

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE NA COMUNIDADE

**Trabalho de Tese para Obtenção do Grau de Mestrado em Saúde
Pública**

**Tema: Avaliação dum Sistema de Monitorização de *Vibrio
cholerae* Ambiental Potencialmente Epidémico em
Maputo - Moçambique**

Autora: Maria Nivalda Lázaro

Tutor: Professor Mauro Colombo (PhD)

Co Tutor: Dr. Mohsin Sidat (MD, MSc)

Maputo, Novembro de 2003

BNSP
WC 262
343

Avaliação dum Sistema de Monitorização de *Vibrio cholerae* Ambiental Potencialmente Epidémico em Maputo - Moçambique

Por:

Maria Nivalda Lázaro

Tese submetida como parte dos requisitos necessários á obtenção do grau de Mestrado em Saúde Pública

UEM – Faculdade de Medicina

Departamento de Saúde da Comunidade

2003

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra que o presente trabalho de pesquisa é da minha autoria e foi elaborado, na base de recursos a que tive acesso bem como declaro que as fontes utilizadas são as nele indicadas.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Ao meu pai, já falecido, a minha mãe por tudo que me deram na vida e a minha
filha Angel Kassandra.

RESUMO

A cólera é uma doença infecciosa intestinal aguda causada pela bactéria *Vibrio cholerae*, que continua sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em muitas áreas de África, Ásia e América Latina. A ocorrência dos casos de cólera resulta da ingestão de água e alimentos contaminados. A propagação desta doença raramente se faz pelo contacto pessoa a pessoa. A doença ocorre em geral, de uma forma epidémica e com uma periodicidade mais ou menos sazonal. A bactéria é originária de ambientes aquáticos onde a água e outros factores ambientais jogam um importante papel na dinâmica da transmissão e epidemiologia da doença.

Uma maneira de se tomar conhecimento da circulação de *Vibrio cholerae* antes mesmo de serem detectados os casos clínicos é através da pesquisa activa do vibrião colérico no meio ambiente aquático. Para o efeito, o Laboratório Nacional de Higiene de Alimentos e Águas (LNHAA) introduziu um sistema de monitorização de *Vibrio cholerae* com potencial epidémico em Maputo desde Abril de 2002.

Este estudo teve como objectivos, Avaliar a importância e a aplicabilidade do sistema de monitorização de *Vibrio cholerae* ambiental, levado a cabo pelo LNHAA durante um ano (Abril de 2002 à Abril, 2003). Avaliar a qualidade da água e alimentos em função das bactérias isoladas através de técnicas microbiológicas nos locais do estudo. Determinar a relação existente entre as frequências de *Vibrio cholerae* no ambiente e as estações climáticas. Relacionar a ocorrência de casos clínicos de cólera com as frequências de *Vibrio cholerae* no ambiente.

Comparar as frequências de *Vibrio cholerae* na água do mar e esgotos, na água do rio e nos alimentos (amêijoas) e Identificar os factores que poderão influenciar o sistema de monitorização na óptica dos trabalhadores do Laboratório.

É um estudo descritivo, retrospectivo. As bactérias foram isoladas pelo método microbiológico convencional, identificadas por testes bioquímicos e serológicos e foram realizados testes de toxigenicidade em PCR. Como resultados foram detectadas as seguintes bactérias: 14 - *Vibrio cholerae* não 01, 65 - outras espécies de *Vibrio*, 214 - *Aeromonas* spp. e outras espécies.

Os dados foram processados com recurso ao programa excell e analisados pelo pacote estatístico STATA INTERCOOLED 8, utilizando o teste T- student.

Este estudo conclui que: - *Vibrio cholerae* detectados revelaram-se não toxigénicos

- A ocorrência de *Vibrio cholerae* no ambiente foi maior na estação chuvosa do que na estação seca.
- Existe um risco sanitário associado a presença de espécies de *Vibriões* patogénicos como é o caso de *V. parahaemolyticus* no ambiente aquático e nos alimentos.

Palavras chaves: Pesquisa, Cólera, *Vibrio cholerae*, Monitorização Ambiental, Vigilância Epidemiológica, Saúde Pública, Moçambique

AGRADECIMENTOS

Gostaria de exprimir os meus sinceros agradecimentos ao Professor Mauro Colombo pela supervisão valiosa, orientação apoio e transmissão dos conhecimentos durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Mohsin Sidat, pelo acompanhamento e colaboração prestada no decurso de todo o trabalho.

A Dra. Helen Smith e ao dr. Gerito Augusto pelas ideias que ajudaram na melhoria do protocolo e ao dr. José Langa na elaboração do relatório.

Ao dr. Bonifácio José e ao Sr. Orvalho na criação de banco de dados e testes estatísticos e ao Sr. Amâncio pela ajuda nos arranjos do relatório.

A Professora Doutora Elena Folgosa pela transmissão de conhecimentos valiosos e revisão do relatório.

Ao projecto CICUPE (Cooperação Universitária Italiana), pelo apoio financeiro para a realização deste mestrado. Aos trabalhadores da Faculdade de Medicina ligados ao mestrado.

A DINAGECA, ao INM, ao GDCM, à DSC, ao Gabinete de Epidemiologia da DNS, ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina e aos Distritos Urbanos nº 1, 4 e 5 que contribuíram com informações relevantes para o estudo.

Aos meus familiares, colegas e amigos que sempre me deram força e todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Um especial obrigado a minha filha Angel Cassandra que muitas vezes e durante as várias fases deste trabalho se viu privada da minha atenção e companhia.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.2. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO	13
2. OBJECTIVOS	14
2.1- OBJECTIVO GERAL.....	14
2.2- OBJECTIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	15
3.2. AMOSTRAGEM	19
3.3. AMOSTRA ESTUDADA	21
3.4. PERIODICIDADE DE RECOLHA.....	22
3.5. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA E DE AMÉIJOAS.....	22
3.6. OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES PARA O ESTUDO	24
3.7. TIPO DE ESTUDO.....	24
3.8- PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	25
3.9- CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	25
4. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO	44
6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	56
8. RECOMENDAÇÕES	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
10. ANEXOS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BES – Boletim Epidemiológico Semanal

CICUPE – Cooperação Universitária Italiana

DNS- Direcção Nacional de Saúde

DINAGECA - Direcção Nacional de Geografia e Cadastro

DSC- Direcção de Saúde da Cidade

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

GPS – Global Position System

GDCM – Gabinete de Drenagem da Cidade de Maputo

INE – Instituto Nacional de Estatística

INM – Instituto Nacional de Meteorologia

LNHAA- Laboratório Nacional de Higiene de Alimentos e Águas

MISAU – Ministério da Saúde

PCR- Reacção em Cadeia da Polimerase

V. - Vibrio

WHO- World Health Organization

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

1. Tabela I – Isolamento de *Vibrio cholerae* nas amostras colhidas em cada visita de campo relacionado com os, casos clínicos diagnosticados, `a temperatura ambiente e `a precipitação..... pag. 27
2. Tabela II - Descrição das bactérias isoladas em amostras de água do mar e esgotos e nas águas semi-salgadas do Rio Matola por local de estudo pag. 30
3. Tabela III - Descrição das bactérias isoladas em amostras da água do Rio Infulene, por local de estudo..... pag. 31
4. Tabela IV - Descrição das bactérias isoladas em amostras de alimentos (amêijoas) por local de estudo pag. 32
5. Tabela V - Resumo (Frequências relativas de *Vibrio cholerae* na água do mar e esgotos, na água do rio e amêijoas) pag. 33
6. Tabela VI – Resumo das espécies de *Vibrio* detectadas e suas frequências pag. 35
7. Tabela VII – Razão amostragens/ frequência de *Vibrio cholerae* por estação do ano nos locais de estudo pag. 35
8. Tabela VIII – Isolamento de *Vibrio cholerae* no ambiente e o número de casos clínicos pag. 38
9. Tabela IX - Número de *Vibrio cholerae* e suas respectivas frequências na água do mar e esgotos e água do rio pag. 40
10. Gráfico número 1 – Comportamento das estirpes de *Vibrio* em termos de quantidade por local de amostragem pag. 34

11. Gráfico número 2 – Razão amostragens/frequência de *Vibrio cholerae* não 01 por estação do ano nos locais de estudo pag. 36
12. Gráfico número 3 - Frequência de *Vibrio cholerae* não 01 por estação do ano pag. 37
13. Gráfico número 4 - Relação entre o isolamento de *Vibrio cholerae* não 01 no ambiente e os casos clínicos de cólera pag. 39
14. Figura A – Identificação topográfica dos locais de amostragem com o Global Position System (GPS) pag. 20
15. Figura B – Testes usando a técnica de PCR da presença dos determinantes genéticos da toxina CTX nas estirpes de *Vibrio* isoladas no ambiente pag. 41

LISTA DOS ANEXOS

- Anexo I – Protocolo técnico
- Anexo II – Localização das coordenadas de GPS e algumas fotografias dos locais de estudo
- Anexo III - Ficha de registo (preenchida) utilizada durante a monitorização de *Vibrio cholerae* no ambiente
- Anexo IV -Tabelas das bactérias isoladas por tipo de água , amêijoas, data de colheita e local de isolamento
- Anexo V – Confirmação laboratorial das estirpes
- Anexo VI - Tabela VII a
- Anexo VII - Questionário do inquérito aos trabalhadores do LNHA
envolvidos na actividade

1. INTRODUÇÃO

A cólera é uma doença infecciosa aguda potencialmente epidémica caracterizada por diarreia grave com ou sem vómitos e que rapidamente leva à desidratação. Este quadro clínico resulta da acção de pelo menos uma enterotoxina produzida pela bactéria da cólera que tem a forma de bacilo encurvado (forma de vírgula) e é chamada de *Vibrio cholerae*.

A transmissão ocorre geralmente através da ingestão de água e alimentos contaminados com as fezes ou vómitos de pacientes com cólera e portadores de *Vibrio cholerae*. A propagação pessoa a pessoa é rara (Vimont et al., 2000; Theron et al, 2000; Rabbani e Greenough, s/d.).

Os factores de risco para a disseminação da doença e os focos de infecção estão associados à pobreza, grandes aglomerações populacionais (campo de refugiados, festas, funerais, mercados e feiras), condições deficientes de saneamento ou inexistência particularmente à falta de água tratada, falta de latrinas nas zonas rurais, destino inadequado das excretas, prática de fecalismo a céu aberto, às condições do recipiente onde é conservada a água para consumo, alimentos consumidos crus principalmente vegetais, reaquecimento insuficiente ou alimentos mal cozidos, falta de higiene pessoal e colectiva, condições impróprias de habitação, baixo nível de educação, condições sócio económicas, culturais e ambientais; desastres naturais, conflitos armados (Vargas et al, 1991; Glass et al., 1991; Siddique et al., 1992; WHO 2001; Codeço, 2001; Mugero, 2001; Vimont et al., 2000, Castiñeiras & Martins, s/d; Heath-Hervio et al., 2002; Ali, 2002).

O papel das águas superficiais ligada a transmissão e rápida propagação da cólera foi reportado a partir de trabalhos do pioneiro John Snow, que identificou a forma de transmissão da cólera fazendo associação epidemiológica da água abastecida por duas companhias, à Lambeth Company e a Southwark & Vauxhall Company com os casos de cólera na Inglaterra em 1855. Ele fez um estudo memorial de duas epidemias ocorridas em Londres em 1849 e 1854, e demonstrou que a água contaminada desempenhava um papel primordial na propagação da doença. Desde então estudos intensivos foram feitos com enfoque nesta doença (Kaper et al., 1995; Madico et al., 1996; Codeço, 2001; Colwell, 2002) e a demonstração do potencial da água em transmitir a cólera foi reportada por Robert Koch em 1884, que identificou a bactéria *Vibrio cholerae* como agente etiológico da cólera numa comunidade da Índia em Calcutá onde ocorria uma epidemia de cólera (Colwell, 2002).

Estudos ecológicos demonstraram que *Vibrio cholerae* é um comensal do *Zooplankton* notavelmente dos *copepods* que jogam um grande papel na multiplicação, sobrevivência (obtenção de nutrientes) e transmissão da cólera; moluscos bivalves, crustáceos, ostras, caranguejo, considerados como potencial habitat de *Vibrio cholerae* no ambiente aquático, *phytoplankton* e algas (Islam M., 1994; Karaolis et al., 1995; Kaper et al., 1995; Faruque et al. 1998; Vimont et al., 2000; Rivera et al., 2001; Colwell, 2002; Pascual et al., 2002). O corpo humano também é um dos reservatórios da forma patogénica de *Vibrio cholerae* (Desmarchelier, 1997; Newsletters, s/d; Funasa, s/d; WHO, 2001; Colwell, s/d; Codeço, 2001).

Portanto, a notável persistência de *Vibrio cholerae* pode explicar-se por este ser um habitante usual em reservatórios da microflora aquática que pode ser facilitada pela capacidade de assumir formas de sobrevivência, por exemplo o estado de viabilidade não cultiváveis das células nos meios de cultura convencionais (Barbieri et al, 1999; Lobitz et al, 2000; Sousa, 2000; Singh et al., 2001; Rivera et al., 2001; Garcia, s/d ; Castiñeiras & Martins, s/d).

A sua grande capacidade de resistência ambiental e a rápida disseminação dificultam, no entanto, as acções de vigilância epidemiológica, impossibilitando o efectivo bloqueio dos surtos, especialmente em áreas deficientes de saneamento (Castiñeiras & Martins, s/d).

Em países onde a cólera exhibe um comportamento sazonal caracterizado por mudanças climáticas, a vigilância ambiental joga um papel importante no controle da doença e, nos países tropicais, onde a temperatura ambiente é sempre acima de 20°C, outros factores especialmente influenciados pelo clima como o fenómeno El Niño (seca e as cheias) podem influenciar a sobrevivência do vibrião e a sazonalidade da cólera (Madico et al., 1996; Newsletters, s/d; Colwell, 1996; WHO, 1998, Stanwell-Smith, s/d; Lipp et al., 2002).

A introdução da cólera num País dificilmente pode ser evitada, entretanto é possível controlar a sua disseminação dependendo da capacidade de resposta das políticas do Serviço Nacional de Saúde, tendo em consideração as condições culturais e sociais da população, infra estruturas de saneamento básico adequada e da aplicação dos programas de vigilância epidemiológica a cargo do Ministério

da Saúde, Direcções Provinciais e Distritais de Saúde e da avaliação do meio ambiente (Folgosa et al, 1994; Funasa, s/d).

A cólera epidémica e endémica é o perigo principal de Saúde Pública e da sociedade no âmbito económico, produtivo, do turismo, da exportação e familiar para muitos países em desenvolvimento, devido à elevada taxa de morbimortalidade e letalidade e o controle desta doença é ainda um problema (Colombo et al., 1997; Tamayo, 2000).

Uma vez que as evidências epidemiológicas sugerem a água como veículo primário da transmissão da cólera é importante a realização da monitorização do meio ambiente explorando o papel que os reservatórios aquáticos têm no alojamento de *Vibrio cholerae* com potencialidades para causar doença. A pesquisa activa de *Vibrio cholerae* no ambiente e a sua monitorização, visam essencialmente a detecção precoce das estirpes do vibrião colérico com potencial de causar doença, de modo a impedir a sua propagação e prevenir eventuais epidemias. Este procedimento consiste na colheita periódica do material do meio ambiente (água e alimentos) e a realização de exame laboratorial. É ainda importante a definição de áreas de maior risco para a entrada e disseminação do vibrião (Codeço, 2001; Funasa, s/d).

Tendo em conta o impacto que esta doença tem para Moçambique, propõe-se levar a cabo este estudo para avaliar a importância e a aplicabilidade dum sistema de monitorização de *Vibrio cholerae* potencialmente epidémico em Moçambique.

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Várias regiões do mundo têm isolado *Vibrio cholerae* em ambientes aquáticos. A hipótese da bactéria viver associada a flora aquática oferece uma nova perspectiva da ecologia do organismo (Islam et al., 1994).

O principal mecanismo patogénico de *Vibrio cholerae* é a produção de 3 enterotoxinas (CT, Zot, Ace) que se tornam virulentas por acção de um bacteriófago que se integra no cromossoma de *Vibrio cholerae* sendo o CT maior factor de virulência. O vírus transporta os genes das três tóxicas conferindo a patogénecidade à bactéria. (Colombo et al., 1997; Theron et al., 2000).

