negativos, foram considerados pertencentes ao grupo I.

Em relação ao vibrio NAG e à sua posição na classificação de Heiberg, Bhattacharji e Bose (1964) verificaram a presença destes vibrios na água do mar, principalmente os dos grupos I e II. Sakazaki et al. (1967) encontraram 88,10% das amostras com respostas inerentes ao grupo I, 9,30% ao grupo II e apenas 2,60% ao grupo V. Vibrios NAG dos grupos I e II foram também isolados por Dakin et al. (1974), Muller (1977), Muller (1978) e Smith Jr. (1979), sendo que Muller (1977) observou um predomínio três vezes maior de vibrios do grupo II.

O isolamento de oito amostras de vibrios NAG do grupo II, em lulas, não oferece uma base sólida para uma discussão efetiva embora outros autores como Aldova et al. (1968) e Chatterjee et al. (1970) tenham encontrado apenas vibrios NAG do grupo II em suas pesquisas.

O percentual de 27,63% de vibrios NAG isolados, do total de organismos sacarose-positivos está de acordo com os valores determinados por Muller (1977) e Muller (1978) que são de 22 e 33%, respectivamente, na água do mar.

Abstract

The enumeration and identification of sucrose-positive vibrios in fresh squids commercialized at Niterói county RJ

From 50 samples of squids of the species *Dorytheutis brasiliensis* Blainville, 1823, Colonies Formed Units (CFUs) sucrose-positives *Vibrio alginolyticus* and NAG vibrios (non-

agglutinable) were isolated. The average of the Most Probable Number of total vibrios (except the sample with MPN > 2400 bacts./g) was 101,70 bacts./g. From 28 samples, 29 isolations were carried out and the *V. alginolyticus* group I of Heiberg's Classification showed the greatest percentage (62,07%). The *V. alginolyticus* group III showed only 10,30% and NAG vibrios 27,63%.

Key words: marine vibrios, *Vibrio alginolyticus*, NAG vibrios, sucrose-positive vibrios.

Referências

- ALDOVA, E., LAZNICKOVA, K., STEPANKOVA, E. LIETAVA, J. Isolation of Nonagglutinable Vibrios from an Enteritis Outbreak in Czechoslovakia. *Journal of Infectious Diseases*, v. 118, n. 1, p. 25-31, 1968.
- BARROS, G.C. *Vibrio parahaemolyticus*: Isolamento e Identificação em Crustáceos e Moluscos da Baía de Sepetiba. Niterói, 1977. 70p. Dissertação de Mestrado em Higiene e Processamento de Produtos de Origem Animal - Universidade Federal Fluminense.
- BAUMANN, P., BAUMANN, L., REICHEL, J.L. Taxonomy of Marine Bacteria; *Beneckeia parahaemolytica* and *Beneckeia alginolytica*. *Journal of Bacteriology*, v. 113, n. 3, p. 1144-1155, 1973.
- BHATTACHARJI, L.M., BOSE, B. Field and Laboratory Studies on the Transformation of the *Vibrio cholerae* in the Maintenance of Cholera Endemicity: a Preliminary Report. *Indian Journal of Medical Research*, v. 52, p. 777-783, 1964.
- BLAKE, P.A. WEAVER, R.E., HOLLIS, D.G. Diseases of Humans (other than cholera) Caused by Vibrios. *Annual Review of Microbiology*, v. 34, p. 341-367, 1980.
- BOCKEMUHL, J., TRIEMER, A. Ecology and Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* on the Coast of Togo. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 51, n. 4, p. 353-360, 1974.
- CHAN, K.-Y., WOO, M.L., LAM, L.Y., FRENCH, G.L. *Vibrio parahaemolyticus* and other Halophilic Vibrios Associated with Seafood in Hong Kong. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, n. 1, p. 57-64, 1989.
- CHATTERJEE, B.D. Present Status of Heiberg Groups for Classifying Cholera-like Organisms. *Indian Journal of Medical Research*, v. 62, p. 479-483, 1974.
- CHATTERJEE, B.D., GORBACH, S.L., NEOGY, K.N. Characteristics of Noncholera Vibrios Isolated from Patients with Diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 677-682, 1970.
- DAKIN, W.P.H., HOWELL, D.J., SUTTON, R.G.A., D'KEEFE, M.F., THOMAS, P. Gastroenteritis due to Non-agglutinable (non-cholera) Vibrios. *Medical Journal of Australia*, v. 2, n. 13, p. 487-490, 1974.
- FEARRINGTON, E.L., RAND Jr., C.H., MEWBORN, A. WILKERSON, J. Non-cholera Vibrio Septicemia and Meningoencephalitis. *Annals of Internal Medicine*, v. 81, n. 3, p. 401, 1974.
- GJERDE, J., BØE, B. Isolation and Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* from the Norwegian Coastal Environment. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 22, p. 331-343, 1981.
- HANSEN, W., CROKAERT, F., YOURASSOWSKY, E. Two strains of Vibrio species with Unusual Biochemical Features Isolated from Ear Tracts. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 152-153, 1979.
- HEIBERG, B. The Biochemical Reactions of Vibrios. *Journal of Hygiene*, London, v. 36 p. 114-117, 1936.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microorganismos de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza, Editorial Acribia, 1983. v. 1: Técnicas de análisis microbiológico. 431p.
- JOHNSON, H.C., BAROSS, J.A., LISTON, J. *Vibrio parahaemolyticus* and its Importance in Seafood Hygiene. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 159, n. 11, p. 1470-1473, 1971.
- KAMPELMACHER, E.H., JANSEN, L.M. VAN N. A Survey of the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*, on Mussels and Oysters

