

Verificação de *V. cholerae* em águas portuárias da cidade do Rio de Janeiro, Brasil: um ensaio metodológico

V. cholerae inspection in the port water of Rio de Janeiro, Brazil: a methodological essay

Everaldo de Santana Silva^{1,*}

Celio Mauro Viana¹

Irma Nelly Gutierrez Rivera
(*in memoriam*)^{II}

Emanuele Sole Wedekind^{III}

RESUMO

O presente estudo visa contribuir para estudos sobre uma possível emergência de cólera, tendo como porta de entrada a zona portuária da cidade do Rio de Janeiro, segundo ensaio metodológico próprio pautado em: (i) monitoramento de visitas náuticas, (ii) levantamento de dados físico-químicos e (iii) pesquisa do vibrio colérico em amostras superficiais de água portuária. Foram monitoradas 251 visitas e analisados 14 isolados presuntivos de *V.cholerae*. No tocante às visitas náuticas, 24% de todas as embarcações monitoradas vinham de regiões endêmicas de cólera. Todos os isolados foram caracterizados como *V.cholerae* não-O1 e não toxigênico. Contudo, a área de estudo possui condições ambientais e sociais para o surgimento de um evento de cólera, aliado ao processo de transferência gênica e de fatores associados à virulência bacteriana. Sugerem-se análises mais aprofundadas e implementação de medidas de preservação das áreas do entorno para a obtenção da melhoria da qualidade da água portuária.

PALAVRAS-CHAVE: Cólera; Doença Infecto-Contagiosa; Porto do Rio de Janeiro; *Vibrio cholerae*

ABSTRACT

This study aims to contribute to other studies on the possible emergence of cholera, with an entry point in the port area of Rio de Janeiro, according to a methodological essay based on the following: (i) nautical visitation monitoring, (ii) physicochemical data collection, and (iii) *V. cholerae* research using surface port-water samples. A total of 251 visitations were monitored, and 14 isolates of presumptive *V.cholerae* were analyzed. With regard to the nautical visitations, 24% of all monitored vessels came from endemic cholera regions. All isolates were characterized as *V.cholerae* non-O1 and non-toxigenic. However, the study area has environmental and social conditions suitable for the emergence of a cholera event, when the gene transfer process and factors associated with bacterial virulence are considered. We suggest further analysis and implementation of measures preserving the surrounding areas to achieve an improvement in the port water quality.

KEYWORDS: Cholera; Infectious Disease; Port of Rio de Janeiro; *Vibrio cholerae*

^I Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

^{II} Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

^{III} Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: everaldo.desantana@gmail.com

Recebido: 01 abr 2015

Aprovado: 24 jun 2015



INTRODUÇÃO

Os organismos bacterianos constituem uma fração significativa da biomassa e da diversidade genética dos ambientes marinhos, cuja função ecológica, pauta-se na manutenção e no equilíbrio das comunidades existentes¹. Entretanto, alterações ambientais ocasionadas principalmente por determinantes sociais acabam por causar um desequilíbrio nestes ecossistemas², onde a introdução de espécies exóticas, que tem na água de lastro o seu principal vetor³, causando mudanças na composição e comportamento das populações marinhas de ambientes costeiros⁴. Estes ambientes, então, se apresentam como reservatórios importantes de agentes patogênicos transmitidos a humanos por veiculação hídrica^{5,6}.

A cólera é uma doença que ocorre, primariamente, através da ingestão de água contaminada⁷, e é causada por uma bactéria gram-negativa sob a forma de bacilo com flagelo polar, aeróbico ou anaeróbico facultativo, capaz de produzir uma enterotoxina causadora de infecção intestinal aguda seguida de uma intensa diarreia. A espécie *V. cholerae* se divide em aproximadamente duzentos sorogrupos, determinados pela presença ou ausência do antígeno O da camada de lipossacarídeos. O sorogrupo O1 toxigênico se divide em biotipos *Clássico* e *El Tor*, e em sorotipos *Ogawa*, *Inaba* ou *Hikojima*⁽⁸⁾. Contudo, em 1992, um novo sorogrupo: O139 (conhecido como Bengal) foi descoberta no Sul da Ásia^{9,10}. A explicação do surgimento deste novo sorogrupo foi pela aquisição da toxina colérica e outros fatores de virulência, pelo sorogrupo não O1 através de processo de conjugação bacteriana^{11,12}. A bactéria é autóctone de ecossistemas aquáticos, adaptando-se bem a amplas variações ambientais¹³. Todavia, condições extremas como baixas temperaturas, altas concentrações de salinidade, choque térmico e falta de nutrientes podem induzir a bactéria a um estado chamado viável mais não cultivável (VNC)^{14,15,16,17}.