Dois serogrupos "o" são os principais produtores de enterotoxinas e portanto capazes de produzir cólera epidémica, *V. Cholerae* 01 e *V. Cholerae* 0139.

V. Cholerae 01 dependendo da constituição antigénica pode ser dividido em 3 serótipos, denominados Ogawa, Inaba e Hikojima e 2 biótipos com características epidemiológicas distintas, foram descritos: o clássico – (Koch, 1884) e o El Tor - Gotschlich, 1906 (Castiñeiras & Martins, s/d; Saúde no Paraná, s/d; Lewis M.J.,1997; Sousa, 2000).

O biótipo El Tor é o principal causador das epidemias e tem grande capacidade de resistência ambiental embora outras estirpes sejam reportadas (Colombo et al., 1997; Lewis M.J., 1997). Segundo Dalsgaard, 1997 e Faruque, 1998, a espécie epidémica reemerge de fontes ambientais.

Até o século XIX, a cólera estava confinada no subcontinente Indiano. A partir desta região espalhou-se por outros continentes afectando muitos Países e permanecendo por muitos anos. Expandiu-se no mundo sete vezes desde 1817

(1º pandemia), daí pandemias sucessivas ocorreram (Kaper et al., 1995; Desmarchelier, 1997; Faruque et al., 1998).

Neste século a epidemia assolou Moçambique na Ilha de Moçambique em 1859 (Barreto et al., 1995).

A actual pandemia (7ª) começou em 1961 na Ásia (Indonésia) e foi a mais extensiva geograficamente tendo-se dessiminado rapidamente pelo Médio Oriente, atingindo o Continente Africano em 1970, que não tinha experiência da doença por mais de cem anos através da Guiné Conacry (Siddique et al., 1994; Karaolis et al., 1995; Faruque et al., 1998; WHO, 2001; Colwell, s/d; Newsletters s/d).

Desde essa altura foi-se espalhando rapidamente por diversos Países Africanos, tendo afectado Moçambique em 1973 (Barreto et al, 1995; Codeço, 2001; Folgosa, 2001). A partir desse ano a cólera tem afectado o País de forma cíclica com períodos de silêncio de 2 anos entre os períodos epidémicos. O número de casos aumenta durante a estação quente e chuvosa embora em algumas regiões de África os surtos ocorram durante a estação seca ou depois de muita chuva (Folgosa et al, 1994; Codeço 2001; Saúde no Paraná, s/d; Folgosa, 2001).

A ocorrência de surtos sucessivos de cólera na África e América Latina durante a década 90, fez com que a doença se tornasse endémica nessas regiões, sendo o aparecimento cíclico da cólera resultante da influência de mudanças climáticas cíclicas (Lobitz et al., 2000; Codeço, 2001).

A reemergência da cólera no mundo foi esporádica tendo inquietado os cientistas visto que o aumento da incidência continua a devastar principalmente os Países

pobres em que grande parte da população vive em condições de saneamento precária e falta de água potável. (Siddique et al., 1992; Faruque et al., 1998; Theron et al., 2000; Colwell, 2002; Instituto de saúde de Paraná, s/d).

Recentemente foi reportado que diferentes estirpes de *Vibrio cholerae* toxigénico e não toxigénico podem existir no meio ambiente aquático (lagos, rios, poços, estuários e mares) . A sua sobrevivência e persistência pode ser dependente de vários factores como as condições físico-químicas: grau de salinidade, temperatura da água, pH, concentração de nutrientes, da associação da bactéria com as algas (plankton) ou animais aquáticos podendo viver meses ou anos ou por tempo indeterminado e como consequência um risco continuado de ocorrência de novos casos de cólera (Faruque et al., 1998; Saúde no Paraná, s/d; Islam, 1994; Desmarchelier, 1997; Vimont et al., 2000; Codeço, 2001; Jiang et al., 2001; Lipp et al., 2002; Louis et al., 2003). A dinâmica de *Vibrio cholerae* é provavelmente controlada ou influenciada por cada um destes factores (Codeço, 2001; Jiang et al., 2000; Lipp et al., 2002).

A maior epidemia registada em África favorecida por factores ambientais (muita chuva, cheias, ciclones possivelmente relacionados com o fenómeno El Niño ocorreu no Congo, Kenya, Uganda, Tanzania e em Moçambique em particular foi a de 1997-1998 na qual todas as Províncias foram afectadas (D.N.S., 2001; Folgosa, 2001; Newsletter, s/d). Portanto, *Vibrio cholerae* constitui um importante problema de Saúde Pública em Moçambique, que nos últimos anos tem sido afectado por epidemias recorrentes com tendência a endemecidade.

A partir de 1991 no Peru *Vibrio cholerae* tem sido isolado nas fontes de água (esgotos, rios mar) e depende da presença de casos activos, de portadores saudáveis na comunidade e também da temperatura ambiente (Madico et al., 1996).

Um estudo mostrou que *Vibrio cholerae* sobrevive pobremente em temperaturas da água abaixo de 10⁰ C e prolifera activamente em águas ricas em nutrientes à temperaturas acima dos 20⁰ C. Foi reportado também que as temperaturas superiores a 20⁰ C estão associadas ao aumento de *Vibrio cholerae* em amostras de água de esgoto e consequentemente ao aparecimento de casos de cólera (Madico et al, 1996). Olhando para as épocas de eclosão das epidemias de cólera em Moçambique, parece que a ocorrência das mesmas é maior no período quente e chuvoso (Dezembro à Maio). Este comportamento referido por alguns estudiosos de cólera mostra que existe uma correlação positiva entre a ocorrência dos casos de cólera e factores ambientais como a elevação da temperatura (Colwell, 1996; Barbieri et al., 1999; Codeço, 2001; Heath-Hervio et al., 2002). Num estudo da cólera epidémica em Bangladesh: 1985-1991 é referido que a ausência de um sistema de vigilância é o principal constrangimento em regiões endémicas, visto a vigilância fornecer informação importante acerca da epidemiologia da doença (Siddique et al., 1992; Faruque et al., 1998).

Um estudo realizado no Peru sobre a vigilância activa de *Vibrio cholerae* na água dos esgotos como instrumento potencial para predizer surtos de cólera, demonstrou que durante as 144 semanas de vigilância ambiental 6,323 casos foram clinicamente diagnosticados e 4 semanas antes da eclosão desses casos

detectou-se a presença do vibrião colérico na água. Neste estudo os autores concluíram que a presença de *Vibrio cholerae* no ambiente está associada a ocorrência de surtos (Madico et al., 1996). Este estudo menciona também que o sistema de vigilância para detecção de *Vibrio cholerae* na água em pontos estratégicos nas cidades populosas oferece um sistema de monitorização para a cólera em Países menos desenvolvidos, usando técnicas de cultivo laboratorial simples e de baixo custo.

Uma outra pesquisa realizada em Lima, detectaram a presença de *Vibrio cholerae* no ambiente (água de esgoto e água para irrigação) 2-3 meses antes do começo da cólera numa comunidade (Franco et al., 1997). A questão que se coloca é até que ponto o sistema de monitorização realizado pelo LNHAH permitiria isolar *Vibrio cholerae* de fontes ambientais, e a sua relação com a ocorrência de casos clínicos de cólera como é suportada á hipótese do trabalho atrás referido efectuado no Peru (Madico et al., 1996; Dalsgaard et al., 1997).

O Guia de vigilância epidemiológica publicado pela Funasa (Brasil), s/d, refere também a importância da realização da monitorização do meio ambiente para a detecção precoce da circulação de *Vibrio cholerae* numa comunidade.

Barbieri 1999, refere que ambientes aquáticos representam um reservatório de espécies de *Vibrio* e que um programa de monitorização ambiental é necessário como uma urgente medida preventiva para proteger a saúde humana.

A presença e isolamento de espécies de *Vibrio* patogénicos na água e amostras de bivalves em ambientes naturais têm sido documentados por muitos países

européus reporta Heath, 2002 e recomenda um programa de monitorização ambiental de *Vibrio cholerae*.

Num estudo foram examinadas 127 ostras, 15 caranguejos e 5 peixes durante o período de um mês em 2 rios que continham *Vibrio cholerae*, em nenhuma das amostras foi isolado *Vibrio cholerae* embora os rios estivessem contaminados (Islam et al., 1996).

A Fazenda Marinha Atlântico Sul (Brasil), para controlar a qualidade de seus produtos montou um sistema de monitorização de *Vibrio* e outros microrganismos em ostras de Agosto de 2001 á Agosto de 2002 colhidas semanalmente e remetidas ao laboratório de análises cujos resultados estão dentro dos padrões de comercialização para os parâmetros analisados (Silveira Jr., s/d).

A importância da contaminação de vegetais como veículo de transmissão da cólera foi indicada num surto em Jerusalém em 1970. Outros surtos causados por consumo de alimentos foram reportados nos Estados Unidos (Maryland), Argentina, na América Latina (Peru, Equador), Austrália, Macau, Mali e Guinéa (Rabbani e Greenough, s/d).

Em 1974 o programa de vigilância de cólera na comunidade mineira da África do Sul, isolou *Vibrio cholerae* 01 na água do esgoto e em 2 portadores saudáveis, 10 dias antes do reporte do primeiro caso clínico de cólera. Infecções assintomáticas de *Vibrio cholerae* 01 ocorrem mais frequentemente que as sintomáticas e a vigilância para detectar a bactéria na água, pode ser um meio viável de prever surtos de cólera antes de um número de casos significantes ocorram (Madico et al., 1996).

De 1991 a 1994, em Luanda foi montado um sistema de monitorização e foram isoladas estirpes ambientais de *Vibrio cholerae* na água dos rios associadas a epidemia de cólera (Colombo et al., 1997).

Fernandes, 1995, menciona que a primeira referência sobre a poluição da Baía de Maputo data de 1968; referido num estudo dos níveis de contaminação com base na compilação dos resultados das análises das águas da Baía (zona balnear) de 1968 a 1996; em 1981 foi publicado um inquérito sobre a poluição da Baía de Maputo que se referia ao controle da qualidade da água costeira, neste trabalho indicava-se a contaminação fecal. Este estudo concluiu que foram evidenciados contaminantes biológicos e químicos na Baía de Maputo e que a poluição microbiológica estava a acentuar-se e aconselhou a procura de mecanismos que permitam estabelecer um programa de controle permanente da qualidade das águas marinhas.

Outro estudo sobre a avaliação da poluição fecal na água do mar e moluscos bivalves foi efectuado em cinco áreas da Baía, indicando a contaminação fecal e a detecção de patogénicos associados a gastroenterites isolou *Salmonella* spp nas amêijoas analisadas e pela primeira vez foi confirmada em Moçambique a presença de *Vibrio parahaemolyticus* e de *Vibrio mimicus* em bivalves.

O estudo sugere que é importante montar um sistema de monitorização da poluição da Baía de Maputo por ser uma área de intensa actividade de pesca, cujos produtos são usados quer para consumo local, quer para exportação e fortalecer a inspecção sanitária dos produtos do mar (Fernandes et al., 1993).

As vantagens da monitorização do meio ambiente apontadas na literatura (Madico et al., 1996; Funasa, s/d, Conyer, s/d), são:

- Permite a detecção precoce da circulação de *Vibrio cholerae* no ambiente com potencialidade de provocar surtos de cólera, antes mesmo da ocorrência de casos clínicos na região;
- Permite a definição de áreas consideradas de maior risco para a entrada e disseminação do vibrião;
- Proporciona as informações necessárias para orientação na tomada de decisões, na planificação de estratégias, na introdução de medidas de intervenção ou prevenção contra o seu alastramento e o controle da doença na comunidade além da optimização na utilização dos recursos necessários e educação para saúde;
- Chama atenção para fortalecer a inspecção dos produtos do mar em Moçambique;
- Fornece informações importantes acerca da epidemiologia da doença, das mudanças temporais e das propriedades das estirpes de *Vibrio cholerae* isoladas em diferentes epidemias.

1.2. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Moçambique, em particular a cidade de Maputo, tem sido afectado por epidemias de cólera, provavelmente associadas a qualidade da água e alimentos e não se conhece ao certo a relação existente entre os casos clínicos e a frequência de *V. cholerae* no ambiente nas diferentes estações climáticas.

O País não possui um programa de monitorização sistematizado de *V. cholerae* ambiental mas há referências em alguns Países.

Havendo necessidade de actualização da informação científica e possível contribuição para melhoria da Saúde Pública o programa de monitorização poderá funcionar como um sinal de alerta no reforço das medidas preventivas de protecção a saúde humana.

2. OBJECTIVOS

2.1- OBJECTIVO GERAL

Avaliar a importância e a aplicabilidade do sistema de monitorização de *Vibrio cholerae* ambiental em curso, realizado pelo Laboratório Nacional de Higiene de Alimentos e Águas (LNHAA), durante um ano (Abril de 2002 `a Abril de 2003), em Maputo.

2.2- OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1-Avaliar a qualidade da água e alimentos em função das bactérias isoladas através de técnicas microbiológicas nos locais do estudo.

2.2.2-Determinar a relação existente entre as frequências de *Vibrio cholerae* no ambiente e as estações climáticas.

2.2.3-Relacionar a ocorrência de casos clínicos de cólera com as frequências de *Vibrio cholerae* no ambiente.

2.2.4-Comparar as frequências de *Vibrio cholerae* na água do mar e esgotos e na água do rio.

2.2.5-Identificar os factores que poderão influenciar o sistema de monitorização na óptica dos trabalhadores do Laboratório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Neste estudo foi analisado o sistema de monitorização de *Vibrio cholerae* ambiental realizado pelo LNHAÁ feito com base no protocolo técnico (anexo 1). O Monitoramento decorreu de Abril de 2002 `a Abril de 2003.

3.1.1- Localização e Clima

O estudo foi conduzido na cidade de Maputo localizada a Sul do País, com uma superfície de 300km² e uma população de 1,058,833¹ habitantes com uma densidade populacional de 3530 hab/ km² .

A cidade tem como limites: o Distrito de Marracuene e Distrito de Muamba à Norte, Distrito de Matutuíne à Sul, Canal de Moçambique a Este e Sul e o Distrito de Namaacha à Oeste. Tem uma latitude de 25°58'19" e uma longitude de 32°34'55" (DINAGECA-toponomia, 2003).

O clima da área de estudo é tropical com duas estações distintas, uma chuvosa de Novembro à Abril e outra seca de Julho a Outubro (Barca e Santos, 2000). A temperatura média diária durante o decorrer do estudo variou de 15.8° C à 31.4° C, com uma precipitação média diária de 0.1mm à 34.6mm (dados colhidos no Instituto Nacional de Meteorologia, 2003).

¹ Esta população foi projectada para a cidade de Maputo, 2003 a partir do censo de 1997 (INE)

3.1.2- Economia e Ambiente

O vale do Infulene fica situado aproximadamente a 5km a Este da cidade de Maputo. A população é basicamente camponesa e vive em habitações precárias sem infra estruturas urbanas incluindo de saneamento.

É uma zona de grande actividade agrícola, tornando-se importante do ponto de vista económico. Os produtos cultivados são em grande parte vegetais consumidos crus, principalmente alface, além de diferentes legumes. No centro do vale corre o Rio Infulene que é de grande importância para a comunidade circunvizinha pois as suas águas são intensamente usadas para irrigação. Durante o percurso o rio sofre influência directa ou indirecta de vários factores, nomeadamente: descargas de águas poluídas por resíduos químicos da actividade industrial (produtos oleosos e sais), despejos domésticos (urina, material fecal, restos de alimentos, plásticos) e agrícolas e da estação de tratamento de águas residuais (ETAR), (Buuren, 1995).

A Baía de Maputo encontra-se encaixada entre o eixo da ilha de Inhaca, Cabo de Santa Maria e a cidade de Maputo (Direcção Nacional de Geografia e Cadastro - DINAGECA, 2003). Para a Baía drenam vários esgotos da cidade, resíduos da actividade industrial resultante da actividade do parque industrial distribuído pela cidade de Maputo, Matola e Machava, pois, as várias fábricas não possuem sistemas de tratamento das descargas e, portanto, estas águas residuais carregando substâncias químicas tóxicas são levadas directa ou indirectamente para a Baía de Maputo, resíduos da actividade artesanal e dos transportes (Porto e Caminhos de Ferro), resíduos domésticos de natureza orgânica como

microbiológica, das actividades comerciais e públicas, na Baía desaguam alguns rios ao longo dos quais se tem intensificado a actividade agro-pecuária (Inquérito sobre a poluição da Baía de Maputo, 1981- citado por Fernandes, 1995).