- and in Estuarine Waters in the Netherlands. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 35, n. 3, p. 431-438, 1972.
- KRISTENSEN, K.K. The Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the Sound. *Nordisk Veterinaermedicin*, v. 26, n. 3/4, p. 188-196, 1974.
- LISTON, J., BAROSS, J. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Natural Environment. *Journal of Milk and Food Technology*, v. 36, n. 2, p. 113-117, 1973.
- MACFADDIN, J.F. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias de Importancia Clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1985. 301p.
- MULLER, G. Befunde an Nicht-agglutinierenden, Cholera-ähnlichen Vibriolen (NAG's) in Abwasser, Flubwasser und Meerwasser. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt. I. Orig. B*, v. 165, n. 5/6, p. 487-497, 1977.
- MULLER, H.E. Vorkomen und Ökologie non NAG-vibriolen in Oberflächengewässern. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt. I. Orig. B*, v. 167, n. 3, p. 272-284, 1978.
- OLSEN, H., *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Discharge from the Ear in Two Patients Exposed to Sea Water. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B*, v. 86, n. 4, p. 247-248, 1978.
- PEZZLO, M., VALTER, P.J., BURNS, M.J. Wound Infection Associated with *Vibrio alginolyticus*. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 71, n. 4, p. 476-478, 1979.
- PIEN, F., LEE, K., HIGA, H. *Vibrio alginolyticus* Infections in Hawai. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 5, n. 6, p. 670-672, 1977.
- PRATS, G., MIRELIS, B., PERICAS, R. Non-cholera *Vibrio* Septicemia and Meningo-encephalitis. *Annals of Internal Medicine*, v. 82, n. 6, p. 848-849, 1975.
- RUBIN, S.J., TILTON, R.C. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from Wound Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 2, n. 12, p. 1556-1558, 1975.
- RYAN, W.J. Marine Vibrios Associated with Superficial Septic Lesions. *Journal of Clinical Pathology*, v. 29, n. 11, p. 1114-1115, 1976.
- SAKAZAKI, R. Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the Biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, v. 21, n. 6, p. 359-362, 1968.
- SAKAZAKI, R., GOMEZ, C.Z., Sebald, M. Taxonomical Studies of the So-called NAG Vibrios. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, v. 20, p. 265-280, 1967.
- SAKAZAKI, R., IWANAMI, S., FUKUMI, H. Studies on the Enteropathogenic, Facultatively Halophilic Bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, Cultural and Biochemical Properties and its Taxonomical Positions. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, v. 16, p. 161-188, 1963.
- SCHMIDT, U., CHMEL, H., COBBS, C. *Vibrio alginolyticus* Infections in Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 10, n. 5, p. 666-668, 1979.
- SMITH Jr., H.L. Serotyping of Non-cholera Vibrios. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 85-90, 1979.
- ZAFARI, Y., RAHAMANZADEH, S., ZARIFI, A.Z. ZAFARI, Y. Diarrhoea Caused by Non-agglutinable *Vibrio cholerae* (non-cholera vibrio). *Lancet*, v. 2, p. 429-430, 1973.
- ZEBRAL, A.A. Isolamento e Caracterização de *Vibrio parahaemolyticus*, outros Vibriões e Bactérias Afins, de Mexilhões da Baía de Guanabara. *Ciências Médicas*, v. 7, n. 1/2, p. 21-28, 1988.
- ZEN-YOJI, H., LECLAIR, R.A., OHTA, K. MONTAGUE, T.S. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* Cultures Isolated in United States with those Isolated in Japan. *Journal of Infectious Diseases*, v. 127, n. 3, p. 237-241, 1973.
- ZEN-YOJI, H., SAKAI, S., TERAYAMA, T. KUDO, Y. ITO, T., BENOKI, M., NAGASAKI, M. Epidemiology, Enteropathogenicity and Classification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 115, n. 5, p. 436-444, 1965.