A interatividade entre ambiente e saúde elucidada, no caso das doenças infecto-contagiosas, uma íntima relação com o meio ambiente e as condições de saneamento insatisfatórias¹⁸. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a prevalência de cólera está concentrada em países que experimentam problemas graves em saneamento e desigualdades sociais: o subcontinente africano e asiático, em 2012, registrou 124.937 casos (51% de todos os casos mundiais), onde 2.069 evoluíram a óbito¹⁹. Nas Américas, em 2010, a cólera se manifestou de forma epidérmica no Haiti com cerca de 112.000 casos, fato este que preocupa devido à proximidade regional e à frente de paz que o governo brasileiro tem naquela região, seguido pela República Dominicana (7.919 casos) e Cuba (417 casos)²⁰.

Somando os fatores tropicais e os condicionantes de poluição, as atividades portuárias geram intensas e constantes perturbações ambientais, principalmente em portos com grande fluxo de movimentação²¹, o que acaba por ocasionar um cenário favorável à sobrevivência e colonização do *V. cholerae* exótico²².

Com o objetivo de criar uma reflexão crítica sobre uma possível ocorrência da forma patogênica na área de estudo, o trabalho

pautou-se no monitoramento de embarcações, coletas de amostras de água portuária para análise de variáveis físico-químicas e pesquisa de vibrião colérico nas águas superficiais do porto da cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

MÉTODO

O porto da cidade do Rio de Janeiro está localizado na zona costeira da Baía de Guanabara, que é uma das mais importantes baías do litoral brasileiro, com uma superfície de aproximadamente 380 km², profundidade média de 7,6 metros (sendo sua profundidade máxima no canal central de 50 metros) e volume médio de água em torno de 1,87x10⁹ m³²³. O porto fica em uma região de extrema importância econômica brasileira: além de ser uma área de alta atividade de extrativismo pesqueiro e de intensa movimentação portuária, será uma das principais locais de entrada de passageiros, em eventos mundiais que a cidade irá sediar no período de 2014 a 2016. A sua divisão em cais públicos e privados apresentou uma movimentação de cerca de 6.769.028 toneladas em produtos em 2009²⁴.

As águas da região apresentam um intenso histórico de degradação ambiental, devido aos constantes aterramentos, drenagens e recepção de efluentes urbanos, tornando assim o sistema propício à hospedagem de microrganismos patogênicos^{25,26,27,28,29}, estes podendo afetar as populações humanas, por veiculação hídrica, seja por recreação, águas servidas e alimentação³⁰.

Buscando a construção de perfil de perigo de cólera na região portuária da cidade do Rio de Janeiro e na Baía de Guanabara, a metodologia se pautou em três etapas: (i) monitoramento de visitas náuticas, para o levantamento de embarcações com probabilidade de importação do agente, assim como associação com tipo de carga; (ii) levantamento de dados físico-químicos das águas superficiais, determinando as condições ambientais favoráveis à sobrevivência da espécie patogênica e (iii) pesquisa do vibrião colérico em águas superficiais da área portuária.