A Baía é muito frequentada por milhares de banhistas de todos extractos sociais que vão a praia do Costa de Sol, é também efectuada actividade de pesca á linha em algumas zonas e recolha de moluscos bivalves principalmente amêijoas para consumo.

Na cidade assiste-se a um rápido crescimento populacional e um grande desenvolvimento económico e industrial que inevitavelmente contribuem para o avolumar de problemas de poluição na orla costeira da cidade (Fernandes, 1995).

Portanto estes locais são áreas que indicam a existência de riscos para a disseminação do vibrião, representando um risco para a população servida.

O monitoramento dos alimentos (amêijoas) é feito em regiões de comércio de pescado (bairro de pescadores e em caso de falta os mercados). As amêijoas pertencem aos moluscos bivalves que se alimentam filtrando a água do mar, por isso têm a capacidade de filtrar consideráveis volumes de água e de reter nos seus tecidos, microrganismos patogénicos presentes no plankton ou no ambiente que os circunda. São muito consumidas pela população, existem em abundância e são um bom indicador da qualidade da água donde foram colhidas representando a presença de um perigo potencial para a saúde (Beucher et al., 1986, Moldan et al., 1989 - citado por Fernandes et al., 1993; Silveira Jr., s/d).

3.1.3- Origem de Esgotos que Drenam para à Baía de Maputo e Rios

O sistema de drenagem de águas residuais e pluviais que, na maior parte dos casos funciona em ligação, constituindo um sistema misto abrange fundamentalmente o Distrito Urbano nº 1, Bairros (Alto maé A e B, Coop, Central A, B e C, Malhangalene A e B, Polana cimento A e B e Summerschild). O funcionamento de ambos os sistemas é maioritariamente gravítico, existindo apenas duas estações de bombagem que conduzem parte das águas residuais para a estação de tratamento (ETAR) situada no Vale do Infulene. As restantes águas residuais e pluviais são conduzidas para a Baía de Maputo através de vários emissários nas zonas da Ponta Vermelha, Polana e Baixa da Cidade. Todas as restantes partes têm as suas águas residuais tratadas em fossas sépticas domiciliárias, sendo posteriormente lançadas na rede geral de esgotos e ou conduzidas à Baía ou descarregadas na toalha friática através de drenos.

Nos bairros sub urbanos com construções precárias, não existe praticamente sistema de drenagem.

Determinadas zonas da cidade, Polana Caniço, Barreiras do Maxaquene, Praça 16 de Junho, possuem valas de drenagem a céu aberto para escoamento das águas pluviais que são encaminhadas para o mar (Gabinete de Drenagem da cidade de Maputo, 1999).

3.2. AMOSTRAGEM

3.2.1. Locais de Amostragem

Para a amostragem da água de irrigação, foram utilizadas as seguintes zonas do Vale do Infulene:

Benfica - Ramal do Rio Infulene;

Estádio da Machava - Ramal do Rio Infulene;

Ponte - Vale do Infulene;

Vala de drenagem na região do Vale do Infulene, próximo da fábrica de cerveja

2M – água pluvial;

Saída da ETAR – água de esgotos.

3.2.2. Água do Mar:

Para a amostragem da água do mar e dos esgotos foram utilizadas as zonas.

Água da praia em frente ao Clube Marítimo (água do mar);

Água da praia no ponto da drenagem de esgotos na Mira mar (água do mar e esgotos);

Água da drenagem de esgotos na Ponta Vermelha (água do mar e esgotos);

Água da drenagem de esgotos na ponte do Ferri-Boat do lado de Maputo (água do mar e esgotos);

Água do mar em frente da Escola de Pesca na Matola (água do mar, Rio Matola).

3.3. AMOSTRA ESTUDADA

Para se atingir os objectivos formulados, durante os 12 meses de monitorização ambiental (de Abril de 2002 `a Abril de 2003), foram analisadas 280 amostras de diferentes tipos de água das quais 140 de água de irrigação (rio Infulene) e 140 de água do mar e esgotos e rio Matola e 42 amostras de amêijoas, colhidas em 42 visitas do campo.

3.3.1. Método de Colheita e Processamento das Amostras

3.3.1.2. Amostras de Água

Para a pesquisa de *Vibrio cholerae*, cada amostra foi sujeita ao método de processamento e identificação microbiológica convencional. Colheram-se 2 amostras de água em frascos de 1 litro esterilizados em cada fonte num total de 10 amostras por semana alternando, uma semana água do rio, na semana seguinte água do mar e esgotos durante um ano. Um dos frascos contendo 100ml de meio de enriquecimento Água Peptonada Alcalina (APA) concentrada 10 vezes, acrescidos de 900ml de água e foi processada pela técnica de cultura directa e outro contendo 1 litro de água pela técnica de membrana filtrante. As amostras foram colhidas entre as 8.30 horas e 10 horas para não retardar o processamento. Foram devidamente identificadas e transportadas em caixa térmica para manter a temperatura à volta de + 4° C e foram analisadas logo após á chegada ao laboratório, dentro de 4 horas (Manual de Microbiologia Alimentar- Ministério da Saúde, 1997).

3.3.1.3. Amostras de Amêijoas

Colheram-se 3 amostras de amêijoas por semana, alternadas com as águas, isto é na quinta semana durante um ano. As amostras foram tomadas ao acaso entre as vendedoras. A unidade de amostra foi fixada em 2 latas de 500grs e pesadas 25grs para a pesquisa, que é um peso padrão.

Todas as amostras após a colheita, foram acondicionadas individualmente em sacos de polietileno, devidamente identificadas e transportadas em caixa térmica à temperatura de + 4° C sendo analisadas, logo após a chegada ao laboratório dentro de 4 horas (Manual de Microbiologia Alimentar-Ministério da Saúde, 1997).

3.4. PERIODICIDADE DE RECOLHA

As amostras eram colhidas às Terças Feiras alternando, uma semana água do rio, a semana seguinte água do mar e esgotos, na terceira semana água do rio, na quarta semana água do mar e esgotos e na quinta semana os alimentos cujo processamento iniciou mais tarde.

3.5. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA E DE AMÊIJOAS

Todas as amostras colhidas eram processadas no LNHA, começando com o enriquecimento da amostra em água peptonada alcalina. Agitar para homogeneizar e incubar durante 6 ± 2 horas. O isolamento foi feito em meio selectivo de TCBS (thiosulfate-citrate-bile-salt-sucrose agar) durante 24h à 37° C e

as colónias isoladas foram identificadas por testes bioquímicos, API 20E, API 20 NE, testes serológicos e a prova de oxidase (Técnica descrita no anexo 1).

As estirpes de *Vibrio cholerae* ambiental foram conservadas em Agar Nutriente para processamento biotecnológico, no Instituto Superior de Saúde e no Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento na Universidade de La Sapienza (Itália). Esta identificação tinha como finalidade a comparação biomolecular com as estirpes isoladas dos doentes e identificação de factores de toxigenicidade.

Toda a informação acima referida, sobre a actividade de monitorização está disponível nos livros de registo do LNHA, com a excepção do resultado das estirpes enviadas para a Itália.

As espécies de bactérias identificadas, por local e data de colheita podem ser observadas no anexo 4.

3.6. OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES PARA O ESTUDO

3.6.1. Informação do Boletim Epidemiológico Semanal (BES) (Gabinete de Epidemiologia - MISAU e Direcção de Saúde da Cidade de Maputo), Sobre o Início de Casos Ocorridos de Cólera e a sua Evolução.

Será analisada a informação do BES para verificar se no período da eclosão do surto foi encontrado *Vibrio cholerae* no ambiente.

3.6.2. Informações Climáticas Durante o Período da Monitorização - Pluviosidade e as Temperaturas Médias Diárias (Instituto Nacional de Meteorologia, 2003).

Uma vez que se pretendeu isolar *Vibrio cholerae* no ambiente é conveniente fazer uma relação com os factores climáticos como a temperatura ambiente e a ocorrência de chuvas.

3.6.3. Inquérito Pré-elaborado, Através de Entrevistas aos Técnicos Envolvidos na Actividade para Identificar os Factores que Poderão Influenciar o Sistema de Monitorização.

Foi elaborado um questionário aberto para colher a percepção dos trabalhadores envolvidos na actividade de monitorização (anexo 7).

3.7. TIPO DE ESTUDO

O estudo foi descritivo e retrospectivo com recolha de informação a partir dos livros de registo do LNHAU utilizado para o sistema de monitorização (anexo 3).

3. 8. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

A informação recolhida foi processada com recurso ao pacote estatístico STATA INTERCOOLED 8 utilizando o teste T- student onde foram calculados os valores de P para verificar se há diferenças estatisticamente significativas da presença ou não de *Vibrio cholerae* em relação aos casos clínicos, a temperatura ambiente e a precipitação.

3.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi realizado de modo a obedecer às boas práticas éticas como sejam obtenção prévia duma autorização da Direcção do LNHAH através de um pedido formal ao Director do LNHAH para autorização da recolha dos dados e acesso às outras informações relevantes para este estudo. O processamento dos dados foi feito tendo sempre em conta as regras mais rigorosas de sigilo. A divulgação pública dos resultados deste estudo só será feita com a autorização do MISAU após a apresentação dos mesmos na defesa da tese de Mestrado em Saúde Pública. O relatório será fornecido ao LNHAH e a publicação do trabalho irá carecer da autorização do LNHAH.

4. RESULTADOS

Foram colhidas 280 amostras de água, das quais 140 de água de irrigação (rio) e 140 de água do mar e esgotos. Para além disso foram analisadas 42 amostras de amêijoas. Podemos verificar na tabela 1 o isolamento de *Vibrio cholerae* no ambiente, a difusão dos casos clínicos diagnosticados, a temperatura e precipitação média semanal.

TABELA 1: Isolamento de *Vibrio cholerae* nas amostras colhidas em cada visita de campo relacionado com os casos clínicos diagnosticados, à temperatura ambiente e à precipitação

Semana de estudo	<i>Vibrio cholerae</i>	casos clínicos	Temperatura	Precipitação	ano
1	ausente	47	25.6	0	2002
2	ausente	34	23.1	1	2002
3	ausente	40	23.9	0	2002
4	ausente	26	20.4	0	2002
5	ausente	20	22.4	0	2002
6	ausente	9	23.5	0	2002
7	ausente	9	20.7	0.1	2002
8	presente	7	20.1	0.2	2002
9	presente	6	19.7	0	2002
10	presente	5	18.9	0.4	2002
11	ausente	0	18.3	0	2002
12	ausente	0	19.5	0	2002
13	ausente	0	17.2	0.6	2002
14	ausente	0	21.6	0	2002
15	ausente	0	18.7	1.9	2002
16	ausente	0	21	0	2002
17	ausente	2	19.8	0	2002
18	ausente	2	21.5	0.1	2002
19	ausente	6	23.2	0	2002
20	ausente	3	21.1	1	2002
21	ausente	4	22.8	0	2002
22	ausente	16	24	0	2002
23	ausente	3	23	5.6	2002
24	ausente	9	22.8	1.2	2002
25	ausente	6	23.2	0.7	2002
26	ausente	0	22.6	0	2002
27	ausente	2	25.6	0.7	2002
28	ausente	2	25.1	1.4	2002
29	ausente	0	24.5	1.1	2003
30	ausente	0	28.6	0.1	2003
31	ausente	0	26.5	2	2003
32	presente	0	27.4	0.6	2003
33	presente	103	27	2.1	2003
34	presente	169	26.4	2.4	2003

Semana de estudo	<i>Vibrio cholerae</i>	Casos clínicos	Temperatura	Precipitação	Ano
35	ausente	241	25.7	2.8	2003
36	presente	327	26.5	0.1	2003
37	ausente	316	28.3	0	2003
38	ausente	266	24.9	2.5	2003
39	ausente	298	26.1	0.5	2003
40	ausente	294	24.7	0.7	2003
41	ausente	290	23.5	0.8	2003
42	ausente	256	24.5	0	2003

Tab. 1 – Tabela desmembrada em secções

A análise estatística da informação da tabela I permitiu concluir :

a) em relação aos casos clínicos

Não há diferença significativa entre os casos clínicos de cólera encontrados quando na água se isola *Vibrio cholerae* e os casos clínicos de cólera encontrados quando na água não se isola *Vibrio cholerae* ; $P = 0.3065$

b) em relação à temperatura

Não há diferença significativa entre o isolamento de *Vibrio cholerae* nas diferentes amostras testadas e a variação da temperatura ambiente; $P = 0.4995$

c) em relação à precipitação

Não há diferença significativa entre o isolamento de *Vibrio cholerae* nas diferentes amostras testadas e a variação da precipitação; $P = 0.7537$

Das amostras analisadas foram isolados no total 14 *Vibrio cholerae* não 01 (não tipificáveis, não aglutináveis com anti soro polivalente 01), dos quais 12 *Vibrio cholerae* foram isolados na água e 2 *Vibrio cholerae* em alimentos.

Além de *Vibrio cholerae* foram isoladas outros *Vibrio* a saber:

- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Vibrio alginolyticus*
- *Vibrio fluvialis*
- *Vibrio mimicus*
- *Vibrio hollisae*
- *Vibrio metschnikovii*

e outras espécies tais como:

- *Aeromonas* spp.
- *Aeromonas hydrophila/caviae*
- *Sphingomonas paucimobilis*
- *Aeromonas salmonocida*
- *Aeromonas sobria*
- *Sphingobacterium multivorum*
- *Pseudomonas fluorescens/putida*
- e *Listonella dansela* (tabela V)

4.1- Avaliação da Qualidade de Identificação das Bactérias Isoladas Através do Meio Selectivo TCBS nos Locais do Estudo

As tabelas de II a VI abaixo indicadas, mostram o número de espécies de bactérias isoladas nos locais de estudo em cada fonte incluindo o resumo das 3 fontes (água do mar e esgotos, água do rio e amêijoas) e o total das espécies

isoladas em relação ao número de *Vibrio cholerae* detectados no Mar e esgotos, no Rio e amêijoas.

Tabela II – Espécies de bactérias isoladas em amostras de água do Mar, Esgotos e nas águas semi-salgadas do Rio Matola por local de estudo

Lista das espécies de bactérias isoladas	Água do Mar, Esgotos e Água do Rio Matola					Total
	Locais de estudo					
	1	2	3	4	5	
<i>Aeromonas spp.</i>	12	16	16	14	8	66
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	0	5	5	9	2	21
<i>Vibrio alginolyticus</i>	8	1	1	0	3	13
<i>Vibrio fluvialis</i>	2	3	1	3	3	12
<i>Vibrio cholerae</i> não 01	0	3	3	2	0	8
<i>Aeromonas sobria</i>	0	1	1	5	0	7
<i>Vibrio mimicus</i>	1	1	0	0	1	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	1	1	1	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Listonella dansela</i>	0	0	0	0	2	2
<i>Vibrio hollisae</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	0	0	0	0	1	1
Total	25	30	29	34	22	140

Legenda: Local de estudo 1 – Clube Marítimo (água do mar)

Local de estudo 2 – Mira Mar (água do mar + água de esgoto)

Local de estudo 3 – Ponta vermelha (água de esgoto + água do mar)

Local de estudo 4 – Ponte – Travessia de Ferri-Boat (água de esgoto + água do mar)

Local de estudo 5 – Rio Matola (água do rio semi-salgada)

Durante o estudo foram detectados 8 estirpes de *Vibrio cholerae* na água do mar + água de esgotos, não tendo sido isolado na água do mar (no clube marítimo) e do rio Matola de acordo com os locais de estudo.

Em termos de espécies isoladas no rio Matola foram detectadas 9 espécies diferentes de microrganismos, seguido do mar + água de esgotos com 8 espécies.

Na água do mar apenas se isolaram 5 espécies.