Monitoramento de visitas náuticas

O processo de monitoramento de visitas náuticas foi realizado semanalmente com auxílio da ferramenta virtual *Marine Traffic*, disponível no sítio <http://www.marinetraffic.com/ais/pt/default.aspx>, entre os meses de outubro de 2011 a fevereiro de 2012, com direcionamento para navios de carga, passageiros, cisternas, ou não identificados, devidamente ancorados, amarrados ou em trânsito. Como a ferramenta possui apenas dados referentes a aproximadamente 15 dias anteriores à data da consulta, foi utilizada a ferramenta 'traçar rota' para a determinação do porto de origem, que mostra uma linha imaginária descrita pela embarcação, orientando a probabilidade de uma possível rota de risco. Quanto à caracterização do risco, as embarcações foram analisadas classificadas em quatro categorias: (i) Risco 1 (alto), porto determinado de região com ocorrência de cólera; (ii) Risco 2 (moderado), porto indeterminado de região com possíveis ocorrências de cólera; (iii) Risco 3 (baixo), porto indeterminado



de região sem casos de cólera descritos e (iv) Risco 4 (fraco), porto determinado de região sem casos de cólera descritos.

Levantamento de dados físico-químicos das águas superficiais

Locais controle e de estudo

Foram determinados dois pontos de controle e cinco de estudo: o ponto de controle 1 (PC 1) situado na entrada da Baía de Guanabara, entre os fortes de Copacabana (Rio de Janeiro) e de Imbuhi (Niterói) e o ponto controle 2 (PC2) situado no Canal do Fundão, próximo a um dos cais do porto, localizado no início da ponte Costa e Silva (sentido Niterói), pontos estes escolhidos por serem os dois mais distantes da área de estudo, e por apresentarem, respectivamente, os melhores e piores padrões físico-químicos obtidos na primeira coleta. O ponto de estudo 1 (PE 1) localizado em frente a um dos cais de recebimento de contêiner do porto (Cais do Caju), próximo à Ponte Costa e Silva, sentido Niterói, local este com intensa movimentação de embarcações para carga e descarga de mercadorias; o ponto de estudo 2 (PE 2), situado próximo à desembocadura do canal do mangue, nas adjacências da zona da rodoviária Novo Rio, na área do Cais de São Cristóvão; o ponto de estudo 3 (PE 3,) localizado em frente ao Pier Mauá, e já se caracteriza pela navegação de embarcações de passageiros, na área do Cais da Gamboa; o ponto de estudo 4 (PE 4) está situado em frente a outro cais de contêiner, próximo ao viaduto do Caju e o ponto de estudo 5 (PE 5) localiza-se nos primeiros dois metros da desembocadura do canal do mangue (Figura 1).

Coleta de amostras

As coletas ocorreram mensalmente de março a julho de 2011 (com exceção de maio devido à falta de embarcação), período

este destinado à primeira etapa do processo de dragagem da zona portuária. Foram utilizados para coleta frascos de vidro simples, devidamente acondicionados e autoclavados. Aproximadamente 500 mL de amostra superficial de água portuária, em cada ponto, foram coletados. As amostras foram transportadas sob refrigeração do local de coleta até o laboratório, no período máximo de 12 h. Os seguintes parâmetros foram monitorados: pH, temperatura (pHmetro AT 315 SP), salinidade e DBO (Medidor multiparâmetro YSI-Pro plus).

Pesquisa de *Vibrio cholerae* em amostras superficiais de água portuária

Isolamento e Identificação

As amostras foram processadas seguindo os padrões e recomendações da norma CETESB L5.507³¹. O processo de enriquecimento foi realizado em meio APA com pH \cong 8,5 e incubação a 36°C durante 6 e 24 horas; e posterior isolamento em meio *thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar* (TCBS, Himed 500 g), durante três períodos de incubação (6, 18 e 24 h). As colônias características foram inoculadas em Ágar nutriente com 1% de NaCl, incubados a 12 h e estocados. Os isolados presuntivos foram estocados em meio Ágar Luria-Bertani.

Caracterização molecular

Extração de DNA genômico

Os isolados foram cultivados em caldo Luria-Bertani e incubados a 28°C durante 24 horas. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA genômico utilizando o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (A1125, Promega Co, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

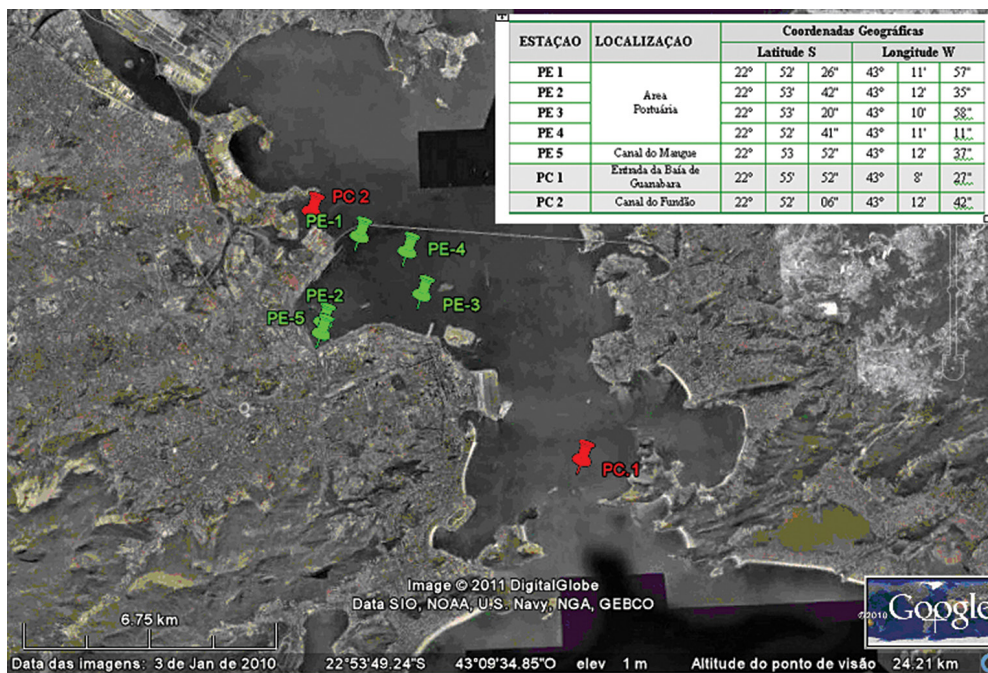


Figura 1. Pontos de interesse e coleta. Adaptado Google Earth.



Confirmação de espécie, verificação de genes associados à virulência e sorologia em *Vibrio cholerae*

Os isolados foram submetidos à identificação de *Vibrio cholerae* e verificação de genes associados à virulência (*ctxA* e *tcpA*) utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As reações de PCR para confirmação de *V. cholerae* foram realizadas em um volume final de 25 µL, utilizando os reagentes com a seguinte concentração final: solução tampão com MgCl₂ a 1X (Promega), solução mix de dNTPs a 0,05 mM (Promega), iniciadores a 0,8 µM (Tabela 1), 0,025 U da enzima GoTaq TM Polimerase (Promega) e DNA a 100 ng/µL. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação Inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 10 min. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf, Nova York, NY, EUA) usando *V. cholerae* O139 (RC46) e *V. cholerae* O1 (RC226) *Escherichia coli* ATCC 25922 como controles positivo e negativo, respectivamente. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) com o marcador de peso molecular Lambda DNA/*Hind* III (Promega). Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e observados no fotodocumentador *Gel Doc XR* (Bio Rad). Posteriormente, os isolados foram submetidos à sorologia, utilizando o antissor polivalente O1 (Probac do Brasil, BR), para identificação de cepas patogênicas.

RESULTADOS

Foram analisadas 251 visitas náuticas durante o período de outubro 2011 até fevereiro de 2012, ocorrendo maiores movimentações nos meses de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012. O cais que obteve maior número de vistas foi o Cais Gamboa (45%), seguido pelo cais Caju (34%) e São Cristóvão (21%). No tocante ao tipo de carga, a maior movimentação foi de carga comum (47%), tanque (20%), passageiros (15%), carga perigosa (11%) e 8% não tiveram suas cargas especificadas (Figura 2). Quanto à origem, 67,3% das embarcações monitoradas, não tinham registro de sua origem, 24,7% originaram-se de portos brasileiros, 5,6% de países da América do Sul (Argentina e Uruguai), 1,6% de países Asiáticos (Índia e China) e 0,8% de Países norte Americanos (EUA e Canadá). Na Figura 3 está sendo mostrada a distribuição das embarcações de acordo à origem das embarcações e destaca-se o Cais Caju seguido pelo Cais Gamboa. Em relação aos valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de águas superficiais do Porto da