Tabela III – Espécies de bactérias isoladas em amostras de água do Rio Infulene por local de estudo

Água do Rio Infulene						
Lista das espécies de bactérias isoladas	Locais de estudo					Total
	1	2	3	4	5	
<i>Aeromonas spp.</i>	17	12	12	16	16	73
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	6	11	7	8	8	40
<i>Vibrio fluvialis</i>	2	9	6	2	5	24
<i>Vibrio mimicus</i>	1	2	1	1	0	5
<i>Vibrio cholerae</i> não 01	0	0	2	0	2	4
<i>Aeromonas sobria</i>	1	0	1	0	1	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	1	0	1	2
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	1	0	0	0	2
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0	1	0	0	0	1
Total	29	37	30	27	33	156

Legenda: Local de estudo 1 – Benfica – Ramal do Rio Infulene
 Local de estudo 2 – Estádio da Machava – Ramal do Rio Infulene
 Local de estudo 3 – Ponte – Rio no Vale do Infulene
 Local de estudo 4 – Vala de drenagem próximo a fábrica 2M
 Local de estudo 5 – ETAR (estação de tratamento de águas residuais)

Foram detectados 4 *Vibrio cholerae* não 01 na água do rio para além de outras espécies dos quais 2 *Vibrio cholerae* não 01 na água da ETAR que também é muito usada para irrigação de hortícolas.

Tabela IV – Espécies de bactérias isoladas em amostras de alimentos (amêijoas) por local de estudo

Lista das espécies de bactérias isoladas	Amêijoas			Total
	Locais de estudo			
	1	2	3	
<i>Aeromonas spp.</i>	8	7	7	22
<i>Vibrio alginolyticus</i>	4	3	5	12
<i>Vibrio fluvialis</i>	1	2	2	5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1	2	4
<i>Vibrio cholerae</i> não 01	0	1	1	2
Total	14	14	17	45

Legenda: Local de estudo 1 – Xefina
 Local de estudo 2 – Macaneta
 Local de estudo 3 – Maputo

Foram detectados 2 *Vibrio cholerae* em amêijoas.

Tabela V – Resumo (Frequências relativas das espécies de bactérias na água do Mar e esgotos, água do Rio e Amêijoas)

Lista das espécies de bactérias isoladas	Resumo			Total	%
	Mar e Esgotos, Rio Matola	Rio Infulene	Amêijoas		
<i>Aeromonas spp.</i>	66	73	22	161	47.2
<i>A. hydrophila/caviae</i>	21	40	0	61	17.9
<i>Vibrio fluvialis</i>	12	24	5	41	12.0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	13	1	12	26	7.6
<i>Vibrio cholerae não 01</i>	8	4	2	14	4.1
<i>Aeromonas sobria</i>	7	3	0	10	2.9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	2	4	8	2.3
<i>Vibrio mimicus</i>	3	5	0	8	2.3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	0	0	3	0.9
<i>Vibrio metschnikovii</i>	0	2	0	2	0.6
<i>Listonella dansela</i>	2	0	0	2	0.6
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0	1	0	1	0.3
<i>Vibrio hollisae</i>	1	0	0	1	0.3
<i>Pseud. fluorescens/putida</i>	1	0	0	1	0.3
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0	1	0	1	0.3
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1	0	0	1	0.3
Total	140	156	45	341	100

O *Vibrio cholerae* não 01 (não tipificáveis, não aglutináveis com anti soro polivalente 01) apresenta uma frequência de 4.1% em relação ao total das espécies bacterianas isoladas.

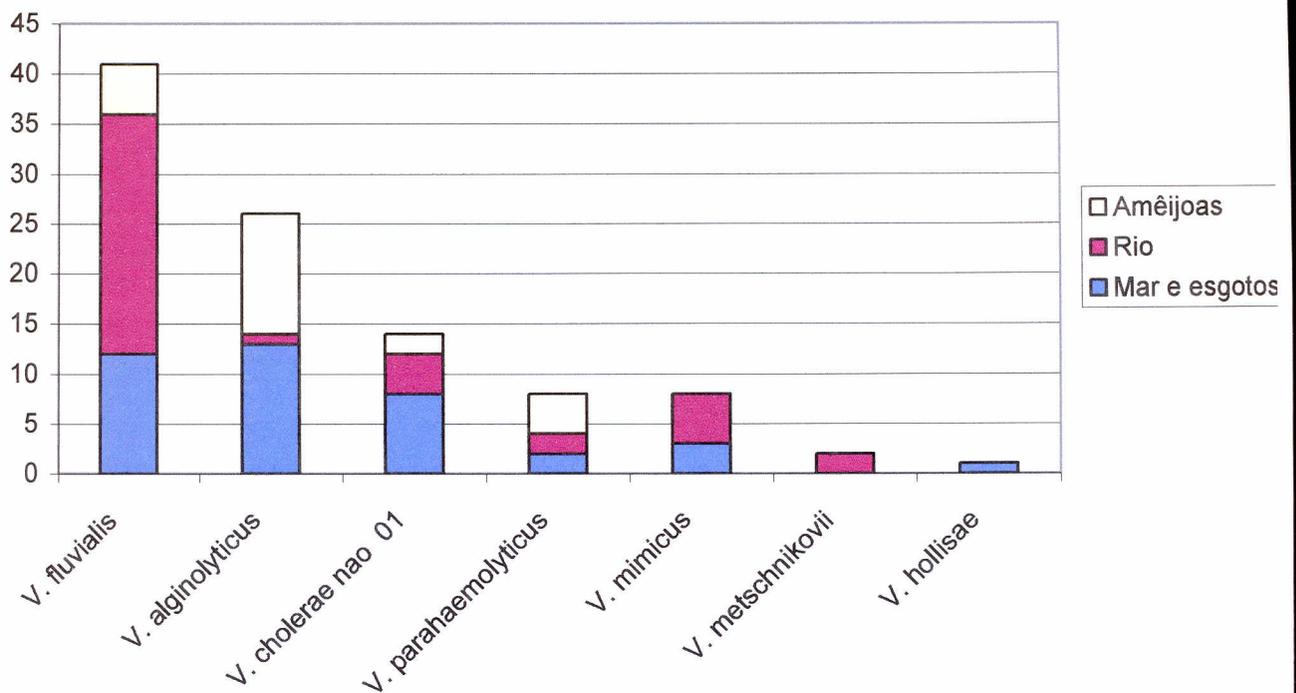


Figura nº1 – Comportamento das estirpes de *Vibrio* isoladas em termos de quantidade por local de amostragem

O número total das estirpes mais abundantes foram: 41 *Vibrio fluvialis*, seguido de 26 *Vibrio alginolyticus*, 14 *Vibrio cholerae* não 01 e 8 *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio fluvialis* é mais predominante na água do rio enquanto que *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio cholerae* não 01 são mais abundantes na água do mar e esgotos.

Vibrio hollisae só foi encontrada na água do mar e esgotos e *Vibrio metschnikovii* só foi detectado na água do rio.

Nas amêijoas foi encontrado *Vibrio alginolyticus* como a estirpe mais abundante

Tabela VI- Resumo das espécies de *Vibrio* detectadas e suas frequências

Espécies	Quantidade	%
<i>V. fluvialis</i>	41	41
<i>V. alginolyticus</i>	26	26
<i>V. cholerae</i> não 01	14	14
<i>V. parahaemolyticus</i>	8	8
<i>V. mimicus</i>	8	8
<i>V. metschnikovii</i>	2	2
<i>V. hollisae</i>	1	1
Total	100	100

A percentagem de *Vibrio cholerae* não 01 (não tipificáveis, não aglutináveis com anti soro polivalente 01) em relação ao género *Vibrio* foi de 14.

4.2- Determinação da relação existente entre as frequências de *Vibrio cholerae* no ambiente e as estações climáticas

A tabela VII refere-se a frequência de *Vibrio cholerae* não 01 (não tipificáveis, não aglutináveis com anti soro polivalente 01) na época seca e na época chuvosa

Tabela VII - Razão amostragens/ frequência de *Vibrio cholerae* por estação do ano nos locais de estudo.

Estação	Mar e Esgotos	Rio	Amêijoas	Total %
Seca	36.4 %	22.2 %	0.0 %	22.2 %
Chuvosa	100.0 %	40.0 %	28.6 %	53.3 %
Total	57,1 %	28.6 %	14.3 %	33.3 %

Esta tabela significa que: a probabilidade média de se isolar 1 *Vibrio cholerae* numa amostragem na época chuvosa é de 100% na água do mar e 40% na água

do rio, enquanto que na época seca é de 36.4% contra 22.2% e a probabilidade média de se isolar 1 *Vibrio cholerae* numa amostragem sem ter em conta as estações é de 33.3%. Outras informações na tabela em anexo 6.

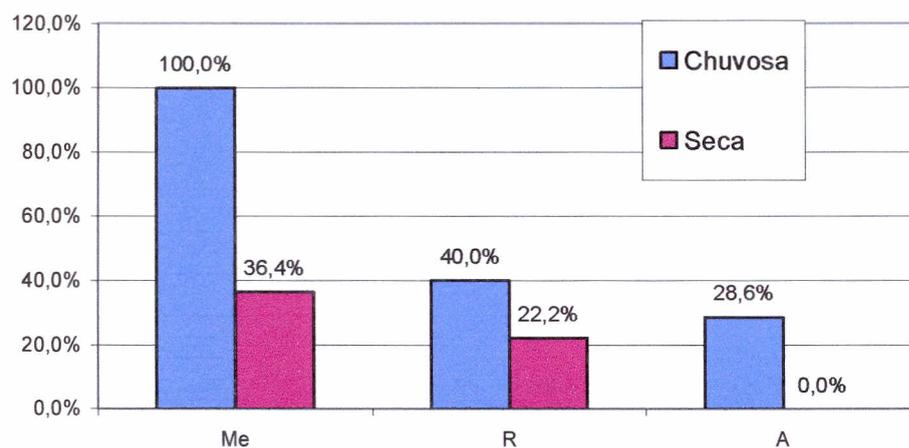


Figura 2: - Razão amostragens/ frequência de *Vibrio cholerae* não 01 (não tipificáveis, não aglutináveis com anti soro polivalente 01) por estação do ano nos locais de estudo.

Legenda: - Água do mar e esgotos (ME) ;
Água do rio (R);
Amêijoas (A)

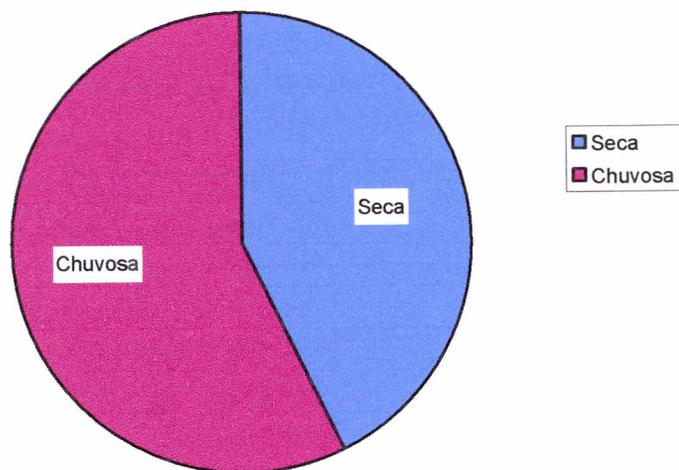


Figura 3: Frequência de *Vibrio cholerae* não 01 (não tipificáveis, não aglutináveis com anti soro polivalente 01) por estação do ano

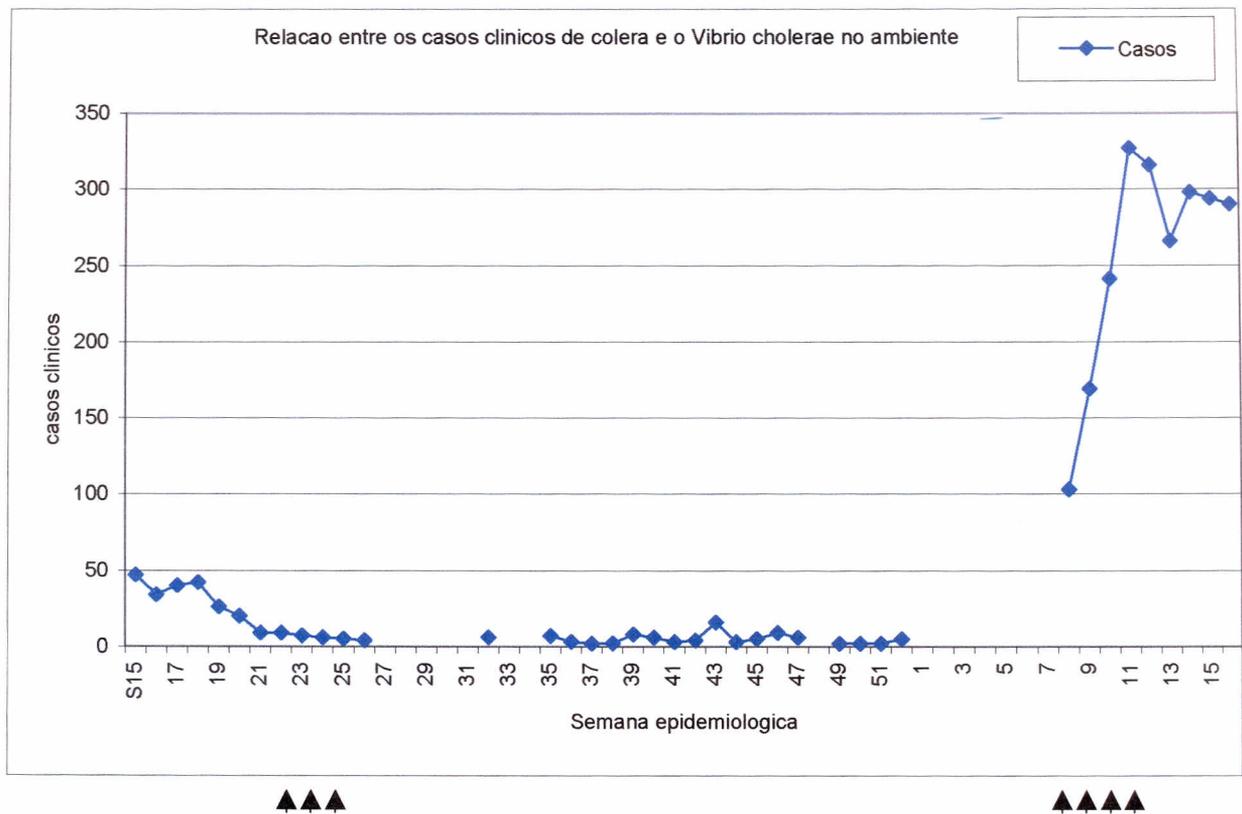
A tendência sazonal mostra que na estação chuvosa (época quente), que vai de Novembro `a Abril, há relativamente maior prevalência de *Vibrio cholerae* do que na estação seca (época fria) como mostra à figura 2 e 3.

4.3 – Relação da ocorrência de casos clínicos de cólera com a frequência de *Vibrio cholerae* no ambiente

Tabela VIII – Isolamento de *Vibrio cholerae* no ambiente e o número de casos clínicos

Semana de estudo	Semana epidemiológica	Presença de <i>Vibrio cholerae</i> não 01	N ^o de casos clínicos
De 02 à 08-06-02	23	3	7
De 09 à 15-06-02	24	2	6
De 16 à 22-06-02	25	1	5
De 09 à 15-02-03	7	2	0
De 16 à 22-02-03	8	2	103
De 23 à 28-02-03	9	2	169
De 09 à 15-03-03	11	2	327

Na maioria das semanas em que houve isolamento no ambiente, durante o período de estudo foram reportados casos clínicos como ilustra a figura à seguir.