cidade de Rio de Janeiro, nos pontos de controle (PC1 e PC2) e de estudo (PE 1 até PE 5), nas quatro coletas uma variação pequena de pH (7,8 a 8,0) foi mostrada. Quanto ao parâmetro salinidade, PE5 (0,6‰ a 0,9‰) e PC2 (11,8‰ a 12,6‰) apresentaram os menores índices, notando uma grande distância numérica destes dois pontos. Quanto aos valores de temperatura os maiores foram detectados no ponto PC2 (26,9°C a 27,2°C) e DBO os menores valores no PE5 (0,3 mg/L a 1,2 mg/L). As amostras de águas portuárias superficiais foram submetidas à pesquisa de vibrio colérico pelo método de enriquecimento, onde somente 14 isolados ficaram viáveis. Estes isolados foram caracterizados pela técnica de PCR e foram positivas para a espécie. Logo após a realização do teste de aglutinação para sorogrupo O1 foram identificados como não-O1 e finalmente pelo PCR foram negativas para os genes *ctxA* (codifica para a toxina colérica) e *tcpA* (codifica para a toxina correguladora do pilus) e caracterizados como não patogênicos (Tabela 2), onde foi diagnosticado que todas as amostras se apresentaram positivas para *V. cholerae* não O1, segundo técnica molecular e sorológica utilizada.

DISCUSSÃO

Durante o período monitorado, a maior movimentação náutica no porto do Rio de Janeiro se deu entre os meses de novembro de 2011 a janeiro de 2012, período este que contribui de forma significativa, para aumento das embarcações destinadas a passageiros. Por outro lado, o cais Caju se apresentou como o

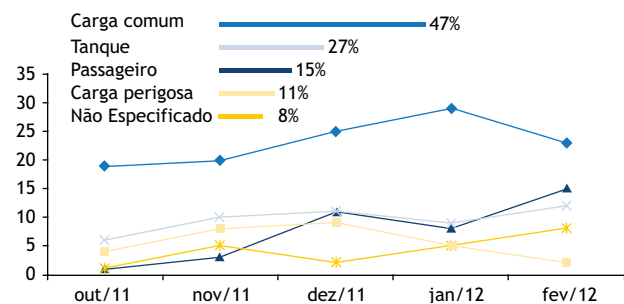


Figura 2. Evolução da movimentação portuária por tipo de carga e mês analisado.

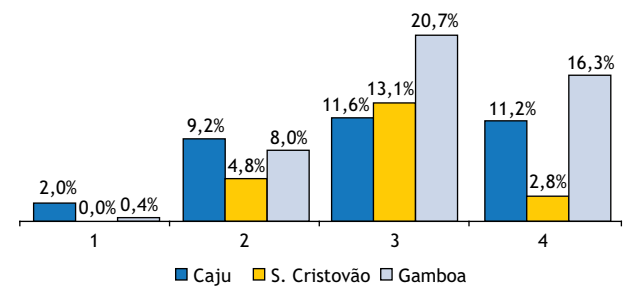


Figura 3. Caracterização de risco (%) de introdução do *V. cholerae*: (1) Risco alto: porto determinado de região com ocorrência de cólera; (2) Risco Moderado: porto indeterminado de região com possíveis ocorrências de cólera; (3) Risco Baixo: porto indeterminado de região sem casos de cólera descritos e (4) Risco Fraco: porto determinado de região sem casos de cólera descritos.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a identificação da espécie e dos genes associados à virulência.

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>V. cholerae</i>	prVC-F: TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG	295 ⁽³²⁾
	prVCM-R: AGTCACCTAACCATACAACCCG	
<i>ctxA</i>	94F: CGGGCAGATCTAGACCTCCTG	564 ⁽³³⁾
	641R: CGATGATCTTGAGCATTCCAC	
<i>tcpA</i>	72F: CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	Clássico: 620
	477R: CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG	
	647R: TTACCAATGCAACGCCGAATG	



Tabela 2. Parâmetros das amostras isoladas.

Nº	Amostra	Ponto de Coleta	Mês	Tempo de Cultura (h)	pH				Temperatura (°C)				Salinidade (‰)				DBO (mg/L)			
					Vmin	Vmax	DePd	Vobt	Vmin	Vmax	DePd	Vobt	Vmin	Vmax	DePd	Vobt	Vmin	Vmax	DePd	Vobt
1	1	PE5	jun/11	6	7,70	7,89	0,13	7,90	25,40	26,60	0,85	26,00	0,60	0,80	0,14	0,70	0,32	0,81	0,35	0,54
2	2																			
3	3																			
4	5																			
5	7																			
6	34	PC2	abr/11	6	7,78	7,84	0,04	7,80	26,90	27,90	0,71	26,90	12,30	12,90	0,42	12,90	1,99	2,66	0,47	2,66
7	36																			
8	39																			
9	40																			
10	47	PC2	mar/11	24	7,78	7,84	0,04	7,80	26,90	27,90	0,71	27,90	12,30	12,90	0,42	12,60	1,99	2,66	0,47	1,99
11	48																			
12	49																			
13	50	PE1	mar/11	24	7,85	7,96	0,08	7,90	25,80	26,40	0,42	26,40	29,40	31,20	1,27	31,20	5,84	6,54		6,54
14	54																			

Amostra = número referencial de controle das amostras; Vmin = Valor mínimo, do ponto, obtido em todas as coletas; Vmax = Valor máximo, do ponto, obtido em todas as coletas; DePd = Desvio Padrão e Vobt = Valor obtido na coleta

que recebeu maior número de visitas, devido, possivelmente, à proximidade da rota de escoamento (Avenida Brasil) e por apresentar o cais que recebe o maior número de contêineres. O Cais Caju, segundo metodologia adotada, apresentou os maiores índices de risco 1 e 2 por receber navios vindos de áreas endêmicas de cólera.

Os parâmetros físico-químicos detectados (pH, Salinidade, DBO e Temperatura) em todos os pontos amostrais, se apresentam como condicionantes ideais para do vibrio colérico. Numa análise específica dos pontos de coletas, o ponto PC 1 (controle 1) apresenta condições adequadas para a sobrevivência do agente em estudo. No tocante aos pontos de estudo, houve pouca variação, sendo a mais marcante no PE 5, provavelmente por esta estar na desembocadura do Canal do Mangue. Uma abordagem sobre a entrada do agente, através de veículos humanos (pessoas que venham de locais endêmicos e/ou infectadas), deve ser investigada, uma vez que o transporte de passageiros representou 15% de todas embarcações analisadas sobre riscos 1 e 2.

Dois pontos merecem melhorias na metodologia adotada: (i) a ferramenta virtual de monitoramento de embarcações, que se apresentou eficiente quanto ao deslocamento para coleta de informações, impossibilitando a obtenção da origem portuária das embarcações oriundas de países que distam mais de duas semanas de viagem, pois só apresentava dados referentes aos 15 dias anteriores à consulta, (ii) o período de coleta deveria contemplar todas as estações do ano, tornando possível a observação das variáveis analisadas e (iii) os pontos controles foram escolhidos por análise de parâmetros referentes à primeira coleta (pH, Salinidade, Temperatura, DBO e localização de aporte de efluentes). Contudo, só estes índices não são suficientes para construção de um perfil epidemiológico. Outros fatores e parâmetros devem ser considerados, estudados e analisados no aprimoramento do estudo.

Apesar de a análise microbiológica das amostras estudadas ter dado negativa para a forma patogênica de *Vibrio cholerae* O1 e os resultados deste estudo serem dados primários nossos resultados poderão servir de ferramenta para novas metodologias de análise de risco, que certamente serão aperfeiçoadas e aprimoradas. Os dados levantados neste estudo foram: (i) o tráfego marítimo, (ii) problemas de saneamento básico, (iii) a detecção *V.cholerae* não O1 e (iv) às características físicas (temperatura, salinidade), químicas (DBO e pH) e biológicas (presença de organismos quitinosos), detectadas na área, são condicionantes ambientais favoráveis à possibilidade de estabelecimento da bactéria na forma patogênica seja por reservatórios humanos ou organismos presentes na água de lastro das embarcações que visitam o porto da cidade do Rio de Janeiro ou ainda pela transformação de formas *viable cultivable* (VN) das *viable but non-culturable* (VNC) que possam já existir no sistema, assim como o surgimento de cepas patogênicas através do processo de interação gênica.