23, 24, 25 ← semanas de isolamento do *Vibrio cholerae* não 01 no ambiente → 7, 8, 9, 11

Figura 4: Relação entre o isolamento de *Vibrio cholerae* não 01 (não tipificáveis, não aglutináveis com anti soro polivalente 01) no ambiente e os casos clínicos de cólera

4.4 – Comparação das Frequências de *Vibrio cholerae* na Água do Mar e Esgotos e na Água do Rio

Tabela IX – Número de *Vibrio cholerae* e suas respectivas frequências na água do Mar e Esgotos e na água do Rio

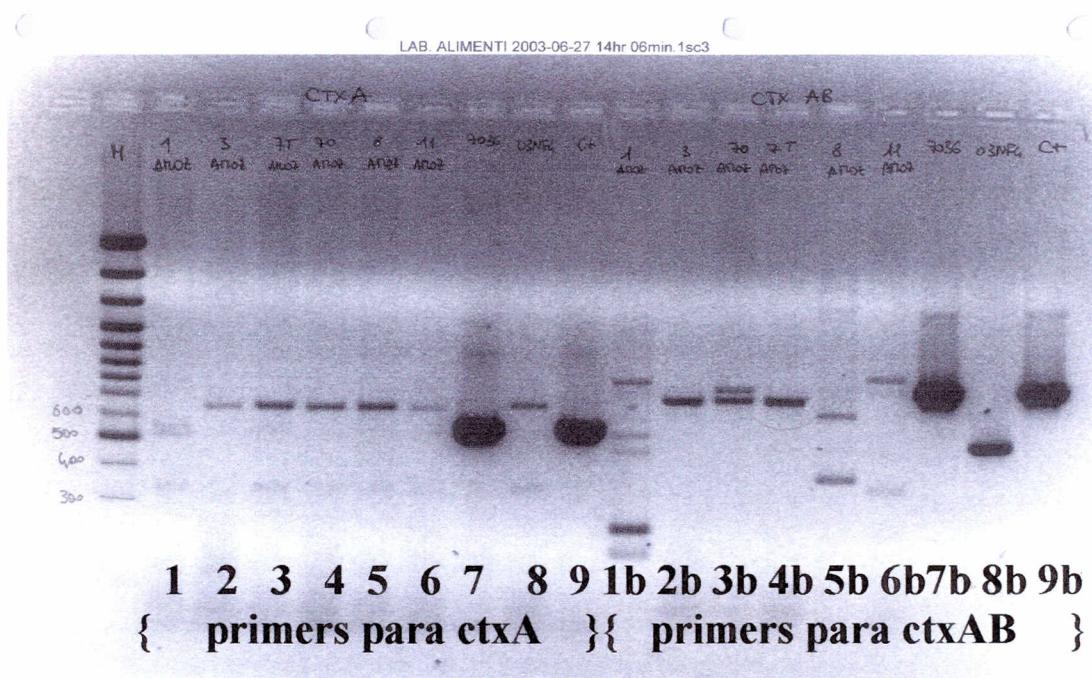
Tipo de amostra	Nº de <i>Vibrio cholerae</i>	Proporção de amostras contaminadas
Água do Mar e Esgotos (n= 140)	8	66.67 %
Água do Rio (n=140)	4	33.33%
Total	12	100 %

A água do mar e esgotos apresenta maior contaminação.

Testes Moleculares

As estirpes submetidas a testes moleculares de toxigenicidade por PCR do gene da toxina CTX revelaram-se não toxigênicas (figura abaixo)

Testes usando a técnica de PCR da presença dos determinantes genéticos *ctxA* e *ctxAB* da toxina CTX nas estirpes de *Vibrio* isoladas no ambiente



- 1, 1b: *V. parahaemolyticus* ambiental
- 2, 3, 4, 5, 6, 8, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 8b: *V. cholerae* ambiental
- 7, 9, 7b, 9b: *V. cholerae* clínicos de controlo positivo

As estirpes ambientais resultaram não toxigénicas em comparação com as estirpes de isolamento clínico (7, 9, 7b, 9b)

Fig. B Testes moleculares usando a técnica de PCR

1.5 – Identificação dos Factores que Poderão Influenciar o Sistema de Monitorização na Óptica dos Trabalhadores do Laboratório

Respondendo ao questionário, em relação a 1ª questão (relação entre as estirpes isoladas e a ocorrência de surtos), dos 6 inquiridos 1 não respondeu e 5 disseram que sim, uma vez que no período em que decorreu a actividade houve isolamento do vibrião no ambiente e a eclosão de surto.

2ª questão (Se é importante o sistema de monitorização), todos responderam que sim por várias razões:

- Dá-nos o conhecimento da existência da circulação de *Vibrio cholerae* no ambiente
- Permite a identificação das diferentes estirpes
- Irá permitir melhor planificação e melhor gestão de recursos financeiros, humanos e materiais
- É um sinal de alerta para a eclosão de um possível surto de cólera
- Ajuda na tomada de medidas preventivas

3ª questão (Factores que contribuíram para a falta de cumprimento das actividades pré estabelecidas no sistema)

- Falta de transporte, por avaria da viatura, falta de combustível e revisão da viatura
- Falta de material de vidraria
- Alguns meios de cultura chegaram muito depois de ter iniciado o programa (soros para identificação, API 20 E)

- Falta de água da rede no Laboratório

4ª questão (Se é possível manter o sistema como actividade de rotina), todos afirmaram que sim porque:

- Para fortalecer o sistema de vigilância de modo `a prevenir eventuais epidemias
- Para definição de áreas e focos de maior risco
- Melhor planificação das actividades de prevenção
- Para ver se há relação entre a ocorrência de surtos de cólera e a sobrevivência da estirpe no meio ambiente

Sugestões:

- Antes do início da actividade devem-se criar todas as condições logísticas para o melhor sucesso do trabalho
- Estender o estudo para o País inteiro (deve ser um programa Nacional)
 - Disponibilidade de transporte, material e meios de cultura só para esta actividade.

5. DISCUSSÃO

A tabela I mostra-nos a presença e ausência de *Vibrio cholerae* no ambiente e as condições climáticas em que o isolamento ocorreu em relação à temperatura e à precipitação. Mostra ainda os casos clínicos de cólera diagnosticados durante o decorrer do estudo.

As amostras foram colhidas em 42 semanas não consecutivas e *Vibrio cholerae* foi detectado 7 vezes e esteve ausente 35 vezes no ambiente. O maior número de isolamentos ocorreu na época quente (temperaturas acima de 20° C) e chuvosa. Este resultado poderá não ser significativo mas dá-nos uma ideia do nível de poluição das águas e das amêijoas pois indica um meio ambiente apropriado para o crescimento de *Vibrio cholerae* e a capacidade do meio em facilitar a sua rápida reprodução. Esta tabela irá reforçar mais adiante as figuras 2, 3 e 4.

Das 16 espécies de bactérias isoladas no estudo as espécies de *Vibrio* mais encontradas e as suas respectivas frequências resumidas nas tabelas V e VI podem ser comparadas com os resultados do estudo efectuado por Barbieri, 1999, sobre a ocorrência, diversidade e patogenezidade de espécies de *Vibrio* halofílicos e *Vibrio cholerae* não 01 na água de estuários ao longo da costa Adriática Italiana onde as espécies predominantes foram *V. alginolyticus*, seguido de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* não 01 e *V. vulnificus*, embora esta última espécie não tenha sido detectada no nosso ambiente, provavelmente devido à razões ecológicas. Em termos de espécies encontradas o estudo pode ser considerado semelhante. Em relação ao *V. cholerae* não 01 foram isolados 9, número inferior ao nosso que foi de 14 *V. cholerae* não 01 (não tipificáveis).

Fazendo uma avaliação da qualidade da água do mar e esgotos, água do rio e das amêijoas onde se incluem as tabelas II, III e IV resumidas na tabela V a percentagem de *V. cholerae* não 01 (não tipificáveis) em relação ao total das espécies de bactérias isoladas foi de 4.1% mas dentro do género *Vibrio* foi de 14% (tabela VI) sendo superior quando comparado ao estudo de Barbieri que foi de 8.7%.

Na tabela V o maior número de espécies de *Vibrio* incluindo *V. cholerae* foram detectados na água do mar e esgotos, como ilustra a figura 1 e pode ser justificado pelo facto da prevalência de *Vibrio* ser influenciada por factores físico-químicos do ambiente. De acordo com a literatura *V. cholerae* é um microrganismo halotolerante que cresce estimulado pelo sódio e sobrevive num amplo intervalo de salinidade e pH. A água do mar serve de maior reservatório para a multiplicação de *V. cholerae* embora o número isolado tenha sido inferior em relação ao isolado na água do esgoto o que pode ser possível pois a água do mar é mais diluída e sofre influência das marés. Quanto ao esgoto a água tem geralmente o mesmo fluxo, é mais concentrada, o ambiente é mais parado associado ao plankton um dos habitat preferenciais da bactéria e por isso a carga bacteriana é maior. Um estudo realizado por Madico, 1996, no Peru sobre a vigilância activa de *V. cholerae* na água do esgoto como uma ferramenta potencial em predizer surtos de cólera das 780 amostras colhidas, em 69 foram encontradas *V. cholerae* 01 correspondente a 9%.

Na água do rio encontramos 4 *V. cholerae*, número inferior à água do mar e esgotos, contudo *V. cholerae* não 01 pode ser normalmente mais encontrado na

água do rio de acordo com , Islam, 1994 e Uchiyama, 1998. Possivelmente uma maior amostragem levaria a um maior número de isolamentos mas apesar do número detectado ter sido reduzido isto indica a existência de riscos para a população uma vez que a água do rio Infulene é usada na irrigação das hortícolas. As estirpes de *V. cholerae* 01 e 0139 são as que produzem toxinas e as responsáveis pelas epidemias de cólera. Embora haja ausência da toxina colérica nas estirpes de *V. cholerae* por nós isoladas elas têm habilidade de causar diarreia por mecanismos inteiramente diferentes que as estirpes toxigénicas (Soumen, 2000; Singh, 2001).

Em amêijoas foram detectados 2 *V. cholerae* mas este resultado representa um perigo para a saúde associada ao consumo de produtos do mar, se olharmos para a figura 1 *V. parahaemolyticus* é mais encontrado nas amêijoas e é uma bactéria patogénica associada as gastroenterites. Este resultado em comparação com o estudo de Heath, 2002, sobre a ocorrência de *Vibrio* patogénicos nas áreas costeiras da França, no mar estuários e mexilhões, confirma os resultados deste autor que no seu estudo foram detectados 3 *V. cholerae* não 01 em mexilhões, um *Vibrio* a mais que no nosso estudo. Croci, 2000, no estudo sobre a detecção de *Vibrio* em mexilhões e na água do mar foram detectados 4 *V. cholerae* não 01, número inferior ao encontrado por nós.

Na tabela VII, a proporção do isolamento de *V. cholerae* nas duas estações seca (fria) e chuvosa (quente), é maior na época chuvosa o que é confirmado pela literatura que mostra que o aumento da temperatura resulta no aumento da concentração da espécie de *V. cholerae*. Os resultados desta tabela indica-nos

que a probabilidade média para se encontrar 1 *V. cholerae* numa amostragem na época seca é de 22% e na época chuvosa é de 53% e a probabilidade média de se isolar *V. cholerae* sem ter em conta as estações é de 33%. Em todos ambientes (mar e esgotos, rio e amêijoas) a probabilidade é maior na época chuvosa podendo-se concluir que é mais fácil de se isolar a bactéria na época chuvosa, sendo mais abundante. Esta probabilidade pode ser um indicativo do grau de tolerância dependendo do ambiente ser ou não favorável e o resultado é mais coerente com a saúde pública. Podemos completar a análise desta tabela com a tabela VIIa em anexo 6 onde podemos observar o número de amostragens realizadas para cada tipo de amostra nas duas épocas e a proporção do isolamento, o que significa o número de amostragens necessárias para se conseguir isolar *V. cholerae* num local e numa estação, por exemplo: para encontrar 1 *V. cholerae* na água do rio na época seca precisaríamos de ir 5 vezes ao campo e na época chuvosa precisaríamos de ir 3 vezes. Assim, na época seca precisaríamos de ir várias vezes ao campo para encontrar *V. cholerae*. Para a água do mar e esgotos na época seca precisaríamos de 3 amostragens para isolar *V. cholerae* e na época chuvosa 1 vez. As figuras 2 e 3 ilustram claramente que o número total dos isolamentos foi maior na época chuvosa. O que é curioso nestes resultados é que em amêijoas na época seca e fria não foi isolado nenhum *V. cholerae*.

A figura 2 mostra esta proporção e na figura 3 confirma-se que na estação chuvosa houve mais isolamentos. Portanto esta figura também pode ser interligada com a tabela I. e VII.

As temperaturas frias induzem a bactéria a um estado de choque (stress). O aparente desaparecimento da espécie em ambientes aquáticos tornam os microrganismos com habilidade de entrar num estado de dormência isto é sem replicação mas que continuam infecciosos ou seja retêm a sua virulência; nesse estado, são chamadas de formas viáveis mas não cultiváveis (Madico et al., 1996; Desmarchelier, 1997; Faruque, 1998; Uchiyama 1998; Croci, 2000; Wiewel, 2001; Colwell, 2000; Heath et al., 2002). Outros factores que induzem a mudança para este estado são a luz e falta de nutrientes podendo não manter uma população estável (Faruque, 1998; Vibriosis, 1999; Rivera et al., 2001). Esta resposta de sobrevivência ao stress é resultante das mudanças das condições ambientais. Em relação ao factor temperatura apesar da média ser relativamente maior em presença de *V. cholerae* 23.7° C contra 22.8° C na ausência, onde não há diferença estatisticamente significativa, P=0.4995 o que contrasta com o estudo de Barbieri, 1999, que encontra uma correlação positiva entre a ocorrência de *V. cholerae* e a temperatura, P= 0.018. Na época chuvosa e quente, quando a precipitação é elevada pode haver redução de isolamento devido a diluição e consequentemente menor concentração de patogénicos incluindo *V. cholerae* em ambientes aquáticos (Pascual, 2002). Mas depois de chuvas intensas, cheias ou seca devido ao uso de água não tratada e más condições sanitárias a chuva pode ser um factor que influencia a eclosão da cólera. No nosso estudo a média da pluviosidade em presença de *V. cholerae* foi de 0.82 mm, o que não considero elevada contra 0.67 mm na ausência, esta diferença não é estatisticamente significativa, P=0.7537. O estudo nos diferentes locais e nos 3 ambientes não foi

feito durante as 52 semanas do ano por razões diversas (avaria da viatura, falta de água no laboratório, chuvas intensas). Nas 10 semanas em que não se foi ao campo se houvesse possibilidade de ir isso poderia contribuir para uma melhoria dos resultados.

Interpretando a figura 4 o comportamento do gráfico sugere uma tendência de endemecidade da doença, em que houve dois períodos epidémicos. Na quarta semana depois do primeiro surto foi detectado *V. cholerae* na água (nas semanas 23, 24 e 25 -2002), depois passou-se um período em que a notificação dos casos foi controlada aparecendo um ou outro caso (período endémico da semana 27-2002 `a semana 05-2003) onde não houve isolamento no ambiente. De acordo com Codeço, 2001, a cólera endémica pode-se manter na ausência de reservatório ambiental permanente principalmente em algumas regiões Africanas onde as condições são pobres. De repente houve uma grande explosão do número de casos de doença que consideramos segundo período epidémico em que isolamos *V. cholerae* na água e alimentos, (nas semanas 7, 8, 9 e 11). Esta parte do gráfico sugere-nos que a explosão dos casos pode estar associada a um outro factor uma vez que não temos a certeza que os casos clínicos estão relacionados com aquelas fontes ou áreas de estudo, provavelmente uma pesquisa na fonte de consumo de água dos doentes notificados mostraria um resultado mais representativo. Contudo o resultado sugere uma colonização ambiental permanente com picos epidémicos coincidentes com o isolamento de *V. cholerae* não 01 no ambiente. Isto é uma evidência indirecta da presença de *V.*

cholerae 01 no ambiente uma vez que existe uma correlação entre o *V. cholerae* 01 e o *V. cholerae* não 01

Segundo os resultados do método de PCR realizados em Itália a maior parte destas estirpes do ambiente revelaram-se não toxigénicas porém indicam condições favoráveis para a difusão de *Vibrio*. Este resultado está de acordo com a literatura, em que a maioria das espécies de *V. cholerae* 01 isoladas do ambiente não produzem a toxina colérica mas contudo o papel da água é importante na transmissão e epidemiologia da cólera (Minami et al., 1991; Faruque et al., 1998; Singh et al., 2001) pois poderá existir uma associação entre a estirpe patogénica e a não patogénica. A figura 4, confirma o resultado da tabela VIII.