Em saúde pública, o termo meio ambiente toma uma dimensão mais ampla do que apenas fatores ecossistêmicos naturais e características bióticas e abióticas de um determinado meio natural. O termo envolve uma complexidade de variáveis interligadas, agindo mutuamente para a construção de um determinado cenário. O que irá determinar uma patologia não é apenas a exposição ao seu agente causador, mas também toda a carga histórica, social, econômica da região afetada, agregando variáveis aos estudos epidemiológicos em gestão ambiental. O desafio do desenvolvimento sustentável, em medidas preventivas em saúde, é arena fértil para a pesquisa. Em muitas áreas afetadas, a prevenção da cólera perpassa em emergência no tocante à educação pública, saneamento básico e vigilância sanitária e de alimentos.



REFERÊNCIAS

1. Crapez MAC. Bactérias marinhas. In: Pereira RC, Gomes AS, organizadores. *Biologia marinha*. Rio de Janeiro: Interciência; 2002. p. 83-101.
2. Gerolamo M, Penna MLF. Cólera e condições de vida da população. *Rev Saúde Pública*. 2000;34(4):342-47. doi:10.1590/S0034-8910200000400005
3. Dobbs F, Goodrich AL, Thomson III FK, Hynes W. Pandemic serotypes of *Vibrio cholerae* isolated from ship Ballast tanks and coastal waters: assessment of antibiotic resistance and virulence genes (tcpA and ctxA). *Microb Aquatic Systems*. 2012;65:969-74.
4. Rivera ING, Souza KMC, Souza CP, Lopes RM. Free-living and plankton-associated vibrios: assessment in ballast water, harbor areas and coastal ecosystems in Brazil. *Frontiers Microbiol*. 2013;3:443. doi:10.3389/fmicb.2012.00443. eCollection 2012
5. Fykse EM, Nielsen T, Nielsen AD, Tryland I, Delacroix S, Blatny JM. Real-time PCR and NABSA for rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* in ballast water. *Mar Pollut Bull*. 2012;64(2):200-6. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.12.007
6. Rivera ING, Paula CR, Souza CP. Microbiologia aquática marinha. In: Mello IS, Azevedo JL. *Microbiologia ambiental 2*. Jaguariúna: Empraba; 2008. p. 619-27.
7. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2008.
8. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Sissique AK. Cholera. *Lancet*. 2004;363(9404):223-33. doi:10.1016/S0140-6736(03)15328-7
9. Albert MJ, Sissique AK, Islam MS, Faruque AS, Ansaruzzaman M, Faruque SM et al. Large outbreak of clinical cholerae due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet*. 1993;341(8846):704. doi:10.1016/0140-6736(93)90481-U
10. Ramamurthy T, Garg S, Sharma R, Bhattacharya SK, Nair GB, Shimada T et al. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet*. 1993;341(8846):703-704. doi:10.1016/0140-6736(93)90480-5
11. Karaolis DKR, Lan R, Reeves PR. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxicogenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. 1995;177(11):3191-8.
12. Karaolis KR, Kaper J. Pathogenicity islands and other mobile virulence elements of *Vibrio cholerae*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999. Chapter 9, Pathogenicity Islands and other mobile virulence elements of *Vibrio cholerae*; p. 167-87.
13. Huq A, Colwell RR. Vibrios in the marine and estuarine environment: tracking *Vibrio cholerae*. *Ecosystem Health*. 1996;2(3):198-214.
14. Tamplin ML, Gauzens AL, Huq A, Sack DA, Colwell RR. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(6):1977-80.
15. Colwell RR, Huq A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*: the causative agent of cholera. *Ann N Y Acad.Sci*. 1994;740:44-54. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb19852.x
16. Huq A, Colwell RR. Vibrios in the marine and estuarine environments. *J Mar Biotech*. 1995;3:60-3.
17. Huq A, Rivera ING, Colwell RR. Epidemiological significance of viable but nonculturable microorganisms. In: Colwell RR, Grimes DJ, editors. *Nonculturable microorganisms in the environment*. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 301-23.
18. Rouquayrol MZ, Façanha MC, Veras FMF. Aspectos epidemiológicos das doenças transmissíveis. In: Rouquayrol MZ, Almeida Filho N. *Epidemiologia e saúde*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 229-55.
19. World Health Organization - WHO. Health action in crises: Haiti: increased reports of cholera cases 2011 [acesso em 3 ago 2011]. Disponível em: http://www.who.int/wer/2012/wer8731_32.pdf?ua=1
20. World Health Organization. Cholera 2012. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88(31): 321-36.
21. Castro SM, Almeida JR. Dragagem e conflitos ambientais em portos clássicos e modernos: uma revisão. *Sociedade Natureza*. 2012;24(3):519-34.
22. Silva ES. Possibilidade de cólera no porto da Cidade do Rio de Janeiro, Brasil [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2012.
23. Kjerfve B, Ribeiro CHA, Dias GTM, Filipo AM, Quaresma VS. Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Cont Shelf Res*. 1997;7(13):1609-43. doi:10.1016/S0278-4343(97)00028-9
24. Agência Nacional de Transporte Aquaviário - ANTAQ. Anuário de movimentação portuária. Brasília, DF: Agência Nacional de Transporte Aquaviário; 2009 [acesso em 10 abr 2011]. Disponível em: <http://www.antaq.gov.br/Portal/Anuarios/Portuario2009/pdf%5CMovimentacao%5CRiodeJaneiro%5C-carga%5C377PortodoRiodeJaneiro.pdf>
25. Fundação Estadual de Engenharia no Meio Ambiente, Centro de Informações da Baía de Guanabara. Projeto de recuperação gradual do ecossistema da Baía de Guanabara. Rio de Janeiro: Fundação Estadual de Engenharia no Meio Ambiente; 1999. Vol. 2.
26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Estudo exploratório e caracterização de espécies patogênicas em água de lastro em portos selecionados no Brasil: Relatório Técnico Projeto GGPAF. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2002.
27. Coelho V. Baía de Guanabara: Uma história de agressão ambiental. Rio de Janeiro: Casa da Palavra; 2007.
28. Motta RS. Uma análise das condições de saneamento básico da região metropolitana do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Instituto de Estudos de Trabalho e Sociedade; 2008 [acesso em 10 ago 2010]. Disponível em: http://www.iets.inf.br/biblioteca/Uma_analise_das_condicoes_de_saneamento_basico_da_RM_doRJ.pdf