Olhando para a tabela IX, observamos as percentagens de *V. cholerae* por tipo de amostra verificando-se que a frequência maior de isolamentos foi na água do mar e esgotos, seguido da água do rio. Este resultado pode ser interligado às tabelas II, III e IV. No nosso estudo não foram determinados os factores físico-químicos em particular o intervalo de pH e o grau de salinidade que são parâmetros que contribuem para o aumento do número de *Vibrio* detectáveis sendo a salinidade um indicador útil; é reportado em vários estudos que esses factores influenciam o crescimento, a sobrevivência, a replicação e a distribuição de *V. cholerae* em ambientes aquáticos (Islam, 1994; Siddique et al., 1996; Desmarchelier, 1997; Barbieri, et al., 1999; Vimont, et al., 2000; Jiang et al., 2001, NCID, s/d; Louis, et al., 2003).

Vários estudos efectuados, reportam que as variações sazonais da doença coincidem com flutuações de pH e grau de salinidade contribuindo estes factores para o aumento do número de *Vibrio* detectáveis no ambiente (Islam, 1994; Desmarchelier, 1997; Jiang et al., 2001; Pascual, 2002; Louis et al., 2003; Newsletters s/d). Assim, para se investigar a relação entre as mudanças climáticas e a incidência da cólera é necessário examinar sistematicamente os parâmetros físico-químicos e biológicos pois eles constituem uma valiosa informação para se entender a ecologia de *V. cholerae*. Caso esta monitorização de *V. cholerae* no ambiente seja continuada em Moçambique de futuro os parâmetros físico-químicos devem ser medidos.

Durante o período de estudo foram confirmadas estirpes de *V. cholerae* 01 a partir de doentes hospitalizados nas tendas 001 da cidade e Província de Maputo (anexo 5). Este dado poderá suportar ou confirmar a presença de surto associado a tabela VIII e a figura 4.

Este estudo, apesar de ter sido realizado durante apenas 1 ano mostra que o sistema de monitorização é muito importante do ponto de vista de vigilância epidemiológica. Com a implementação deste sistema foram isoladas estirpes de *V. cholerae* nao 01 (não tipificáveis) em correlação com surtos epidémicos o que anteriormente, em amostragens ocasionais mesmo em presença de epidemia, nunca foi isolado. Isto indica condições ambientais próprias para o desenvolvimento de estirpes de *Vibrio* toxigénicos.

Apesar da percentagem do isolamento de *V. cholerae* ter sido baixa, poderemos ter em conta alguns aspectos: de acordo com a literatura o método de cultura

(convencional) utilizado pode não detectar *Vibrio*, mas estes podem permanecer na água por longo tempo assumindo a forma viável mas não cultivável em presença de condições desfavoráveis para o crescimento e reprodução que levam a bactéria a entrar num estado de dormência ou em stress, até que as condições se tornem apropriadas a que elas revertam ao estado cultivável (Islam, 1994; Kaper et al., 1995; Siddique et al., 1996; Desmarchelier, 1997; Uchiyama, 1998; Lowenhanpt, 1998; Faruque et al., 1998; Croci et al., 2000; Wiewel, 2001; Colwell, 2000). Contudo outros problemas encontrados com o método são: perda da viabilidade da bactéria depois da colheita da amostra, dificuldade de isolamento em amostras biocontaminadas, presença de grande quantidade de matéria orgânica, o tempo requerido para cultura e confirmação que leva vários dias. Para evitar estes problemas diferentes métodos baseados em biologia molecular têm sido desenvolvidos com base na amplificação do DNA, sendo mais rápidos e sensíveis embora caros (Pilz et al., s/d; Theron et al., 2000). Nas nossas condições o uso do método de cultura (convencional) é o mais viável por razões de custos e sustentabilidade embora a biologia molecular esteja a ser introduzida no País. O método de cultura é um método aceitável, está em uso em muitos Países e além do mais *V. cholerae* cresce bem em água peptonada alcalina e em meio TCBS (NCID, s/d) mas devemos ter em conta o facto de que qualquer método tem as suas limitações.

Com a recente criação do centro de biologia molecular da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) na Faculdade de Veterinária, montou-se o método de PCR que poderá ser usado em estudos futuros. É um método rápido, preciso, seguro,

eficiente e tornou-se uma ferramenta importante no uso de diagnóstico de patógenos presentes no ambiente aquático. Este método tem o potencial de melhorar o tempo de detecção de *V. cholerae* (Piliz et al., s/d; Theron et al., 2000). No nosso estudo se tivéssemos utilizado em paralelo o método de PCR directamente a partir da amostra seria de se esperar um número mais elevado de estirpes identificadas. As estirpes isoladas foram conservadas em Agar Nutriente á temperatura ambiente e as membranas após a filtração foram enviadas para a Itália, passados aproximadamente 6 meses para realização das análises usando o método de cultura (convencional) e o método de PCR.

As formas não cultiváveis que eventualmente poderiam ter sido encontradas na amostra com o método de PCR (detecção de DNA directamente da amostra), não foram identificadas devido ao facto de ter sido feito o PCR com base nas estirpes isoladas de culturas feitas, onde não foram isoladas estirpes de *V. cholerae* 01. Num estudo realizado na Malásia sobre a detecção de *V. cholerae* 01 em ambientes aquáticos, foram analisadas 80 amostras de água pelo método de cultura (convencional) e pelo método de PCR. Só 1 amostra foi positiva pelo método de cultura enquanto 8 amostras foram positivas pelo método de PCR, (Norazah, 2001) o que mostra que é um método mais sensível.

Theron 2000, num estudo realizado na África do Sul sobre a detecção de *V. cholerae* ambiental toxigénico em amostras de água de várias fontes foram isoladas 16 espécies incluindo *V. cholerae* utilizando a combinação do método de cultura (convencional) e o método de PCR e concluíram que o método combinado é uma importante ferramenta para a monitorização de *V. cholerae* na água. Neste

estudo os géneros isoladas foram principalmente *Aeromonas* e *Vibrio*. No género *Vibrio* as espécies mais isoladas foram: *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii* e *V. hollisae*. Neste aspecto encontramos similaridade ao estudo realizado por nós.

Outro aspecto que pode estar ligado a baixa percentagem de *V. cholerae* é o fenómeno de competição entre as espécies pois no nosso estudo foram isoladas 16 espécies das quais os géneros *Aeromonas* e *Vibrio* foram os mais abundantes o que provavelmente com o aumento da biodiversidade das espécies diminui a probabilidade de se isolar *V. cholerae*. No género *Vibrio* encontramos mais *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. metschnikovii* e *V. hollisae* (tabela V).

Por estas razões o isolamento em amostras de origem ambiental e nos alimentos pensamos ser mais difícil do que em amostras clínicas.

Segundo o inquérito feito aos técnicos executores deste programa e ao director do LNHA todos acham pertinente que o sistema de monitorização seja montado em todo o País mas não clarificam se é possível manter o sistema como actividade de rotina em termos de enquadramento da actividade e do pessoal existente.

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- Problemas de ilegibilidade da informação retirada dos livros de registo que foi minimizada através das consultas directas aos técnicos do Laboratório envolvidos.
- Qualidade da informação registada (fiabilidade), uma vez que não há como confirmar se o que foi registado corresponde exactamente ao que foi observado no sistema (em particular com relação aos isolamentos das bactérias)
- Sendo estudo de um caso as generalizações podem não ser possíveis por causa dum multiplicidade de factores envolvidos e que correspondem apenas a este caso em estudo. Mas algumas lições importantes podem eventualmente ser tiradas e utilizadas para melhoria do próprio sistema estudado.

7. CONCLUSÕES

Apesar dos problemas encontrados na implementação do programa de monitorização os resultados são encorajadores e mostram que o sistema de monitorização poderia ser muito importante para a prevenção da cólera.

- *Vibrio cholerae* detectados revelaram-se todos não toxigénicos mas sugerem condições favoráveis para a disseminação do Vibrião e para o desenvolvimento de estirpes de *Vibrio cholerae* patogénicos.
- A ocorrência de *Vibrio cholerae* no ambiente foi maior na estação chuvosa e quente do que na estação seca e fria.
- Existe um risco sanitário associado à presença de espécies de Vibriões patogénicos como é o caso de *V. parahaemolyticus* no ambiente aquático e nos alimentos.
- A frequência de *Vibrio cholerae* foi maior na água do mar e esgotos, seguido da água do rio.
- Dum modo geral os factores limitantes que influenciaram o programa de monitorização de acordo com os inquiridos poderão levar à falta de sustentabilidade do programa.
- Portanto, embora não foi isolado *Vibrio cholerae* patogénico no ambiente, o sistema de monitorização forneceu um quadro extremamente interessante para análise do risco ambiental relacionado com a endemia e surtos epidémicos de *Vibrio cholerae*.

8. RECOMENDAÇÕES

Dado a magnitude do problema da epidemia da cólera recomenda-se que na corrente estratégia para prevenção e controle da epidemia inclua-se:

- a) Uma efectiva, simples e representativa vigilância no país que possa fornecer precocemente um sinal de advertência através da monitorização de *Vibrio cholerae* no ambiente para impedir uma eclosão ou surto.
- b) Que as futuras pesquisas nesta área tenham duração mais alongada para se obterem mais resultados permitindo tirar melhores conclusões do estudo.
- c) Que o Concelho Municipal melhore:
 - i. o sistema de drenagem das águas residuais domésticas da cidade de Maputo, de forma a garantir que as mesmas sejam desviadas totalmente para a ETAR e,
 - ii. a limpeza das valas de drenagem e sensibilize a população para não usar a vala para outros fins como: deitar lixo, lavar, brincar, tomar banho, drenar fossas etc.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI M., M. Emch, J.P Donnay et al. The spatial epidemiology of cholera in an endemic area of Bangladesh. 2002. Vol. 55, nº6, p. 1015-24, Corea.
- BARBIERI E., L. Falzano, C. Fiorentini et al. Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. and Non-01 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. Applied and Environmental Microbiology, 1999. Vol.65, nº6, p.2748-2753, Roma.
- BARCA A., e T.Santos. Geografia de Moçambique, Física e Económica, 10a classe, 2000. 3ª edição, Diname, 178 pp. Maputo- Moçambique.
- BARRETO A., Tallarico M., Aragón M. Cólera em Moçambique no século XIX: II Tratamento utilizado na época.Artigo de revisão. In: Revista médica de Moçambique, 1995. Vol. 6, nº3-4, p. 2-5.
- BARRETO A., Tallarico M., Aragón M. Cólera estamos na 8ª pandemia? Será que o *Vibrio cholerae* 0139 Bengala irá circular em Moçambique? Artigo de revisão. In: Revista médica de Moçambique, 1995. Vol. 6, nº1-2, p. 2-4.
- BUUREN V. Abatement of the Water pollution in the Infulene Basin Final Report. Departement of Water Management, Environmental and Sanitary Engineering, EMU, 1995. nº 63, 74pp. Maputo- Moçambique.
- CASTIÑEIRAS T. & Martins F. Cólera, s/d. P. 1-10
- CODEÇO C.T. Endemic and Epidemic Dynamics of cholera: the role of the aquatic reservoir. 2001. 14pp. Rio de Janeiro- Brasil.

- COLOMBO M.M., S. Mastrandrea, F. Leite et al. Tracking of clinical and environmental *Vibrio cholerae* 01 strains by combined analysis of the presence of the toxin cassette, plasmid content, and ERIC PCR. Elsevier, 1997. p. 1-13, Luanda- Angola.
- COLWELL Rita R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm; 1996.Vol. 274, n°5295, p. 2025-31. USA.
- COLWELL Rita R. Marine Microbiology. (s/d). p. 1-4.
- COLWELL R.R., A. Huq, M. Islam et al. Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration, 2002. Vol.100, n°3 p.1051-1055. Bangladesh.
- CONYER R.T., La importancia de la Vigilancia epidemiologica. (s/d). Vol.38, n°5, p. 1-3
- CROCI L., P. Serratore et al. Detection of Vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area. The society for Applied Microbiology, 2000. Vol. 32, p. 57-61, Roma- Itália.
- DALSGAARD A., M. Skov, O. Serichantalergs et al. Molecular evolution of *Vibrio cholerae* 01 strains Isolated in Lima, Peru From 1991 to 1995. Journal of clinical Microbiology, 1997. vol.37, n° 5, p. 1151-1156. Lima- Peru.
- Department of Health. Vibriosis. Epidemiology, Annual report, EUA, 1999. . <http://www.tdn.state.tx.us>. Visitado `a 22-05-03
- DESMARCHELIER P., M. Pathogenic Vibrios. In: HOCKING A.D., et al. Foodborne Microorganisms of Public Health Significance, 1997. 6ª edição, cap. 9, P. 285- 307, NSW, Austrália.

- DIRECÇÃO NACIONAL DE MEDICINA PREVENTIVA-LNHAA Inquérito sobre a Poluição da Baía de Maputo. Ministério da Saúde, 1981. Cadernos de Saúde, nº 10.
- DIRECÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, gabinete de epidemiologia. Situação da Cólera em Moçambique- MISAU, 2001. 6pp.
- DINAGECA- Direcção Nacional de Geografia e Cadastro-dados colhidos na divisão administrativa toponimia,2003. Maputo- Moçambique.
- FARUQUE S., M. Albert and J. Mekalanos. Epidemiology, Genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and molecular Biology, Reviews, 1998. Vol.62, nº 4, p.1301-1314, Bangladesh.
- FERNANDES Â. Poluição na Baía de Maputo: Níveis de contaminação de 1968 a 1996. In:Revista médica de Moçambique, 1995. Vol.6, nº 3-4, p. 27-31.
- FERNANDES Â., M.T. Murta, A. Manuel, I. Amado e Z. Abixai. Poluição na Baía de Maputo. In: Revista médica de Moçambique, 1993. Vol.4 nº 2.
- FOLGOSA E., A. V. José, M. Hung. Cólera na cidade e Província de Maputo: Resultados laboratoriais das amostras analisadas no período de Junho de 1991 `a Junho de 1992. In: Revista médica de Moçambique, 1994. Vol. 5, nº3, p. 9-12.
- FOLGOSA E., S. Mastrandreia, P, Cappuccinelli et al.. Molecular identification of pathogenicity genes and ERIC Types in *Vibrio cholerae* 01 epidemic strains from Mozambique, 2001. Vol.127, p.17-25, Maputo-Moçambique.

- FUNASA, cólera, vigilância epidemiológica. Brasil, s/d. www.funasa.gov.br. Visitada á 26-02-03
- FRANCO A. et al. Cholera in Lima Peru, correlates with prior isolation of *Vibrio cholerae* from the environmental, 1997. Vol. 146, nº 12, p. 1067-75, Lima- Peru.
- GARCIA EC. El futuro incierto de la contaminación del agua y su relacion con el cólera, s/d. P.1-4
- GLASS RI.. M. Claeson et al. Cholera in Africa; lessons on transmission and control for Latin America.- Georgia, 1991. Vol.28, nº 338, p.791-5
- HEATH -Hervio., R.Colwell, A. Derrien et al. Occurrence of pathogenic Vibrios in coastal areas of France, 2002. Journal of applied microbiology, p.1123-1135, Paris- França.
- Instituto de Saúde do Paraná Aspectos epidemiológicos. Brasil, 2002. www.saude.pr.gov.br./Agravos. Visitada á 30-09-02
- Instituto Nacional de Estatística. Recenciamento geral da população - 1997
- ISLAM M.S., B. Drasar and R. Sack. The Aquatic Flora and Fauna as Reservoirs of *Vibrio cholerae*: A Review. J. Diarrhoeal Dis Res., 1994. Vol.12, nº 2, p. 87-96, Bangladesh.
- ISLAM M.S., B. Drasar and R. Sack. Probable Role of Blue-green algae in Maintaining endemicity and Seasonality of Cholera in Bangladesh: a Hypothesis: A Review. J. Diarrhoeal Dis Res., 1994. Vol.12, nº 4, p. 245-256, Bangladesh.

- ISLAM M.S., B.S Drasar and R.B Sack. Ecology of *Vibrio cholerae*: role of aquatic fauna and flora. 1996. p. 186 – 227, London.
- JIANG S., M. Matte, G. Matte et al. Genetic Diversity of clinical and environmental Isolates of *Vibrio cholerae* Determined by amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology, 2000. Vol.66, nº1, p.148-153, Maryland- USA.
- JIANG S.C., W. Fu. Seasonal Abundance and Distribution of *Vibrio cholerae* in coastal waters quantified by a 16S-23S intergenic spacer probe. 2001. Vol. 42, nº4, p. 540-548, Maryland- USA.
- KAPER J.B., J.G. Morris; and M.M. Levine. Cholera. Clinical Microbiology, 1995. Reviews, p.48-86, Maryland- USA.
- KARAOLIS D., R. Lan, and P. Reeves. The sixth and Seventh cholera Pandemics Are Due To Independent clones separately Derived From Environmental, Non toxigenic, Non-01 *Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology, 1995. Vol.177, nº11, p.3191-3198, Austrália.
- LEWIS M.J. *Vibrio, mobiluncus, gardnerella and spirillum*. In: GREENWOOD D., R.Slack, J.Peutherer. Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. Churchill Livingstone, 1997. 15ª edição, cap. 31, p.298-304, UK.
- LIPP EK., A Huq, RR Colwell. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. 2002. Vol 15, nº 4, p. 757-70, Maryland- USA.

- LOBITZ B., L. Beck, A. Huq et al. Climate and infectious disease: Use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. PNAS, 2000. Vol. 97, n°4, p. 1-7, Bangladesh.
- LOUIS VR., Russek-cohen E., N Choopun et al. Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. 2003. Vol. 69, n°5, p. 2773-85, USA.
- LOWENHAUPT E. Rapid detection of *Vibrio cholerae* 01 in West Africa, 1998. [http://bvs.insp.mx/componen/svirtual/calidad colera](http://bvs.insp.mx/componen/svirtual/calidad%20colera) Visitada à 30-09-02
- MADICO G., W. Checkley, R. Gilman et al. Active Surveillance for *Vibrio cholerae* 01 and Vibriophages in Sewage Water as a potencial tool to predict cholera outbreaks. Journal of clinical Microbiology, 1996. Vol.34, n°12, p.2968-2972, Lima- Peru.
- MINAMI A., S. Hashimoto, H. Abe et al. Cholerae enterotoxin production in *Vibrio cholerae* 01 strains isolated from the environment and from humans in Japan . Apply Environmental Microbiology, 1991. Vol 57, n°8, p. 2152-7, Japan.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Microbiologia Alimentar, 1997. 139 pp
- MUGERO C., A. Hoque. Review of Cholera Epidemic in South Africa, with Focus on Kwazulu-Natal Province. 2001. P.1-14, South Africa.
- NCID. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. (s/d). CDC-USA.

- Newslettes, Cholera Epidemic in South Africa (s/d).
//C:/windows/Desktop/Cholera%20in%20South%20Africa,%Cholera,%Chole
rae,%20Re, Visitada á 23-05-03
- NORAZAH A., M.T. Zainuldin, A.G. Kamel et al. Detection of *Vibrio cholerae* 01 from aquatic environment in sarawak. Istitute for Medical Research, 2001. Vol. 56, nº1, p. 4-9, Malásia.
- PASCUAL M., M.J. Bouma, A.P. Dobson. Cholera and climate: revisiting the quantitative evidence. Elsevier, 2002. p.237-245, London.
- PILZ E.B., G.S. Bellincanta et al. aperfeiçoamento da detecção de microrganismos patogénicos no ambiente aquático utilizando a técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR). Departamento de Microbiologia, instituto de Ciências Básicas da Saúde, (s/d). 5pp. Porto Alegre- Brasil.
- RABBANI G.H. and W.B. Greenough. Food as a vehicle of Transmission of Cholera. (s/d). P.1-13. ICDDR,B. Bangladesh.
- RIVERA I., R. Colwell et al. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. Applied and environmental Microbiology, 2001. Vol.67, nº6, p.2421-2429, São Paulo- Brasil.
- Saúde no Paraná. Boletim epidemiológico, cólera. Brasil 2002
www.saude.pr.gov.br. Visitada á 30-09-02
- SIDDIQUE A.K., K. Zaman, A.H Baqui, et al. Cholera Epidemics in Bangladesh: 1985-1991. 1992. Vol. 10, nº2, p.79-86, Bangladesh.

- SIDDIQUE A.K., K. Zaman, K. Akram et al. Emergence of a new epidemic strain of *Vibrio cholerae* in Bangladesh, 1994. Vol.46, nº3, p.147-150, Bangladesh.
- SIDDIQUE A.K., K. Akram, K. Zaman, et al. *Vibrio cholerae* 0139: How great is the threat of a pandemic? 1996. Vol.1, nº3, p. 393–398, Bangladesh.
- SINGH D.V., M. Matte, G. Matte et al. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* 01, 0139, non-01, and non-0139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. Applied and environmental Microbiology, 2001. Vol.67, nº2, p.910-921, Índia.
- SILVEIRA N. JR. Qualidade Bacteriológica dos Moluscos da Fazenda Marinha Atlântico Sul. (s/d). 4 pp. Brasil.
- SOUMEN C., K. A. Mukhopadhyay, K. B. Rupak et al. Virulence Genes in Environmental Strains of *Vibrio cholerae*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. Vol. 66, nº 9, p. 4022-4028, Calcuttá.
- SOUSA J.C.F., N.C. Taveira. Vibrionaciae. In: FERRIERA W., J.C.Sousa et al., Microbiologia. Editora LINDEL, 2000. Vol.2, cap. 9, p. 111-119, Lisboa.
- STANWELL-Smith R. Water-borne diseases and climate change. Public Health Laboratory Service, (s/d).126 pp. UK.
- TAMAYO R.R. Cólera: a las puertas de una crisis mundial? ISSN. 2000. Vol.5, nº1. Cuba.
- THERON J., J. Cilliers, M. Du Preez et al. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* environmental water samples by an enrichment broth cultivation-

pit-stop semi- nested PCR procedure. Journal of Applied Microbiology, 2000. P.539-546, Pretória- South Africa.

- UCHIYAMA H. A number of *Vibrio cholerae* non-01 isolated from aquatic environments. 1998. Vol. 72, nº7, p. 720-726, Japão.
- VARGAS R.R. et al., Control del colera. 1991. p.1-4
- VIMONT S., and P. Berche. Nha a, an Na⁺/H⁺ Antiporter Involved in Environmental Survival of *Vibrio cholerae*. Journal of bacteriology, 2000. Vol.182, nº10, p.2937-2944, Paris- França.
- WHO International Notes. El Niño and Its Health Impacts, 1998. Vol. 24-22
- WHO Information. Cholera, 2000. 2001. www.who.int/inf-fs/en/fact107.html

Visitada á 16-04-02

- WHO /FAO. Surveillance Programme for Control of Food borne Infections and Intoxications in Europe, 2001.Vol.70, p. 1-6. Newsletter.
- WIEWEL E. Cholera Epidemiology and Molecular pathogenesis of *Vibrio cholerae*. Emerging Infectious Diseases. 2001. p.1-12

10. ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO TÉCNICO

MONITORIZAÇÃO DA PRESENÇA DE *Vibrio cholerae* NO MEIO AMBIENTE POTENCIALMENTE EPIDÉMICO EM MOÇAMBIQUE LEVADO A CABO PELO LNHAA

1. INTRODUÇÃO

A cólera constitui um problema importante de saúde pública em Moçambique que, nos últimos anos, tem sido afectada por epidemias periódicas recorrentes.

Diferentes estirpes de *Vibrio cholerae* podem estar implicadas na doença aguda e muitas destas estirpes podem existir no meio ambiente constituindo potenciais focos para aparecimento de novos surtos epidémicos. As estirpes isoladas durante a epidemia de 1997/98 foram estudadas quanto ao perfil de sensibilidade aos antibióticos, presença de genes codificadoras da produção de toxinas e marcadores moleculares para despiste epidemiológico.

2. OBJECTIVOS

São objectivos deste estudo:

- identificar os focos ambientais da presença de *Vibrio cholerae* na Província de Maputo e em outras onde tenham sido reportadas epidemias;

- estudar as diferentes estirpes de *Vibrio cholerae* isoladas do meio ambiente e a presença de genes de virulência e identidade genética dos marcadores epidemiológicos;
- comparar as diferentes estirpes de *Vibrio cholerae* isoladas do meio ambiente com as estirpes isoladas na epidemia de cólera em 1997/98 e em outros países da região;
- determinar os factores ambientais favorecedores da presença das diferentes estirpes de *Vibrio cholerae* isoladas do meio ambiente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho será realizado em duas partes: a primeira parte consistirá na identificação das zonas onde se irão isolar os vibriões do ambiente (cidade de Maputo e Província) e a segunda parte será reservada para a monitorização do ambiente identificado na primeira parte. Nas primeiras duas semanas foram visitados locais nos arredores da cidade de Maputo e seleccionados locais para a compra das amêijoas e colheita regular das amostras de água.

Os locais para a colheita de amostras foram identificados pelo sistema de GPS (Global Position System – sistema de satélite usado para mapear os pontos de amostragem) e fotografadas utilizando uma câmara digital.

3.1.1. Água de rega (Vale do Infulene):

3.1.1.1. Benfica – Ramal do rio Infulene

3.1.1.2. Estádio da Machava - Ramal do rio Infulene

3.1.1.3. Ponte - Rio Infulene

3.1.1.4. Vala de drenagem próximo da Fábrica de cerveja 2M – água pluvial

3.1.1.5. Saída da estação de tratamento de águas residuais (ETAR) - esgotos

3.1.2. Água do mar (ao longo da Baía de Maputo):

3.1.2.1. Água da praia em frente ao Clube Marítimo (água do mar)

3.1.2.2. Água da praia no ponto da drenagem de esgotos na Mira Mar (água do mar e esgotos)

3.1.2.3. Água da drenagem de esgotos na Ponta Vermelha (água do mar e esgotos)

3.1.2.4. Água da drenagem de esgotos na ponte do Ferri – Boat do lado de Maputo (água do mar e esgotos)

3.1.2.5. Água do mar em frente da Escola de Pesca na Matola (Água do mar, rio Matola e esgotos)

3.1.3 Bairro dos Pescadores - Alimentos (amêijoas)

3.1.3.1. Amêijoas de Xefina

3.1.3.2. Amêijoas de Macaneta

3.1.3.3. Amêijoas de Maputo

A maior quantidade de amêijoas vendidas na cidade provém destas 3 regiões.

As amostras são transportadas a +4°C em caixa isotérmica sendo analisadas logo após a chegada ao laboratório, dentro de 6 horas.

O vale do Infulene fica situado aproximadamente a 5km a Este da cidade de Maputo. A população é basicamente camponesa e vive em habitações precárias sem infra estruturas urbanas incluindo de saneamento. É uma zona de grande actividade agrícola, tornando-se importante do ponto de vista económico. Os produtos cultivados são em grande parte vegetais consumidos crus, principalmente alface, além de diferentes legumes. No centro do vale corre o Rio Infulene que é de grande importância para a comunidade circunvizinha pois as suas águas são intensamente usadas para irrigação. Durante o percurso o rio sofre influência directa ou indirecta de vários factores, nomeadamente: descargas de águas poluídas por resíduos químicos da actividade industrial (produtos oleosos e sais), despejos domésticos (urina, material fecal, restos de alimentos, plásticos) e agrícolas e da estação de tratamento de águas residuais - ETAR (Buuren, 1995).

Para a Baía drenam vários esgotos da cidade, resíduos da actividade industrial resultante da actividade do parque industrial distribuído pela cidade de Maputo, Matola e Machava pois as várias fábricas não possuem sistemas de tratamento das descargas e, portanto, estas águas residuais carregando substâncias químicas tóxicas são levadas directa ou indirectamente para a Baía de Maputo, resíduos da actividade artesanal e dos transportes (Porto e caminhos de Ferro), resíduos domésticos de natureza orgânica como microbiológica, das actividades

comerciais e públicas, na Baía desaguam alguns rios ao longo dos quais se tem intensificado a actividade agro-pecuária (Inquérito sobre a poluição da Baía de Maputo, 1981- citado por Fernandes, 1995).

A Baía é muito frequentada por milhares de banhistas de todos extractos sociais que vão a praia do Costa de Sol, é também efectuada actividades de pesca à linha em algumas zonas da Baía e recolha de moluscos bivalves principalmente amêijoas para consumo.

Na cidade assiste-se a um rápido crescimento populacional e um grande desenvolvimento económico industrial que inevitavelmente contribuem para o avolumar de problemas de poluição na orla costeira da cidade (Fernandes, 1995).

Portanto estes locais são áreas que indicam a existência de riscos para a disseminação do vibrião, representando um risco para a população servida.

O monitoramento dos alimentos (amêijoas) é feito em regiões de comércio de pescado (bairro de pescadores e mercados). As amêijoas pertencem aos moluscos bivalves por isso têm a capacidade de filtrar consideráveis volumes de água e de reter nos seus tecidos, patogénicos presentes no ambiente que os circunda. São muito consumidas pela população, existem em abundância e são um bom indicador da qualidade da água donde foram colhidas (Beucher e Cols, 1986; Moldan e Cols, 1989 - citado por Fernandes .,1993).

3.2. AMOSTRAGEM

3.2.1. Amostras de água

Serão colhidas 10 amostras de água todas as terças feiras (uma vez por semana) de forma alternada, uma semana para água de rega, outra semana para água do mar. Para além das águas também são colhidas 3 amostras de amêijoas alternando com as águas no período de um ano nos locais já identificados. As amostras são transportadas a +4° C em caixa térmica sendo analisadas logo após a chegada ao laboratório, dentro de 6 horas.

O método utilizado é o convencional (clássico).

É colhida cerca de 2 litros de água das fontes identificadas, 1 litro para filtração, o filtro será cortado ao meio: uma parte é destinada para sementeira em meio TCBS e outra é submetida à secagem e guardada para o seu processamento posterior pelo método de PCR.

900 ml é também previamente colhida num frasco contendo 100ml de 10 x APA, perfazendo 1 litro, para enriquecimento e sucessivo cultivo em TCBS.

As colónias em crescimento no meio de TCBS são isoladas e transferidas para um meio nutritivo de agar nutriente (NA) sendo posteriormente identificadas com recurso aos soros, API 20E ou testes bioquímicos, para além da prova de oxidase.

Após a sua identificação as estirpes isoladas são conservadas a uma temperatura de (-30°C) para a sua posterior caracterização genética e molecular em Itália.

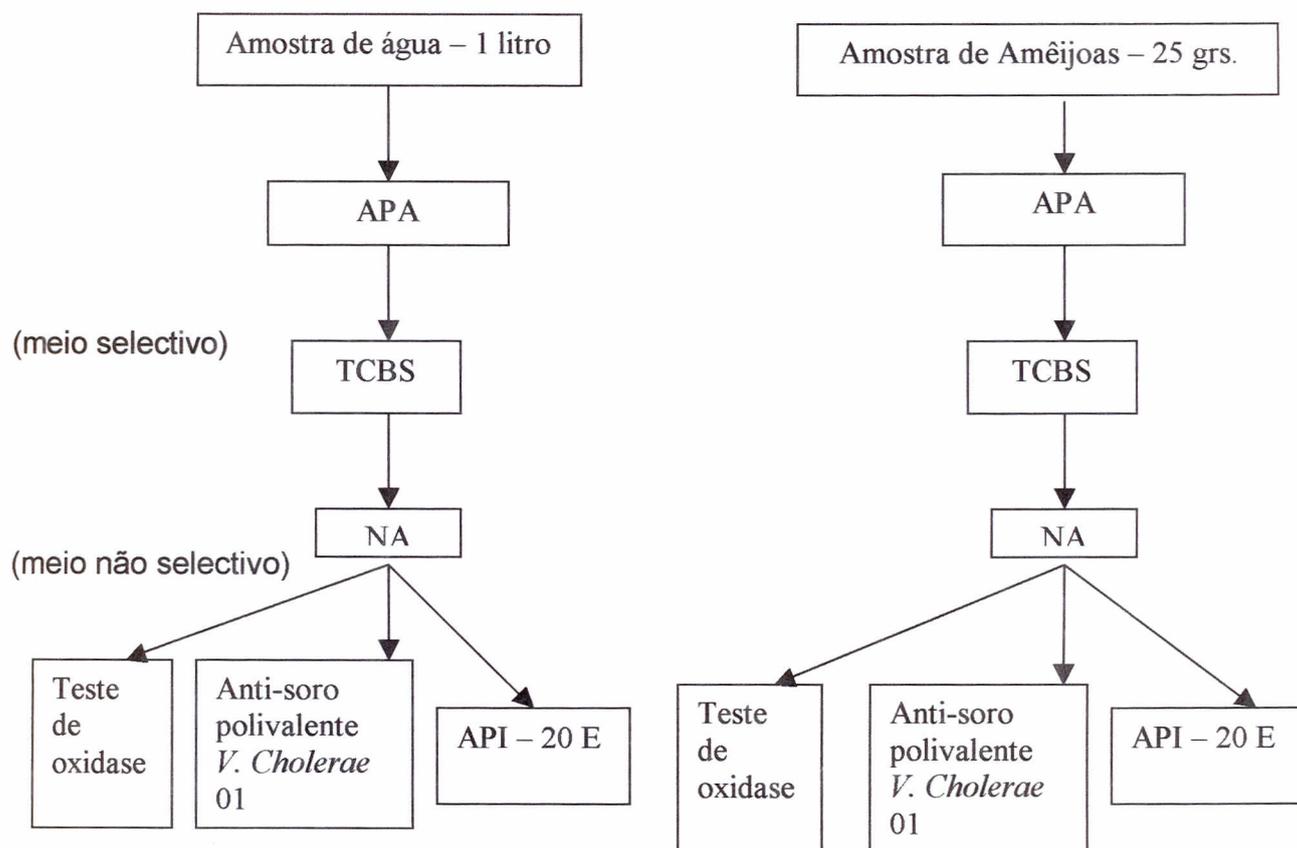
Serão igualmente realizados testes de toxigenicidade em PCR (reacção em cadeia da polimerase).