29. Silva FS, Pereira DC, Nunez LS, Krepsk N, Fontana LF, Neto JAB et al. Bacteriological study of the superficial sediments of Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Braz J Oceanography*. 2008;56(1):13-22. doi:10.1590/S1679-87592008000100002
30. Pereira CS, Possas CA, Vianna CM, Rodrigues DP. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):387-90. doi:10.1590/S0101-20612007000200030
31. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. Norma técnica L5.507: isolamento e identificação de *V.cholerae* em água e esgoto. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental; 1992. p. 1-47.
32. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(5):2202-8.
33. Fields PI, Popovic T, Waschmuth K, Olsvik F. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol*. 1992;30(8):2118-21.
34. Rivera ING, Chun J, Huq A, Sack RB, Colwell RR. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(6):2421-9.

Agradecimentos

À professora Christiane Soares (IOC/FIOCRUZ), ao Professor Arnaldo Feitosa e à Sr^a Eglaise Esposto (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UERJ) pela liberação do laboratório e por toda a parte de isolamento do microrganismo. Ao Dr. Alexandre Leal Neto (Superintendência do Meio Ambiente - DOCAS/RJ). À empresa pHmar que viabilizou as coletas, na pessoa da amiga Elizabetta Santos. Ao amigo Dr. Flávio Fernandes (Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - Marinha do Brasil) que colaborou muito no tocante à água de lastro. À toda equipe do Departamento de Microbiologia - Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular da Universidade de São Paulo (Bianca, Maicon, Nádia, Vanessa e Zita), em especial ao Fábio Augusto Cardozo, por toda ajuda e companheirismo no processo de capacitação em isolamento e biologia molecular do organismo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.