3.2.2. Amostra de alimentos (amêijoas)

Colhem-se 3 amostras de amêijoas por semana, alternadas com as águas durante um ano. As amostras serão tomadas aleatoriamente. A unidade de amostra foi fixada em 2 latas de 500grs e pesadas 10 grs de amêijoas. Posterior enriquecimento em APA durante 6-8 h e subcultivo em TCBS e confirmação por meio de API 20 E, testes bioquímicos e serológicos.

Todas as amostras após a colheita serão acondicionadas individualmente em sacos de polietileno, devidamente identificadas e transportadas em caixa térmica, sendo analisadas logo após á chegada ao laboratório.

ESQUEMA DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS



4. CRONOGRAMA DAS ACTIVIDADES

	Abr 2002	Mai 2002	Jun 2002	Jul 2002	Ago 2002	Set 2002	Out 2002	Nov 2002	Dez 2002	Jan 2003	Fev. 2003	Mar. 2003	Abr. 2003
Colheita de amostras e análise laboratorial	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise e interpretação dos resultados							X	X					
Elaboração e entrega do relatório								X	X				

5. RESULTADOS

Os Resultados serão apresentados em gráficos e tabelas.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Aly FAR, Machatine GJ, Paulo D. Epidemia de cólera na Província de Maputo de Novembro 1991 a Junho 1992. Rev. Med. Moçambique 1993; 4: 2-4;
2. Colombo MM, Mastrandea S, Leite F, et al. Tracking of clinical and environmental *Vibrio cholerae* O1 strains by combined analysis of the presence of toxin cassette, plasmid content and ERIC PCR. FEMS Imm Med Microb 1997; 19: 33-45.
3. Folgosa E, Valdivia JA, Hung M. Cólera na Cidade e Província de Maputo: resultados laboratoriais das amostras analisadas no período de Junho de 1991 a Junho de 1992. Rev. Med. Moçambique 1994; 5: 9-12;
4. Folgosa E, Mastrandea S, Cappuccinelli P, Uzzau S, Rappelli P, Brian MJ, Colombo MM Molecular identification of pathogenicity genes and ERIC types in *Vibrio cholerae* O1 epidemic strains from Mozambique. 2001. *Epidemiol. Infec.* 127: 17-25;
5. Keasler SP, Hall RII. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. Lancet 1993; 341: 1661;

Anexo 2

Codificação dos locais de amostragem e as respectivas coordenadas

Código	Local	Posição
001 BEN	BENFICA	S25.88736 E32.55845
001 CLU	CLUBE MARÍTIMO	S25.94815 E32.61731
002 RIO	RIO INFULENE	S25.91252 E32.52022
002 MIR	MIRAMAR	S25.95431 E32.61063
003PON	PONTE INFULENE	S25.91932 E32.54234
003VER	P. VERMELHA	S25.98410 E32.59203
004CAT	PONTE CATEMBE	S25.97883 E32.57531
004DRE	VALA DE DRENAGEM	S25.92092 E32.54368
005ETA	ETAR	S25.92039 E32.53919
005RIO	RIO MATOLA	S25.98609 E32.45683

LOCAIS DE AMOSTRAGEM:

Esgoto na Baía de Maputo (002 MIR, MIRAMAR, S25.95431 E32.61063)



RIO INFULENE

**(002 RIO, RIO INFULENE,
S25.91252 E32.52022)**



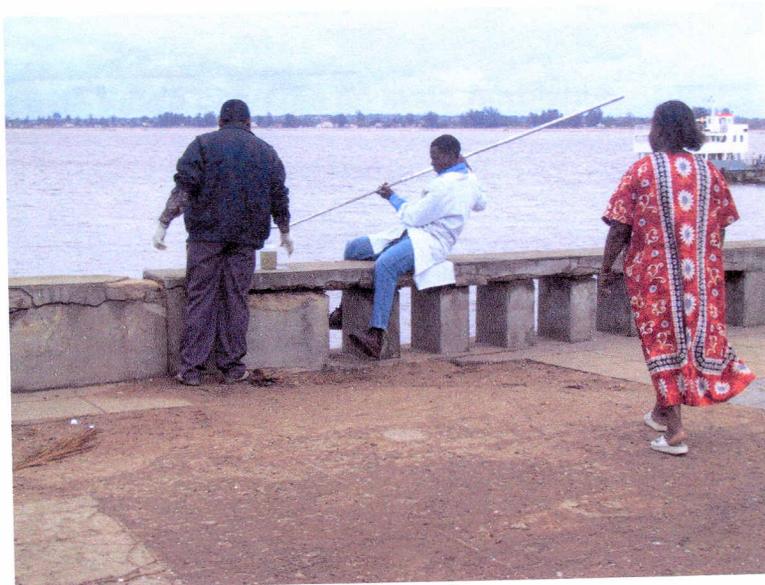
LOCAIS DE AMOSTRAGEM

(continuação)

PONTE CATEMBE

(004CAT, PONTE CATEMBE,

S25.97883 E32.57531)



CLUBE MARÍTIMO (001CLU, CLUBE MARÍTIMO,

S25.94815 E32.61731)

Anexo 3

Modelo da Ficha de Registo preenchida

Monitorização da Presença de *Vibrio cholerae* no meio Ambiente Potencialmente Epidémico em Moçambique

Exemplo:

Data	Tipo de água	Local de colheita da amostra	Estirpes Isoladas	Estirpes conservadas	Observações
04/06/02	Água do mar e esgoto	Clube marítimo	<i>Vibrio alginolyticus</i>	sim	
		Miramar	<i>Vibrio cholerae</i> não 01	sim	
		Ponta vermelha	<i>Vibrio cholerae</i> não 01	sim	
		Ponte catembe	<i>Vibrio cholerae</i> não 01	sim	
		Rio Matola	<i>Vibrio alginolyticus</i>	sim	
18/06/02	Água do mar e esgoto	Clube marítimo	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	
		Miramar	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>caviae</i>	sim	
		Ponta vermelha	<i>Vibrio cholerae</i> não 01	sim	
		Ponte catembe	<i>Aeromonas sobria</i>	sim	
		Rio Matola	nenhuma	-	

Fonte: LNHA

Observações: As estirpes identificadas e conservadas em Agar Nutriente serão enviadas para a Itália para identificação pelo método de PCR

Anexo 4

Tabela A - Descrição das bactérias isoladas na água do rio por local e data de colheita

Data	Espécies isoladas	Benfica	Rio Infulene	Ponte Infulene	Dren.	ETAR	TOTAL
09-4-02	Aeromonas sp	3	1	1	1	1	7
23-4-02	A. h.caviae	2	2	-	4	3	11
	S. paucimobil.	-	1	-	-	-	1
	V. fluvialis	-	1	-	-	-	1
14-05-02	A. h.caviae	-	3	-	-	2	5
	V. fluvialis	-	1	-	-	1	2
28-5-02	A. h.caviae	-	2	2	-	1	5
	V. fluvialis	-	2	1	-	1	4
11-06-02	A. h.caviae	1	1	1	1	2	6
	A. salmonoc.	1	-	-	-	-	1
	V. fluvialis	-	1	-	-	1	2
	V. cholerae	-	-	-	-	2	2
16-07-02	A. h.caviae	2	2	2	3	1	10
	A. sobria	1	-	1	-	-	2
	V. alginoly.	-	1	-	-	-	1
	V. metschnik.	1	1	-	-	-	2
01-10-02	Aeromonas sp	4	2	4	4	4	18
	V. fluvialis	-	2	4	-	-	6
15-10-02	Aeromonas sp	3	3	2	4	4	16
	V. mimicus	-	-	1	-	-	1
15-10-02	V. fluvialis	-	-	1	-	-	1
19-11-02	Aeromonas sp	3	3	4	4	3	17
17-12-02	Aeromonas sp	2	1	-	1	1	5
	V. mimicus	-	1	-	1	-	2
11-02-03	A. h.caviae	-	-	1	-	-	1
	A. hydrophila	2	2	-	-	-	4
	V. fluvialis	2	2	-	-	-	4
	V. cholerae	-	-	2	-	-	2
	V. parahaem.	-	-	1	-	1	2
04-03-03	A. h.caviae	1	1	1	-	-	3
	A. hydrophila	-	-	1	2	3	6
	V. fluvialis	-	-	-	2	2	4
25-03-03		-	-	-	-	-	-
15-04-03		-	-	-	-	-	-
TOTAL							156

Tabela B- Descrição das bactérias isoladas na água do Mar e Esgotos e

Rio Matola por local e data de colheita

Data	Espécies isoladas	Clube marítimo	Miramar	Ponta vermelha	Ponte catembe	Rio Matola	TOTAL
16-04-02	Aeromon. sp	1	3	-	-	-	4
	A. h.caviae	-	-	1	2	-	3
	V. alginoly.	1	-	1	-	-	2
	V. parahae.	1	-	-	-	-	1
07-05-02	A. h.caviae	-	2	-	4	-	6
	S. multivor.	-	-	-	-	1	1
21-05-02	A. h.caviae	-	1	1	2	1	5
	A. sobria	-	-	-	2	-	2
	V. hollisae	-	-	1	-	-	1
	L. damsella	-	-	-	-	2	2
04-06-02	V. fluvialis	-	2	-	1	-	3
	A. h.caviae	-	1	-	-	-	1
	A. sobria	-	-	1	1	-	2
	V. alginoly.	2	-	-	-	1	3
18-06-02	V. cholerae	-	1	1	1	-	3
	A. h.caviae	-	1	-	-	-	1
	A. sobria	-	1	-	2	-	3
	V. alginoly.	2	-	-	-	-	2
23-07-02	V. cholerae	-	-	1	-	-	1
	Ps. Fl/putida	-	-	-	-	1	1
	A. h.caviae	-	-	2	1	-	3
	V. alginoly.	1	-	-	-	-	1
17-09-02	Aeromon. sp	2	5	4	4	-	15
	V. alginoly.	1	-	-	-	2	3
	V. fluvialis	1	-	-	-	2	3
08-10-02	Aeromon. sp	3	2	4	4	2	15
	V. mimicus	1	1	-	-	1	3
22-10-02	Aeromon. sp	5	5	7	4	6	27
14-01-03	Aeromon. sp	1	1	1	2	-	5
	V. fluvialis	1	1	1	2	-	5
18-02-03	A. hydroph.	-	-	-	-	1	1
	A. h.caviae	-	-	-	-	1	1
	V. alginoly.	-	1	-	-	-	1
	V. parahae.	1	-	-	-	-	1
	V. cholerae	-	1	1	-	-	2
	V. fluvialis	-	-	-	-	1	1
11-03-03	A. hydroph.	-	-	1	1	-	2
	A. h.caviae	-	-	1	-	-	1
	V. alginoly.	1	-	-	-	-	1
	V. cholerae	-	1	-	1	-	2
22-04-03		-	-	-	-	-	-
06-04-03		-	-	-	-	-	-
TOTAL							140

**Tabela C - Descrição das bactérias isoladas em amêijoas por local de origem
e data de colheita**

Data	Espécies isoladas	Xefina	Macaneta	Maputo	TOTAL
02-07-02	V. alginolyticos	2	2	2	6
09-07-02	V. alginolyticos	2	1	3	6
30-07-02	-	-	-	-	-
13-08-02	V. fluvialis	-	1	1	2
10-09-02	-	-	-	-	-
29-10-02	Aeromonas spp	3	2	2	7
12-11-02	Aeromonas spp	3	3	3	9
26-11-02	Aeromonas spp	1	1	1	3
10-12-02	-	-	-	-	-
07-01-03	-	-	-	-	-
21-01-03	Aeromonas spp	1	1	1	3
	V. fluvialis	1	1	1	3
25-02-03	V. parahaemol.	1	1	1	3
	V. cholerae	-	1	1	2
18-03-03	V. parahaemol.	-	-	1	1
29-04-03		-	-	-	-
TOTAL					45

Anexo 5

Tabela D - Estirpes de *Vibrio cholerae* 01 isoladas a partir de amostras de doentes hospitalizados, por mês, ano e proveniência nas tendas 001 da cidade de Maputo²

<u>Dia/mês/ano</u>	<u>Número de estirpes isoladas</u>	<u>Proveniência</u>
07-01-02	1	Mavalane
26-01-02	1	Mavalane
05-04-02	3	Mavalane
09-05-02	2	Mavalane
15-05-02	4	Mavalane
09-08-02	2	Mavalane
03-09-02	1	Pediatria do HCM
19-02-03	1	Pediatria do HCM
26-02-03	1	Pediatria do HCM
27-02-03	1	Mavalane
05-03-03	3	Mavalane
28-03-03	2	Mavalane
03-04-03	3	Mavalane
17-04-03	1	Mavalane
18-08-03	1	Mavalane
11-04-03	2	Boane
01-05-03	2	Boane
18-08-03	3	Boane

² Dados colhidos no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina - UEM

Anexo 6

Tabela VII (a)- Razão amostragens/ frequência de *Vibrio cholerae* por estação do ano nos locais de estudo.

Amostragens				
	Mar e esgotos	Rio	Amêijoas	Total
Seca	11	9	7	27
Chuvosa	3	5	7	15
Total	14	14	14	42
V. Cholerae isolados				
	Mar e esgotos	Rio	Amêijoas	Total
Seca	4	2	-	6
Chuvosa	4	2	2	8
Total	8	4	2	14
V. Cholerae isolados				
	Mar e esgotos	Rio	Amêijoas	Total
Seca	2.8	4.5	infinito	4.5
Chuvosa	0.8	2.5	3.5	1.9
Total	1.8	3.5	7.0	3.0

Ex: o número de amostragens necessárias para se conseguir isolar uma estirpe de *Vibrio cholerae* no mar e esgotos na época chuvosa é 1 e na época seca são 3. Ou, portanto a probabilidade de encontrar 1 estirpe de *Vibrio cholerae* na época seca são necessárias 3 amostragens e na época chuvosa 1.

Anexo 7

Inquérito pré-elaborado

Nº de técnicos inquiridos – 6

- As estirpes isoladas sugerem uma relação com a ocorrência de surtos epidémicos ou um quadro endémico? sim não

Porquê?

Comparar os dados do isolamento com as características dos eventuais surtos epidémicos ou o quadro endémico na cidade de Maputo (fontes de informação serão livro de registo do LNHA, boletim epidemiológico semanal (BES) e informações climáticas.

- Se é importante o sistema de monitorização sim não

Porquê?

- Quais os factores que contribuíram para a falta de cumprimento das actividades pré-estabelecidos no sistema?

- transporte
- meios de cultura
- reagentes
- material
- pessoal
- outros

- Se é possível manter o sistema como actividade de rotina, em termo de enquadramento desta actividade. sim não

Porquê?

Sugestões: