



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL



**OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM OSTRAS (*Crassostrea sp.*),
EXTRAÍDAS DE AMBIENTES NATURAIS NA ILHA DE SÃO LUIS – MA**

ERICKA BRUNA GALVÃO

São Luís – MA

2016

ERICKA BRUNA GALVÃO

**OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM OSTRAS (*Crassostrea sp.*),
EXTRAÍDAS DE AMBIENTES NATURAIS NA ILHA DE SÃO LUIS – MA**

Orientadora: Prof^ª. Dsc. Francisca Neide Costa
Departamento de Patologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

São Luís - MA

2016

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ____/____/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Dra. Rejeana Márcia Santos Lima – IFMA
Medicina Veterinária Preventiva
1º membro

Professora Dra. Lúcia Maria Coelho Alves – UEMA
Medicina Veterinária Preventiva
2º Membro

Professora Dra. Francisca Neide Costa – UEMA
Medicina Veterinária Preventiva
Orientadora

DEDICATÓRIA

*Ao meu amado Deus, e a minha
família,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus maravilhoso, pois com Seu imensurável amor e misericórdia, me sustentou e me guiou até aqui.

A minha família, em especial a minha mãe Vanda, meu tio Jeferson e sua esposa Sônia, e a minha avó Ana pelos exemplos de vida, pelo caráter e educação ensinados, por todo apoio e amor. Vocês foram os meus maiores incentivadores.

À minha prima Caroline Pedroni, pela cumplicidade, companheirismo, carinho e amor.

Ao meu namorado, Antônio Carlos, por tamanha compreensão, incentivo e amor.

A professora Francisca Neide Costa, pela oportunidade, atenção e orientação. Muito obrigada pela confiança.

A UEMA por toda estrutura disponibilizada ao longo desta pesquisa.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água pelo espaço, estrutura e equipamentos cedidos.

Agradeço a Coordenação e a todos os professores do Programa de Pós - graduação em Ciência Animal, pois com a dedicação e ensinamentos transmitidos, contribuíram imensamente para o meu aperfeiçoamento profissional.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o período do mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão pelo auxílio financeiro à pesquisa, por meio do Edital Universal 2013.

Ao grupo de estudos Gemvesp, técnicos e estagiários do Laboratório, pela colaboração, companheirismo e amizade. Vocês se tornaram uma família para mim. Muito obrigada: Rose, Osmar, Dona Ruthe, Lygia, Rafael, Isabela, Profa Lúcia. Um agradecimento especial à Luciana e Eliane, pois além do carinho e amizade, me ajudaram ativamente na realização desta pesquisa.

À minha amiga Arlene, pois através de sua amizade e apoio consegui superar muitos obstáculos.

Ao Prof. Felício, pela ajuda técnica e científica, pela paciência e ainda mais pela amizade.

À minha amiga irmã Camila, pela amizade e também por ter contribuído com minha pesquisa.

As preciosas amizades conquistadas durante esta etapa, vocês foram e são muito especiais para mim: Leticia Diniz e Girlene Garcia.

Aos amigos e colegas de turma do mestrado, pelos momentos compartilhados de aprendizado e de alegria.

A todos os colaboradores desta instituição, em especial a Fran, Juliana, aos estagiários do Mestrado, Nilson e D. Socorro, por serem sempre prestativos.

Aos marisqueiros que muito colaboraram e participaram realizando as coletas de ostras.

Por fim, sou grata a todos que de alguma forma contribuíram e me ajudaram a concretizar mais esta etapa de minha vida.

*Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o
que Deus tem preparado para aqueles que o amam.*

(1 Coríntios 2:9)

GALVÃO, E. B. **Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras (*Crassostrea sp.*), extraídas de ambientes naturais da ilha de São Luis – MA.** [*Vibrio parahaemolyticus* research and *Staphylococcus* coagulase positive do oysters mangrove (*Crassostrea*), extracted from Natural Environments of the São Luis Island - MA.]. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2016.

RESUMO

O Maranhão é um estado com extenso litoral, possibilitando para muitas famílias, como meio de sobrevivência a pesca. Os municípios de Raposa e Paço do Lumiar se destacam pelas condições litorâneas e pelos ricos manguezais, fazendo com que o pescado e mariscos sejam a principal fonte de renda e alimentação da população local. A ostra é considerada como uma excelente fonte nutricional e de renda para a população e também um atrativo turístico. A preferência pelo consumo *in natura*, nos chama a atenção, uma vez que alimentos crus ou mal cozidos são importantes veiculadores de doenças. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a presença de dois micro-organismos de grande relevância para a saúde pública em ostras do gênero *Crassostrea sp.* Foram analisadas no período de maio a dezembro de 2014, um total de 64 amostras de ostras, coletadas em quatro pontos de extrações naturais nos municípios de Raposa (Porto do Braga e Cais da Raposa) e Paço do Lumiar (Porto do Cumbique e Porto do Pau Deitado), pertencentes à Ilha de São Luís – MA. Buscou-se identificar a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Staphylococcus spp.* Para o isolamento e a contagem de *V. parahaemolyticus*, utilizou-se o método descrito no BAM/FDA, com modificações segundo a ISO/TS-21872-1 para temperatura. Para contagem de *Staphylococcus spp* utilizou-se a IN N°62/MAPA. A contagem de *V. parahaemolyticus* variou de <3 a 5,5 NMP/g, sendo que a maior média obtida foi para o Porto do Braga (PB) com média de 5,5 NMP/g. De 64 amostras de ostras foram caracterizadas 81 cepas de *Vibrio spp*, destas 9 foram confirmadas como *V. parahaemolyticus*. Oito (88,8%) das 9 cepas apresentaram positividade para os testes de patogenicidade. Nas condições da presente pesquisa a contagem e isolamento de *V. parahaemolyticus* foram consideradas baixas, no entanto, a maioria das cepas confirmadas apresentou potencial patogênico, sugerindo possíveis riscos à saúde pública. A contagem para *Staphylococcus spp.* encontrou-se dentro dos padrões da legislação vigente, com uma variação de contagem de <10 a 2,7x10 UFC/g, e não foi detectado a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo.

Palavras-chave: molusco bivalve, qualidade microbiológica, saúde pública

GALVÃO, E. B. **Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Staphylococcus coagulase positivo* em ostras (*Crassostrea sp.*), extraídas de ambientes naturais da ilha de São Luis – MA.** [*Vibrio parahaemolyticus* research and *Staphylococcus coagulase* positive do oysters mangrove (*Crassostrea*), extracted from Natural Environments of the São Luis Island - MA.]. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2016.

ABSTRACT

Maranhão is a state with a long coastline, which allows many families a means of survival through fishing. The state has the second longest coastline and is the second largest fish producer in the Northeast, comprising about eighty percent of Brazilian mangroves. In this scenario the municipalities of Fox and Lumiar Palace stand out for coastal conditions and the rich mangroves, causing the fish and shellfish are the main source of income and food for the local population. The oyster is considered an excellent source of nutrition and income for the population, and also a tourist attraction. The preference for fresh consumption, draws our attention, since raw or undercooked foods are important backers of diseases. This study was conducted to evaluate the presence of two very important micro-organisms to public health in the genre *Crassostrea* oysters. Were analyzed in the period May 2014 to December 2014, a total of 64 samples of oysters collected at four points of natural extractions in the municipalities of Fox (Porto Braga and Clothes fox) and Paco do Lumiar (Port Cumbique and port Pau Laying) belonging to the Saint Louis Island - MA. Sought to identify the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus sp.* For the isolation and *V. parahaemolyticus* count, we used the method described in BAM / FDA, with modifications according to ISO / TS 21872-1 to-temperature. *Staphylococcus spp* count used to IN 62 / MAP. The *V. parahaemolyticus* count ranged from <3 to 5.5 MPN / g, and the highest average was for the Port of Braga (PB) with an average of 5.5 MPN / g. 64 samples of oysters were characterized 81 strains of *Vibrio spp*, these 9 were confirmed as *V. parahaemolyticus*. Eight (88.8%) of 9 strains were positive for pathogenicity tests. Under the conditions of this study counting and isolation of *V. parahaemolyticus* were considered low, however, most of the confirmed strains showed potential pathogenic suggesting possible public health risks. The count for *Staphylococcus sp.* met within the standards of the current legislation, with a range of counts <10 to 2,7x10 CFU/g, and has not detected the presence of *Staphylococcus coagulase* positive.

Keywords: bivalve mollusk, microbiological quality, public health

LISTA DE TABELAS

p.

- Tabela 1** - Contagem e isolamento de *V. parahaemolyticus* em ostras do gênero *Crassostrea sp.* coletadas entre os meses de maio a dezembro, na Ilha de São Luís/MA, 2014.....41
- Tabela 2** - Valores de salinidade em águas coletadas nos quatros pontos de extração de ostras, Ilha de São Luís, 2014.....42
- Tabela 3** - Identificação de patogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras do gênero *Crassostrea sp.*, São Luis – MA, 2014.....43

LISTA DE FIGURAS

| | p. |
|--|-----------|
| Figura 1 - Localização dos pontos de coleta na Ilha de São Luís – MA, Brasil, 2014..... | 38 |
| Figura 2 - Áreas de depósitos naturais de ostras identificados para realização das coletas. A) Porto do Braga; B) Cais da Raposa (Município de Raposa-MA); C) Porto do Cumbique; D) Porto do Pau Deitado (Município de Paço do Lumiar - MA), 2014. | 39 |

SUMÁRIO

| | p. |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| 1. CAPITULO I | 16 |
| Introdução..... | Erro! Indicador não definido. |
| Revisão de Literatura..... | Erro! Indicador não definido. |
| Referências | 25 |
| 2. CAPITULO II | 33 |
| Resumo | 34 |
| Abstract..... | 34 |
| Introdução | 35 |
| Material e Métodos | 37 |
| Resultados..... | 41 |
| Discussão..... | 44 |
| Conclusões | 48 |
| Referências | 49 |
| 3. ANEXO | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APWA – Água Peptonada Salina Alcalina
BAM – Bacteriological Analytical Manual Online
BP – Ágar Baird Parker
CR – Cais da Raposa
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
EE – Enterotoxina estafilocócica
FDA – Food and Drug Administration
FAO – Food and Agriculture Organization
FAPEMA – Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão
g – Grama
H₂S – Ácido Sulfídrico
IN – Instrução Normativa
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCSSN – Internacional Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen
Nomenclature
ISO/TS – The International Organization for Standardization/ Technical Specification
KP – Kanagawa Positiva
log – Logaritmo
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NMP – Número Mais Provável
NaCl – Cloreto de Sódio
Ng – Nanogramas
NSSP – National Shellfish Sanitation Program
pH – Potencial Hidrogeniônico
PB – Porto do Braga
PC – Porto do Cumbique
PD – Porto do Pau Deitado
ppm – Partículas por milímetro

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SCoN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa
SEI – Staphylococcal Enterotoxin Like
S – Latitude
SAS – Statistical Analysis System
TDH – Hemolisina Termoestável Direta
TRH – Hemolisina Termoestável Relativa
tdh – gene que codifica TDH
trh – gene que codifica TRH
Tnase – Enzima Termonuclease
TCBS – Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
UFC – Unidade Formadora de Colônias
USFDA – United States Food and Drug Administration
UEMA – Universidade Estadual do Maranhão
UFCG – Universidade Federal de Campina Grande
VNC – Viável Porém Não Cultivável
W – Longitude
WHO – World Health Organization

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO

O litoral maranhense é extenso e rico em áreas estuarinas, que são favoráveis ao desenvolvimento de diversos recursos pesqueiros como peixes, sururu, sarnambi e ostras (CAVALCANTI, 2003).

As ostras (*Crassostrea sp.*) são pertencentes à família *Ostreidae* e classe *Bivalvia*. Este gênero alberga espécies que habitam desde regiões costeiras podendo ser encontradas fixas às raízes aéreas da vegetação de mangue, e que também podem habitar as faixas entre marés, sendo encontradas em costões rochosos ou em bancos submersos (QUEIROZ e JÚNIOR, 1990).

A ostra é um alimento de grande valor nutricional, principalmente por ser uma rica fonte proteica e pelo seu alto teor de micronutrientes (CAVALCANTI, 2003).

Crassostrea sp. possui hábito alimentar filtrador com capacidade de filtrar até 10 litros de água por hora e cerca de 200 litros por dia (WARD, 1996). Devido a esta característica esses organismos podem absorver e acumular contaminantes químicos e microbianos em geral, uma vez que a seleção de partículas é feita somente pelo tamanho (GALVÃO et al., 2009).

A incidência de microrganismos e contaminantes em alimentos de origem marinha como as ostras, depende sobretudo da qualidade microbiológica do ambiente em que estes animais se encontram (BEIRÃO, 2000).

Huss (1997) afirmou que existem dois grupos de bactérias de importância para a saúde humana que podem contaminar os produtos de origem marinha: a) aqueles presentes no ambiente como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*; b) e bactérias da família Enterobacteriaceae como *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, e *Escherichia coli* que estão presentes no meio, devido a contaminação por dejetos humanos.

Devido o consumo *in natura* de ostras, ser uma prática comum e muito apreciada nas regiões litorâneas do Brasil, existe uma preocupação dos órgãos da saúde pública, que os considera alimentos de risco, uma vez que estão frequentemente envolvidos em casos de intoxicação e (PEREIRA, 2007; VIEIRA, 2008).

Vibrio sp. se destacam, por esse ser o principal gênero envolvido em surtos de toxinfecção alimentar com pescado (MOURA FILHO et al., 2007; NESPOLO, 2009).

A manifestação clínica da doença é provocada principalmente pela produção de hemolisinas. A doença provocada pelo *V. parahaemolyticus* é marcada por uma gastroenterite com um período médio de incubação de 15 a 19 horas, e duração de 2 a 3 dias, sendo que os principais sintomas são dores abdominais, náuseas, vômito e febre (BUTT et al., 2004).

No Brasil, não existe legislação específica voltada para a avaliação microbiológica de moluscos bivalves consumidos crus. A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12/2001 contempla somente moluscos bivalves cozidos, industrializados resfriados ou congelados.

Considerando a importância das ostras como recurso alimentar, a forma de consumo, a ausência de um monitoramento constate e uma legislação vigente, foi desenvolvido estudos microbiológicos em ostras obtidas a partir de depósitos naturais localizados em municípios da Ilha de São Luis, para a avaliação da qualidade deste alimento e confirmação de seu potencial como veiculadora de patógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Extração de Ostras no contexto econômico e social em Raposa e Paço do Lumiar

A prática de extração de moluscos bivalves remonta a períodos pré-históricos, quando as primeiras civilizações costumavam utiliza-los como moeda de troca e posteriormente como importante iguaria. Com o passar do tempo, a atividade perdurou e além de complemento na renda familiar de pescadores artesanais, seu foco de interesse foi além, passando a ter importância sob a ótica empresarial, por meio do implemento da Ostreicultura (MUEDAS e MOREIRA, 2000).

A ostra é um dos moluscos mais citados e explorados comercialmente devido ao seu valor alimentício e ao uso da concha como matéria-prima na fabricação de produtos industriais e medicinais (CHRISTO, 2006).

O Município de Raposa está localizado na microrregião da Aglomeração Urbana de São Luís, Mesorregião do Norte Maranhense, contém 29.775 habitantes, com uma área de aproximadamente 66,208 km². É destino alternativo à visitação na capital São Luís do Maranhão, tendo como principais atrativos os passeios nas praias e dunas da região, o vasto manguezal e apreciação da gastronomia por meio de pratos típicos baseados em frutos do mar (IBGE, 2015).

Raposa destaca-se por ser uma das cidades mais importantes do litoral maranhense pela condição pesqueira. Os moluscos extraídos são de alto valor nutritivo e representam uma alternativa de subsistência às comunidades pesqueiras, quer seja pelo consumo ou pela comercialização (FERREIRA et al., 2014).

Já Paço do Lumiar, outro município do estado do Maranhão, possui uma população de 117.877 habitantes e uma área de aproximadamente 122,828 km². Como é cercado por rios e regiões costeiras, muitos com influência das marés, ocorre a presença dos mangues que são importantes fontes de renda para parte de sua população, através do extrativismo (IBGE, 2015). A mariscagem de bivalves está entre as atividades mais comuns nos ecossistemas manguezais (PEDROZA-JÚNIOR, 2002).

As ostras são citadas com grande frequência no cenário econômico destas regiões, devido a sua abundância, seu tamanho que possibilita a venda em dúzia e seu sabor característico muito apreciado pelos turistas (MONTELES et al., 2009).

2.2 Biologia da *Crassostrea sp.*

As ostras são moluscos bivalves pertencentes ao Filo *Mollusca* e a Classe *Bivalvia*. São seres invertebrados, de simetria bilateral, que vivem exclusivamente na água, e são formados por duas valvas unidas dorsalmente por um ligamento (LIRA et al., 2001).

Estudos recentes de genética molecular de ostras confirmaram que existem duas espécies nativas da *Crassostrea sp.*, a *Crassostrea rhizophorae* fortemente associada a manguezais e a *Crassostrea brasiliiana*, geralmente associada a áreas lamacentas. A *Crassostrea gigas*, apesar de não ser nativa, é comumente encontrada no Brasil, geralmente encontrada fixa em costões rochosos (PEREIRA et al., 1998; MACCACCHERO et al., 2007; VARELA et al., 2007).

Ostras do gênero *Crassostrea sp.* apresentam conchas espessas, calcárias e frágeis, de tamanho e formato variável de acordo com o substrato de fixação e disponibilidade de alimento. São ovíparas e hermafroditas sequenciais, sem dimorfismo sexual e apresentam fecundação externa seguida de desenvolvimento larval, que permanece livre por 15 dias e após fixa-se a um substrato, e passa a fase sésil (BEGON et al., 2007).

As conchas das ostras do gênero *Crassostrea sp.* possuem valva direita maior e escavada e esquerda, que se encaixam através da cicatriz muscular, fruto da presença de um único músculo adutor, que se localiza nas proximidades da margem dorsal da concha (WAKAMATSU, 1973).

Assim como os demais moluscos são organismos filtradores, que bombeiam entre 0,5 a 4,0 litros de água por hora. Devido a esta característica, são capazes de reter contaminantes e microrganismos. Os microrganismos sobrevivem no estômago das ostras por certo período de tempo, mantendo seu poder infectivo, antes de serem atacados e digeridos por fagocitose. Este comportamento fisiológico causa uma concentração de microrganismos patogênicos na parte comestível do bivalve (CARROZZO, 1994; BEIRÃO et al., 2000).

2.3 Ostra como Alimento

A ostra é um alimento de grande valor nutricional, principalmente por ser uma rica fonte proteica e pelo seu alto teor de micronutrientes. É um importante constituinte da dieta das populações litorâneas, sendo o seu consumo um hábito alimentar diário em muitas comunidades de pescadores (CAVALCANTI, 2003).

A carne de ostra crua (por 100 g) é composta por 83,6 g de água, 8,9 g de proteína, 4,7 g de carboidratos disponíveis, 1,6 g de lipídios, 50 mg de colesterol, vitaminas D (5µg), E (0,85 mg), C (5 mg), B6 (0,1 mg), B12 (16,5 µg), 0,2 mg de riboflavina, 0,6 mg de ácido pantotênico, 0,13 mg de tiamina, além de minerais como cálcio (92 mg), magnésio (44 mg), sódio (280 mg), ferro (6,3 mg) e fósforo (165 mg). Seu valor calórico é de 69 kcal/100 g de carne de ostra crua (FAVIER et al., 1999).

2.4 Qualidade Microbiológica das Ostras

O consumo de moluscos bivalves marinhos como as ostras, é uma prática frequente nas regiões litorâneas do Brasil, onde são geralmente consumidas *in natura*, somente adicionadas de gotas de limão e sal a gosto. Esta prática proporciona um risco potencial para a saúde humana, pois os moluscos em seu processo natural de filtração acumulam sujidades e retém microrganismos em suspensão na água, com bactérias, leveduras, protozoários e vírus patogênicos, além de metais e outros componentes químicos tóxicos. Diante deste fato, existe uma grande preocupação principalmente quando essas fontes proteicas provêm de áreas poluídas ou contaminadas (BEIRÃO et al., 2000; WHO, 2005).

Muitos microrganismos patogênicos podem contaminar os alimentos marinhos, sendo que bactérias são frequentemente isoladas, e podem desencadear infecções intestinais, dermatológicas e sistêmicas. Coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas* e *Staphylococcus* configuram-se como indicadores de qualidade sanitária de grande importância e são frequentemente pesquisados em alimentos de origem dulcícola,

estuarina e marinhos (PEREIRA et al.,2004; PEREIRA et al., 2006; CHRISTO et al., 2008; SANTOS e VIEIRA, 2013).

Além das enterobactérias, a literatura relata infecções provocadas por *Vibrio spp.* tanto através da ingestão de produtos marinhos quanto através de ferimentos na pele, que podem ser infectados a partir de um ambiente marinho contaminado. Dessa forma, bactérias do gênero *Vibrio sp.*, são muito importantes quando se procura o diagnóstico para infecções de origem marinha.

A vulnerabilidade das ostras frente a microrganismos acarretam elevada perecibilidade ao produto, exigindo cuidado no manuseio e conservação, para garantir qualidade do alimento *in natura*.

2.5 Aspectos gerais e fatores de virulência do *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus é considerado um habitante comum dos estuários, sendo encontrada em todo o ambiente estuarino incluindo água, sedimentos, partículas suspensas, plâncton, peixes e moluscos, e é raramente encontrada em água doce (OLIVER e KAPER, 2001).

V. parahaemolyticus, pertence à família *Vibrionaceae*, e é uma bactéria Gram negativa na forma de bastonetes curvos, móveis por meio de flagelo polar e não esporogênico. É anaeróbio facultativo, apresentando metabolismo respiratório e fermentativo. Não cresce em substrato com concentração de NaCl inferior a 1% e superior a 8%. Não são redutores de H₂S em ágar Kligler, são positivos às reações de oxidase e gelatinase, reduzem nitrato em nitrito e fermentam a arabinose, galactose, manose, glicose e manitol e não fermentam a lactose, celobiose, sacarose, xilose, sorbitol e inusitol. A faixa de pH ótimo para crescimento em laboratório é entre 7,5 e 8,5. A temperatura ótima é 37°C (KONEMAN et al., 2008).

O crescimento e multiplicação dependem de fatores como salinidade, temperatura e concentração de zooplâncton. É frequentemente isolado ao longo do ano em climas tropicais e durante os meses de verão em climas frios ou temperados (NOVOTNY et al., 2004; HERNÁNDEZ et al., 2005).

Em baixas temperaturas os vibrios permanecem nos sedimentos do fundo do mar em concentração insuficiente para causar infecções. Sua concentração aumenta nos meses quentes, devido às condições ecológicas favoráveis e do plâncton, aumentando seu acúmulo em moluscos filtradores (GUTIÉRREZ e MARTOS, 1997).

Este microrganismo foi isolado pela primeira vez por Fujino em 1951, na cidade de Osaka, Japão, a partir de um surto de gastroenterite ocasionado pela ingestão de “*shirasu*”, que são sardinhas fervidas em salmoura, parcialmente desidratadas. Neste surto ocorreram 20 óbitos entre 272 casos (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Desde então, essa bactéria tem sido reconhecida como um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos marinhos, em muitos países, como Estados Unidos, França, México, Peru, Chile (SU e LIU, 2007; LAM et al., 2009).

As bactérias do gênero *Vibrio sp.* possuem a capacidade de se adaptar de maneira dinâmica às mudanças ambientais como temperatura, pH, salinidade e concentração de nutrientes, utilizando uma variedade de mecanismos genéticos e fisiológicos. Um destes mecanismos é denominado estado viável, mas não cultivável (VNC), onde as bactérias reduzem seu volume celular e adquirem a forma cocóide. Este fenômeno representa um estado de dormência, sobrevivência e persistência no meio ambiente. Neste caso o método convencional de cultivo em placas torna-se pouco adequado, sendo necessária a utilização de técnicas moleculares para sua detecção, pois esta técnica não necessita de cultivo (LLEÓ et al., 2001).

A virulência das cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* associadas a quadros de gastroenterites está principalmente relacionada à produção de uma hemolisina, cuja atividade é demonstrada com o aparecimento de áreas de β -hemólise em Ágar Wagatsuma (Meio básico acrescido de sangue humano). Este teste é denominado Kanagawa e está estreitamente relacionado com a enteropatogenicidade, sendo adotado como parâmetro na identificação de cepas patogênicas e não patogênicas. Essa atividade hemolítica é atribuída a hemolisina termoestável direta (TDH), codificada pelo gene *tdh*, que foi assim denominada devido ao fato de não ser inativada por aquecimento a 100°C por 10 minutos. (KAYSNER e DePAOLA, 2001).

A TDH é uma enterotoxina citotóxica, codificada pelo gene *tdh* que atua diretamente nos eritrócitos, levando a hemólise e aumento de permeabilidade vascular, além de atuar na desorganização do citoesqueleto com capacidade de induzir a apoptose das células do hospedeiro (LYNCH et al., 2005).

Okuda e Nishibuchi (1998) observaram a produção de uma hemolisina diferente da TDH em cepas Kanagawa negativas causadoras de doenças. Essa hemolisina foi denominada de hemolisina termoestável relativa (TRH) e é codificada pelo gene *trh*, que também é responsável pela produção de enteropatogenicidade.

Tem sido relatado que algumas cepas possuem capacidade de hidrolisar uréia, sugerindo uma forte correlação com a presença de TRH. A presença desses fatores de virulência geralmente ocorre em cepas oriundas de achados clínicos, enquanto naquelas isoladas de ambiente ou alimentos marinhos são apontados resultados negativos ou com percentuais oscilantes de até 1% no teste de Kanagawa e hidrólise de uréia (GONZALEZ et al., 2005).

A associação da capacidade de hidrolisar ureia com a presença do gene *trh* em cepas de *V. parahaemolyticus* é devido à ligação genética entre a estrutura do gene da uréase (*urec*) e *trh* no cromossomo de algumas espécies virulentas (IIDA et al., 1997).

2.6 A infecção no ser humano e ocorrência em ostras

V. parahaemolyticus é considerado uma bactéria de caráter emergente devido a sua associação com surtos epidêmicos após o consumo de alimentos, em especial pescados e moluscos consumidos *in natura* ou parcialmente submetidos à cocção. É o patógeno veiculado por alimentos marinhos que mais causa problemas de saúde pública no mundo (SU e LIU, 2007; NESPOLO, 2009).

A manifestação clínica mais comum da doença causada por *V. parahaemolyticus* é a gastroenterite, com um período médio de incubação de 15 a 19 horas, e duração de 2 a 3 dias. Os principais sintomas são dores abdominais, náuseas, vômito e febre (BUTT et al., 2004).

Geralmente é uma doença de curso autolimitante com gravidade moderada e de curta duração (BARKER e GANGAROSA, 1974).

Entretanto, casos severos e prolongados podem acontecer, como por exemplo, sepse que é caracterizada por febre ou hipotensão, podendo incluir sintomas como inchaço e dor nas extremidades do corpo, e em decorrência deste quadro severo o paciente poderá vir a óbito (KLONTZ, 1990; HALLY, 1995).

Existem relatos de infecções extraintestinais em ouvidos e olhos, após contato com águas naturais salgadas e casos de sepse seguida de óbito em pacientes com cirrose, no entanto, a frequência é relativamente baixa (WEST, 1989).

A dose infectante de células *V. parahaemolyticus* Kanagawa positiva (KP+) se situa na faixa de 10^6 a 10^9 células. Cepa KP+ isolada de um caso de gastroenterite não desencadeou sintomas de doença com uma dose de 200 células. No entanto, uma dose de 2×10^5 células de *V. parahaemolyticus* KP+ gerou desconforto abdominal em um de quatro pacientes, enquanto

uma dose de 3×10^7 células geraram desconforto abdominal e diarreia em dois de quatro pacientes (SANYAL e SEN, 1974 apud FDA, 2005).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de detectar a presença de *V. parahaemolyticus* em alimentos, principalmente de origem marinha.

Pereira et al. (2004) analisaram 40 amostras de ostras coletadas em restaurantes do Rio de Janeiro e 10 amostras de mexilhões capturados de banco natural de Niterói. Neste estudo, 141 cepas de *V. parahaemolyticus* foram isoladas, sendo a maioria originada de ostras. Todas as cepas foram testadas quanto ao fenômeno de Kanagawa e nenhuma apresentou positividade, enquanto no teste da hidrólise da uréia, 36% das cepas apresentaram-se como produtoras de uréase.

Pereira et al. (2007) após avaliação de 40 amostras de ostras servidas *in natura* em restaurantes do Rio de Janeiro, constataram a presença de *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* em 75% dos estabelecimentos. Os autores ainda ressaltaram que 40% dos estabelecimentos estocavam ostras a temperatura ambiente, o que constitui um risco para a saúde pública, pois propicia condições de multiplicação de patógenos no alimento.

Ramos (2007) pesquisou a presença de *Vibrio* spp. em 180 amostras de ostras cultivadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, sendo detectado em 25 (13,88%) amostras, deste total 9 (36%) amostras foram confirmadas como *V. parahaemolyticus*.

Lee et al. (2008) investigaram a incidência de *V. parahaemolyticus* e a presença dos genes *tdh* e *trh*, em 72 amostras de ostras cruas comercializadas em Seoul na Coreia, de abril a outubro de 2005, sendo encontrado um nível total de vibrio de 1 a 4log NMP/g de abril a dezembro em 48 amostras, com número total cerca de 4log NMP/g nos meses de agosto e setembro, nenhuma positividade para gene *tdh* e positividade para gene *trh* no mês de outubro. O estudo demonstrou que a prevalência e o número de *V. parahaemolyticus* foram dependentes da época do ano.

Sobrinho et al. (2010) observaram que a presença de *V. parahaemolyticus* em ostras cultivadas no litoral sul do estado de São Paulo, Brasil, é alta, mas cepas patogênicas são raramente detectadas.

Sobrinho et al. (2011) detectaram *V. parahaemolyticus* em 100% das 74 amostras de ostras comercializadas por vendedores em quiosques de praias, restaurantes e supermercados e em 89,3% das amostras de ostras comercializadas em cidades da China.

Rodrigues e Carvalho Filho (2011) encontraram *V. parahaemolyticus* em 85,7% das 84 amostras de ostras analisadas em todas as etapas de processamento (cultivo até o consumo final), o que comprova grande ocorrência deste agente em ostras.

2.7 Padrão Microbiológico para moluscos bivalves: Legislação Vigente

A legislação brasileira, por meio da RDC nº 12/01 do Ministério da Saúde, estabelece que a carne de moluscos bivalves *in natura*, resfriada ou congelada, está apta para o consumo humano quando no produto, *Salmonella* sp. estiver ausente em 25g e a contagem em unidade formadora de colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva não ultrapassar o limite de 10^3 NMP/g. O limite máximo permitido de *V. parahaemolyticus*, é estabelecido apenas para pratos prontos à base de pescados, em cozinhas, restaurantes e similares, sendo este de 10^3 cél/g.

As contagens de microrganismos tolerados pela RDC nº 12/01, para moluscos bivalves, resfriados ou congelados, referem-se ao molusco não consumido cru. No entanto sabe-se que moluscos são, tradicionalmente, consumidos crus ou levemente cozidos. Desta forma, são vistos como alimento de alto risco, pois são frequentemente associados com intoxicações alimentares (BEIRÃO et al., 2000).

De acordo com os padrões da Nova Zelândia e Japão, o nível máximo permitido de *V. parahaemolyticus* em mariscos consumidos crus é 100 NMP/g (LEE et al., 2008), enquanto USFDA (United States Food and Drug Administration) requer menos que 10.000 NMP/g (FAO/WHO, 2002). Isto porque, a partir de dados sobre surtos nos Estados Unidos foi possível determinar que a dose infectiva mínima de *V. parahaemolyticus* é 10^5 células.

O FDA demonstrou que o número de *V. parahaemolyticus* encontrado em ostras oriundas de locais nos EUA com histórico de surtos em 1998 foi de 100 a 1.000 células (KAYSNER e DePAOLA, 2001).

A legislação internacional para a produção e comercialização de moluscos bivalves é extremamente rigorosa, considerando os numerosos casos de doenças associados ao consumo de frutos do mar contaminados (RICHARDS, 2003; YOUNGER et al., 2003).

A maioria das nações que produzem alimentos de origem marinha apresenta legislação própria, baseadas em regulamentações de grandes mercados como a União Europeia e os Estados Unidos. A Diretriz Europeia 91/492/EEC, de 15 de Julho de 1991 (EUROPEAN COMMUNITIES, 1991), estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação de moluscos bivalves vivos no mercado comum europeu. As áreas demarcadas para o cultivo

são classificadas de acordo com a qualidade microbiológica da carne dos moluscos produzidos nestas áreas.

A legislação americana baseia-se na qualidade microbiológica das águas de cultivo (NSSP-FDA, 2003). A produção de moluscos provenientes de áreas classificadas como restritas, deve obrigatoriamente, como na legislação da União Europeia, passar por um sistema de purificação ou ser transportada para áreas de qualidade microbiológica superior, previamente à sua introdução no mercado (CORRÊA, 2006).

3 REFERÊNCIAS

ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos da *Staphylococcus spp.* **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 74, n. 3, p. 2007-2013, Sao Paulo, 2007.

BARKER, W.H.; GANGAROSA, E.J. Food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*. **Ann. Rev. Med.**, v. 25, p. 75-81, 1974.

BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J. **Ecologia: de Indivíduos a Ecossistemas**. 4ª Edição, Tradutores: Adriano Sanches Melo, Júlio César Bicca-Marques, Paulo Luiz de Oliveira e Sandra Maria Hartz. Capítulo 4: Natalidade, Mortalidade e História de vida, p. 89 – 130. Editora Artmed, Porto Alegre, 2007. ISBN 978-85-363-0884-5.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M. **Processamento e industrialização de moluscos**. In: Seminário e workshop tecnologias para o aproveitamento integral do pescado. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000. p.38-84.

BEUCHAT, L.R. Interacting Effects of pH, Temperature, and Salt Concentration on Growth and Survival of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 844-846, 1973.

BERGDOLL, M.S.; SURGALLA, M.J.; DACK, G.M. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. **Journal of Immunology**, v.83, p.334-338, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10jan.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Cidades. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>.

BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K.E.; SANDERS, C.V. Infections related to the ingestion of seafood. Part I. Viral and bacterial infections. **Lancet Infection Diseases**, v.4, n.4, p. 201-212, 2004.

CARROZZO, G. **Contaminação Bacteriana em bivalves comestíveis da Enseada dos Tainheiros e comercializados em feiras livres de Salvador**. 1994. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal da Bahia.

CAVALCANTI, A. D. Monitoring of trace elements in oysters marketed in Recife, Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.19, p. 1545-1551. 2003.

CHRISTO, S. W.; ABSHER, T. M.; KOLM, H. E.; CRUZ-KALED, A. C. Qualidade da água em área de cultivo de ostras na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.14, n.1, p. 67-71, 2008.

CHRISTO, S.W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea sacco*, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): um subsídio ao cultivo**. Doutorado em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 2006.

CORRÊA, A.A. **Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium***. 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Risk assessment of *Campylobacter***

spp. in broiler chickens and Vibrio spp. in seafood. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand 5–9 August 2002.

FAVIER, J.C.; IRELAND-RIPERT, J.; TOQUE, C.; FEINBERG, M. **Relatório geral dos alimentos – tabela de composição.** 2º ed. Ed. Roca Ltda, São Paulo, p. 474, 1999.

FDA. US Food and Drug Administration. 2005. Quantitative Risk Assessment on the Public Health Impact of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Oysters. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/V.parahaemolyticusra-toc.html>>.

GALTSOFF, P. S. The Fecundity of the Oyster. **Science, New Series.** v. 72, n. 1856, p. 97-98, 1930.

GALVÃO, P.M.A.; REBELO, M.F.; GUIMARÃES, J.R.D.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol.**, v. 13, n. 2, p.59-66, 2009.

GONZÁLEZ, E. N.; CACHICAR, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M.L.; VERGARA, J.A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea. Chile, 1998 and 2004. **Emerg. Infect. Dis**, v.11, n. 1, p. 129–131, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; MARTOS, P.G. *Vibrios* de origen marino em patologia humana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 15, p. 383-388, 1997.

HALLY, RJ; RUBIN RA; FRAIMOV, HS; HOFFMAN-TERRY, ML. Fatal *Vibrio parahaemolyticus* septicemia in a patient with cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 40, p. 1257–60, 1995.

HERNANDÉZ, C.; ULLOA, J.; VERGARA, J.A.; ESPEJO, R.; CABELLO, F. *Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergente public health problems in Chile. *Rev Med Chile.* v.133, n.(9), p.1081-8, 2005.

HUSS, H. H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. Roma: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, 1997. 176 p. (Documento Técnico sobre as Pescas, n. 334).

IIDA, T.; SUTHIENKUL, K.S.; PARK, G.Q.; TANG, R. K.; YAMAMOTO, M.; ISHIBASHI, K.; YAMAMOTO, T.; HONDA. Evidence for genetic linkage the ure and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Med. Microbiol**, v. 46, p. 639–645, 1997.

KAYSNER, C.A.; DePAOLA, A. Vibrio. In: DOWNES, F.P.; ITO, K.; eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 40, p. 405-420.

KLONTZ, KC. Fatalities associated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* non-O1 infections in Florida (1981 to 1988). **Southern Medical Journal**, v. 83, p. 500– 02, 1990.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**, 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008, 1565p.

LAM, T.; WONG, C. Review of notifiable diseases in 2008. **Public Health Epidemiol Bull**. v.18, n.(2), p.31-42, 2009.

LEE, J.K.; JUNG, D.W.; EOM, S.Y.; OH, S.W.; KIM, Y.; KWAK, H.S.; KIM, Y.H. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. **Food Control**, v. 19, p. 990-994, 2008.

LIRA, A. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados na Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.15, n.(90), p.91, 2001.

LLEÒ, M.M. Resuscitation rate in diferente enterococcal species in the viable but nonculturable state. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, n.(6), p.1095-1102, 2001.

LYNCH, T.; LIVINGSTONE, S.; BUENAVENTURA, E.; LUTTER, E.; FEDWICK, J.; BURET, A.G.; GRAHAM, D.; DEVINNEY, R. *Vibrio parahaemolyticus* disruption of

epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. *Infect Immun.* v.73, p.1275-1283, 2005.

MACCACCHERO, G. B.; FERREIRA, J. F.; GUZENSKI, J. Influence of stocking density and culture management on growth and mortality of the mangrove native oyster *Crassostrea sp.* **In southern Brazil. Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 47-53, 2007.

MACHADO, Alice Beatriz Mombach Pinheiro. **Resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA* nos *Staphylococcus spp* coagulase negativa.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado, Rio Grande do Sul, 2007.

MONTELES, J.S.; CASTRO, T.C.S.; VIANA, D.C.P.; CONCEIÇÃO, F.S.; FRANÇA, V.L.; FUNO, I.C.S.A. **Percepção sócio-ambiental das marisqueiras no município de Raposa, Maranhão, Brasil.** *Rev. Bras. Eng. Pesca* 4(2): 34-45, 2009.

MOURA FILHO, L. G. M.; MENDES, E. S.; SILVA, R. P. P.; GOES, L. M. N. B.; VIEIRA, K.P. B. A.; MENDES, P. P. Enumeração e pesquisa de *Vibrio spp.* e coliformes totais e termotolerantes em sashimis de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 85-90, 2007.

MUEDAS, Walter; MOREIRA Isabela C. N. **Sururu no Maranhão: Cultivos experimentais de “sururu” (*Mytella falcata*, Orbigny 1842) em Alcântara/MA.** 2000.

NESPOLO, N. M. Características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do Estado de São Paulo, 2009. 67f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp (Universidade Estadual Paulista), 2009

NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. **Veterinária Medicina, República Tcheca**, v. 49, n. 9, p. 343-358, set. 2004.

OKUDA, J.; NISHIBUCHI, M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change

in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. **Molecular Microbiology**, v.30, n.3, p.499-511, 1998.

OLIVER, J.D., AND KAPER, J.B. *Vibrio* Species. In M. P. DOYLE, L. R. BEUCHAT, AND T. J. MONTVILLE, eds. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2.ed. Washington: ASM Press, 2001. 872p.

PEDROZA-JÚNIOR, H. S.; SOARES, M. G.; MELO-JÚNIOR, M.; BARROS, H. M.; SOARES, A. P. **Aspectos etnobiológicos da pesca e comercialização de moluscos e crustáceos do canal de santa cruz, Itapissuma – PE**. 2002. UFPE.

PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) *in natura* e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 27: 387-390, 2007.

PEREIRA, M. A. *et al.* Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis – Brasil. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 2, 2006.

PEREIRA, C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 4, p. 591-595, out-dez, 2004.

PEREIRA, A.; TEIXEIRA, A.L.; POLI, C.R.; BROGNOLI, F.F.; SILVA, F.C. da; RUPP, G.S.; SILVEIRA, JR, N.; ARAUJO, S.C. **Biologia e cultivo de ostras**. Florianópolis: UFSC. 70p. 1998.

QUEIROZ, C.; JÚNIOR, N.S. **Cultivo de ostras**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Ed. ACARESC. 1990. 25p.

RAMOS, R.J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina**. Florianópolis, 2007. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

RICHARDS, G.P. The evolution of molluscan shellfish safety. **Molluscan Shellfish Safety**, Galicia: Grafanova S.A., p. 221-245, 2003.

RODRIGUES, L. A. P.; CARVALHO FILHO, C. D. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* nas Etapas de Beneficiamento de Ostras (*Crassostrea rhizophorae*), cultivadas na Baía de Todos os Santos - BA, e Determinação dos Pontos Críticos de Controle. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.13, n.2, p.77-83, 2011.

SANTOS, C. A. M. L.; VIEIRA, R. H. S. F. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n.4, p. 219-228, 2013.

SOBRINHO, P. S. C.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D.G.M.; LANDGRAF, M. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. **Food Microbiology**, v.28, p. 137-140, 2011.

SOBRINHO, P. S. C.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of Sao Paulo state, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Feb. 2010, p. 1290–1293.

SU, Y.C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **Food Microbiology**, v. 24, p. 549-558, 2007.

VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N. do S.; TAGLIARO, A. C. H. Molecular phylogeny of Mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**, v. 73, p. 229-234, 2007.

VIEIRA, R.H.S.F; ATAYDE, M.A.; CARVALHO, E.M.R.; CARVALHO, F.C.T.; FILHO, A.A.F. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e

sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 45:180-189, 2008.

WAKAMATSU, T. **A ostra de Cananéia e o seu cultivo**. SUDELPA, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 1973.141p.

WARD, J. E. Biodynamics of suspension feeding in adult bivalve molluscs: Particle capture, processing, and fate. **Invertebrate Biology**, v. 115, p. 218-231, 1996.

WEST, P.A. The human pathogenic Vibrios -A public health update with environmental perspectives. **Epidemiology and Infection**, v. 103, p. 1-34, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), “Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters”, Microbiological Risk Assessment Series, Chapter 8, 2005.

YOUNGER, A.D.; LEE, R. J & LEES, D.N. Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas in England and Wales – rationale and approach. *Molluscan Shellfish Safety*. Galicia: Grafanova S.A., p. 265-277, 2003.

CAPITULO II

*Artigo segundo as normas da Revista do Instituto Adolfo Lutz – RIAL

Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras (*Crassostrea sp.*), extraídas dos municípios de Raposa e Paço do Lumiar, na Ilha de São Luis/MA

Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus sp.* in oysters (*Crassostrea sp.*), extracted from the municipalities of Fox and Palace of Lumiar, on the island of São Luis/ MA

Ericka Bruna GALVÃO¹, Luciana da Silva BASTOS¹, Felício Garino Júnior², Francisca Neide COSTA^{3*}

¹Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos, Departamento de Patologia Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

²Departamento de Patologia Veterinária, Campus Patos, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

^{3*}Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Cidade Universitária Paulo VI, s/n - Tirirical, São Luís - MA, 65055-000. Tel (98) 3244-0915. E-mail: francisca.cca.uema@gmail.com.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão - FAPEMA

Ericka Bruna Galvão, Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras (*Crassostrea sp.*), extraídas de ambientes naturais na Ilha de São Luis/MA, 2016, Programa de pós-graduação Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras extraídas de quatro pontos distribuídos nos municípios de Raposa e Paço do Lumiar, na Ilha de São Luis/MA. Foram 16 coletas, totalizando 768 ostras analisadas, em um período de oito meses. Para avaliação do *V. parahaemolyticus* foi utilizado os métodos descritos por *Bacteriological Analytical Manual online*. A contagem de *V. parahaemolyticus* variou entre os pontos de coleta de <3 a 5,5 NMP/g. De 64 amostras de ostras isolou-se 81 cepas de *Vibrio spp*, onde 9 cepas foram positivas para *V. parahaemolyticus*. Destas 9, 8 (88,8%) apresentaram positividade para os testes de patogenicidade. Estes resultados mostram que nas condições deste estudo, a contagem e isolamento de *V. parahaemolyticus* podem ser consideradas baixas, no entanto a maioria das cepas confirmadas revelaram potencial patogênico, sugerindo possíveis riscos para a saúde pública.

Palavras-chave: molusco bivalve, qualidade microbiológica, saúde pública.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *Vibrio parahaemolyticus* count in oysters, extracted from mangroves and rocks, at four points distributed in the municipalities of Paço do Lumiar and Fox, on the island of Sao Luis / MA. 64 oyster samples were collected from the genus *Crassostrea sp.* For microbiological assessment of *V. parahaemolyticus* was used the methods described by the *Bacteriological Analytical Manual online*. The *V. parahaemolyticus* count ranged from <collection points 3 to 5.5 MPN / g. 64 samples of oysters isolated 81 strains of *Vibrio spp*, where 9 strains were positive for *V. parahaemolyticus*. Of these 9, 8 (88.8%) strains were positive for the pathogenicity tests. These results show that under the conditions of this study, the counting and isolation of *V. parahaemolyticus* can be considered low, however most confirmed strains revealed pathogenic potential, indicating possible risks for public health.

Keywords: bivalve mollusk, microbiological quality, public health.

INTRODUÇÃO

O litoral maranhense é rico em áreas estuarinas, favoráveis ao desenvolvimento de diversos recursos pesqueiros como peixes, sururu, sarnambi e ostras¹.

O Estado do Maranhão tem o segundo maior litoral e é o segundo maior produtor de pescado da Região Nordeste, compreendendo cerca de oitenta por cento do manguezal brasileiro. Nesse cenário os municípios de Raposa e Paço do Lumiar se destacam pelas condições litorâneas e pelos ricos manguezais, fazendo com que o pescado e mariscos sejam a principal fonte de renda e alimentação da população local².

A ostra é um alimento de grande valor nutricional, principalmente por ser uma rica fonte proteica e pelo seu alto teor de micronutrientes¹.

Crassostrea sp. são pertencentes à família *Ostreidae* e classe *Bivalvia*. Este gênero alberga espécies que habitam desde regiões costeiras e também podem ser encontradas fixas às raízes aéreas da vegetação de mangue, ocorrendo também na faixa entre marés de costões rochosos ou em bancos submersos³.

A ostra possui como os demais moluscos, um hábito alimentar filtrador e devido a esta característica, podem absorver e acumular contaminantes químicos e microbianos em gera⁴.

A preferência pelo consumo *in natura*, nos chama a atenção, uma vez que alimentos crus ou mal cozidos são importantes veiculadores de doenças.

Vale ressaltar que como tem a capacidade de absorver o que está no ecossistema aquático, então a qualidade microbiológica das ostras e outros moluscos filtradores, depende, em grande parte, da qualidade microbiológica do ambiente em que estes animais se encontram⁵.

Huss⁶, esclareceu que existem dois grupos de bactérias de importância para a saúde humana que podem contaminar os produtos de origem marinha, que são aqueles presentes no

ambiente como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*; e as bactérias da família *Enterobacteriaceae* como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., e *Escherichia coli* que estão presentes no meio, devido a contaminação por dejetos humanos.

As bactérias do gênero *Vibrio* se destacam, por esse ser o principal gênero envolvido em surtos de toxinfecção alimentar com pescado^{7,8}.

As espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, com exceção do *Vibrio cholerae*, ocorrem naturalmente em ambientes marinhos e estuarinos. O *V. parahaemolyticus*, é halófilo obrigatório, mesófilo, que multiplica-se ainda mais rápido em épocas mais quentes⁹.

Segundo Boutin et al.¹⁰, *V. parahaemolyticus* tem um poder invasor considerável, podendo se espalhar pelo organismo através do sistema circulatório ou linfático, provocando até mesmo sepsis.

V. parahaemolyticus produz uma enterotoxina similar a de *V. cholerae*, sendo capaz de inflamar a mucosa do intestino delgado. Apresenta um período médio de incubação de 17 horas, diarreia aquosa, dores abdominais, cólica leve a moderada, náusea e vômito, dor de cabeça em 40% dos casos e febre em 25%. Em quase 1/3 dos casos a diarreia tem a forma sanguinolenta¹¹.

A virulência das cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* relacionadas a quadros de gastroenterites está principalmente relacionada à produção de uma hemolisina, cuja atividade é demonstrada com o aparecimento de áreas de β -hemólise em Ágar Wagatsuma (Meio básico acrescido de sangue humano). Este teste denominado Kanagawa e está estreitamente relacionado com a enteropatogenicidade, sendo adotado como parâmetro na identificação de cepas patogênicas e não patogênicas. Essa atividade hemolítica é atribuída a hemolisina termoestável direta (TDH), que foi assim denominada devido ao fato de não ser inativada por aquecimento a 100°C por 10 minutos. Outra hemolisina também é reconhecida como fator

responsável pela produção de enteropatogenicidade, é a hemolisina termoestável relativa (TRH)¹².

No Brasil, não existe legislação específica voltada para a avaliação microbiológica de moluscos bivalves consumidos crus. A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12/2001¹³ contempla somente moluscos bivalves cozidos, industrializados resfriados ou congelados. Dessa forma, os cuidados com estes alimentos devem ser redobrados e os consumidores devem ser informados sobre a qualidade higiênica e sanitária e o risco que correm ao consumirem ostras *in natura*.

Levando-se em conta as extensas faixas litorâneas do país e do Estado do Maranhão, são discretas as informações sobre a ocorrência de *V. parahaemolyticus*, uma vez que é uma bactéria estritamente marinha.

Considerando a importância das ostras como recurso alimentar em nossa região, objetivou-se nesta pesquisa, avaliar a ocorrência destes dois microrganismos de relevância para a saúde pública, bem como identificar cepas patogênicas, conhecendo desta forma, o potencial de ostras como veiculadoras de doenças.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação dos pontos de coleta

Os pontos foram identificados a partir de informações dadas pelos marisqueiros a cerca dos bancos naturais para extração, e o reconhecimento desses pontos foi feito via transporte terrestre e embarcação a motor, nos referidos municípios da Ilha de São Luís.

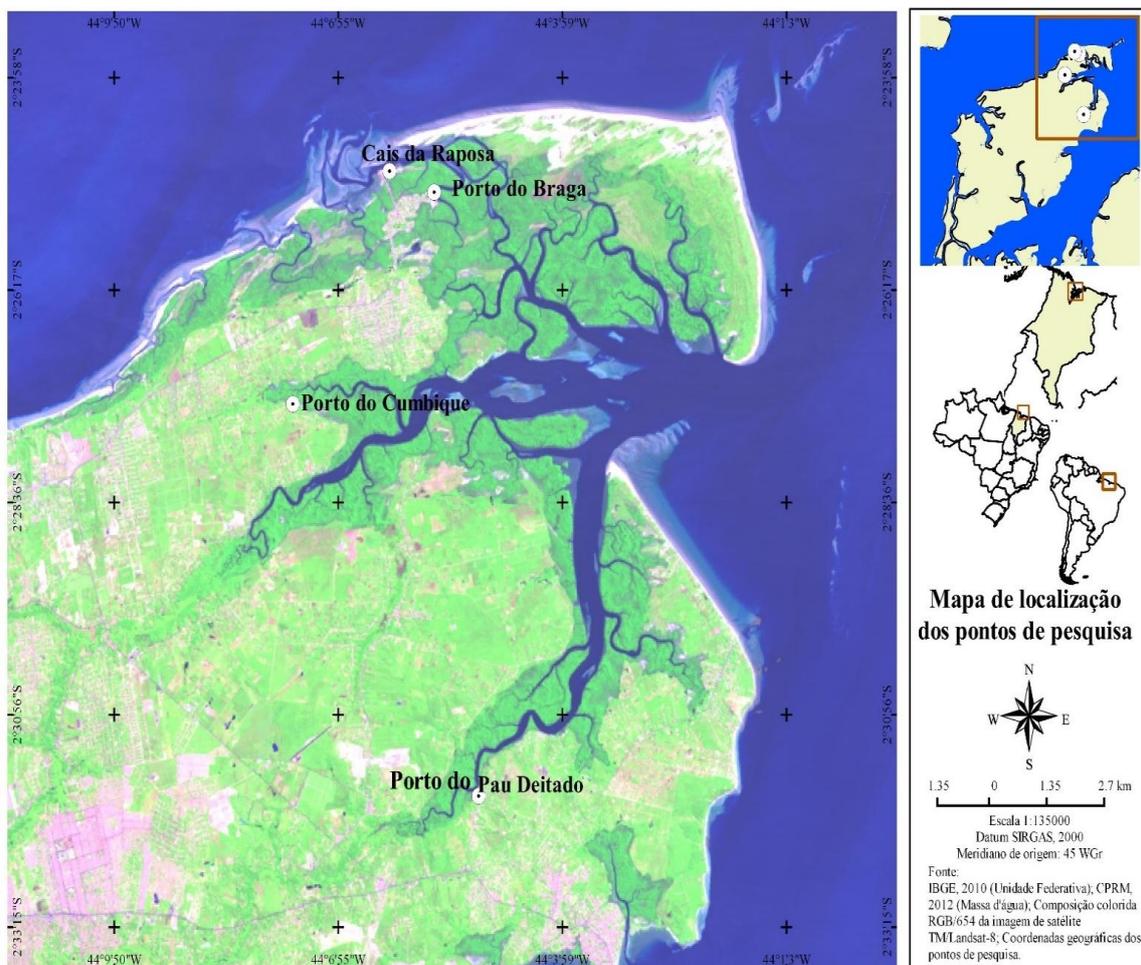


Figura 1. Localização dos pontos de coleta das ostras na Ilha de São Luís – MA, Brasil, 2014.

Quatro pontos de extração foram identificados e georreferenciados, sendo dois no município de Raposa: Porto do Braga (S 02°25'215"/W 044°05'660") e Cais da Raposa (S 02°24'985"/W 044°06'243") e dois no município de Paço do Lumiar: Porto do Cumbique (S 02°27'531"/W 044°07'507") e Porto Pau Deitado (S 02°31'818"/W 044°05'080").



Figura 2. Locais de coleta das ostras. A - Porto do Pau Deitado (Paço do Lumiar/MA); B - Porto do Cumbique (Paço do Lumiar/MA); C - Porto do Braga (Raposa/MA); D – Cais da Raposa (Raposa/MA), 2014.

Amostragem

Foram realizadas 16 coletas, somando um total de 64 amostras, coletadas em intervalos quinzenais, entre os meses de maio a dezembro de 2014. Cada amostra foi constituída por 12 ostras, conforme método analítico descrito por Kaysner e DePaola¹³, totalizando 768 ostras analisadas. As amostras de cada ponto foram acondicionadas, separadamente e transportadas em caixas isotérmicas refrigeradas até o Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos da UEMA, para imediata análise microbiológica.

Preparo Inicial das Amostras

No laboratório as ostras foram lavadas cuidadosamente em água corrente com o auxílio de escova limpa para remoção de resíduos externos. Em seguida foram abertas utilizando-se facas estéreis, para se retirar o conteúdo interno composto por líquido intervalvar e músculo, depositados em placas de Petri estéreis, para pesagem de 25 gramas.

Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*

Para acompanhamento dos testes para *V. parahaemolyticus*, utilizou-se uma cultura controle (271315), cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ.

Para a pesquisa microbiológica do *V. parahaemolyticus* utilizou-se os métodos descritos pelo *Bacteriological Analytical Manual online* (Elliot, Kaysner e Tamplin²⁰), com modificações segundo a ISO/TS-21872-1, para temperatura.

O estudo da virulência foi realizado a partir da verificação do fenômeno Kanagawa, conforme *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*¹³.

Os valores de salinidade foram avaliados através de salinômetro YSI modelo 33, como possível fator de influência no isolamento de *V. parahaemolyticus*.

Após etapa inicial de diluição em triplicata (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), o enriquecimento foi feito homogeneizando-se 25 g de amostra de ostra em 225 mL de Água Peptonada Salina Alcalina (APWA), e incubou-se em estufa bacteriológica de 42°C/18-24h. A partir do crescimento bacteriano em APWA, coletou-se uma alçada das células que ficam concentradas na superfície do meio e foram semeadas em placas contendo Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), incubadas a 45°C/18-24h. Após o crescimento, foi selecionado 3 a 4 colônias não fermentadoras de sacarose (caracterizadas por colônias verdes), que foram então submetidas aos testes bioquímicos para confirmação. Confirmadas as cepas como *V. parahaemolyticus*, realizou a pesquisa de hemólise em Ágar Wagatsuma acrescido de sangue humano, para verificação da produção da hemolisina TDH.

A produção da enzima uréase também foi pesquisada como um fator de virulência, geralmente relacionada à produção da hemolisina TRH.

Após identificação bioquímica final, procedeu-se a contagem de *V. parahaemolyticus* utilizando a tabela de NMP/g (Número mais provável), quando se analisam três tubos por diluição, segundo *Bacteriological Analytical Manual online*.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o sistema de Análises Estatísticas (SAS-*Statistical Analylis System*), através de teste de Tukey, com nível 5% de significância. Para efeito de normalidade os dados foram transformados em log10.

RESULTADOS

Os resultados da contagem e isolamento do *Vibrio parahaemolyticus*, nos diferentes pontos de coleta estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Contagem e isolamento de *V. parahaemolyticus* em ostras do gênero *Crassostrea sp.* coletadas entre os meses de maio a dezembro, na Ilha de São Luís/MA, 2014.

| Pontos de Coleta | Número de Amostras | Média NMP/g | Amostras Confirmadas |
|-------------------|--------------------|-------------|----------------------|
| Porto do Braga | 16 | 5,5 | 2 (12,5%) |
| Cais da Raposa | 16 | 4,6 | 4 (25 %) |
| Porto Cumbique | 16 | 3,1 | 2 (12,5%) |
| Porto Pau Deitado | 16 | 3,3 | 1 (6,25%) |
| TOTAL | 64 | - | 9 (14,06%) |

NMP – Número mais provável por grama de amostra. As médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Pelos dados apresentados na Tabela 1, observa-se que do total de 64 amostras analisadas, 9 (14,06%), das amostras foram confirmadas para *V. parahaemolyticus* e a contagem em média de NMP variou de 3,1 a 5,5 NMP/g.

Não foram observadas diferenças significativas entre as médias de NMP/g para os pontos de extração coletados, então pode-se afirmar que nos quatro pontos de coleta, as contagens desta bactéria foi semelhante.

Tabela 2. Valores de salinidade em águas coletadas nos quatro pontos de extração de ostras, Ilha de São Luís, 2014.

| Pontos de Coleta | Média%/DP salinidade | Média%/DP temperatura | Média NMP/g | Amostras Isoladas |
|------------------|----------------------|-----------------------|-------------|-------------------|
| PB | 34±0,81 | 30±0,97 | 5,5x10 | 2 (12,5%) |
| CR | 35,5±0,87 | 29,8±0,42 | 4,6x10 | 4 (25 %) |
| PC | 32,25±1,93 | 29,7±0,59 | 3,1x10 | 2 (12,5%) |
| PD | 28±1,96 | 29,8±0,98 | 3,3x10 | 1 (6,25%) |
| TOTAL | | | - | 9 (14,06%) |

PB – Porto do Braga; CR – Cais da Raposa; PC – Porto do Cumbique; PD – Porto do Pau Deitado; DP – Desvio padrão. As médias diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

De acordo com a Resolução CONAMA³², alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011, as águas salobras apresentam salinidade superior a 0,5 e inferior a 30, enquanto águas salinas possui valor igual ou superior a 30. A salinidade mínima encontrada neste estudo foi de 28% e a máxima 35,5%. Sendo observada diferença estatística entre as médias de salinidade nas águas dos diferentes pontos investigados ($p < 0,05$). Dessa forma, as águas provenientes do Porto do Pau Deitado podem ser classificadas como salobras, enquanto as do Porto do Braga, Cais da Raposa e Porto do Cumbique podem ser classificadas como salinas, conforme demonstrado na Tabela 2.

Os pontos de coleta localizados no município de Raposa (Porto do Braga e Cais da Raposa) identificados com a maior salinidade, foi também onde se observou as maiores médias de contagem para *V. parahaemolyticus*.

O isolamento de *V. parahaemolyticus* neste estudo mostrou, estatisticamente que há correlação positiva da salinidade das águas com o isolamento do *V. parahaemolyticus*, como mostra a Tabela 2. Indicando que a população de *V. parahaemolyticus*, pode ter sido influenciada pela variação de salinidade.

A média pluviométrica foi verificada a partir dos dados disponíveis no IMPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais), e observou-se que o mês de maio/2014, foi o de maior índice pluviométrico, e também coincidiu com o mês onde se obteve o maior número de isolados.

A média de temperatura das águas durante o período da pesquisa variou de 29,7°C a 30°C. Em decorrência da baixa variação de temperatura não se pode avaliar a influência da mesma sobre a contagem e isolamento de *V. parahaemolyticus*.

A partir do exposto, pode-se verificar que a temperatura e pluviosidade, parecem ter influenciado no isolamento de *V. parahaemolyticus* nesta pesquisa.

Patogenicidade

Tabela 3. Identificação de patogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus* isolados em ostras do gênero *Crassostrea*, São Luis – MA, 2014.

| Identificação da cepa | Teste Kanagawa | Prova de Urease | Patogenicidade |
|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|
| a21pb | + | - | Sim |
| a22cr | + | - | Sim |
| a23pd | + | - | Sim |
| a24pc | + | + | Sim |
| a26cr | + | - | Sim |
| a28pc | + | - | Sim |
| a30cr | - | + | Sim |
| a45pb | + | + | Sim |
| a82cr | - | - | Não |
| TOTAL | 7 | 3 | 8 |

pb - Portodo Braga; cr - Cais da Raposa; pc – Porto do Cumbique; pd – Porto do Pau Deitado

Diante da sua relevância epidemiológica, as cepas de *V. parahaemolyticus* foram analisadas quanto ao potencial patogênico, através do fenômeno Kanagawa em Ágar contendo

sangue humano para identificar a presença da hemolisina termoestável direta. E também foi verificada a capacidade de hidrolisar ureia, uma vez que está diretamente relacionada com a presença da hemolisina termoestável relativa.

Observa-se na Tabela 3, que 7 (78%) das 9 cepas de *V. parahaemolyticus* apresentaram positividade para este teste, uma característica relevante a ser considerada, uma vez que a maioria de isolados patogênicos são obtidos a partir de amostras clínicas. Quanto a prova da uréase, 3 (33%) de 9 das cepas hidrolisaram a ureia.

Esses dados são de extrema relevância para a saúde pública, pois apesar de não ter sido verificado altas contagens desta bactéria nesta pesquisa, no entanto foi confirmado que quase a totalidade das cepas de *V. parahaemolyticus* apresentaram potencial patogênico.

DISCUSSÃO

A Resolução da Diretoria Colegiada¹³, estabelece os padrões microbiológicos para contagens em alimentos, porém não estabelece para moluscos bivalves consumidos crus, que é a forma mais comum de consumo das ostras na Ilha de São Luís-MA. Essa ausência de regulamentação da Lei Brasileira dificulta a avaliação microbiológica desse alimento, e constitui uma insegurança para os que consomem este molusco.

Aliado ao fato de não haver uma legislação específica, também não há um monitoramento constante deste microrganismo a nível ambiental e muito menos em casos de diarreia, o que se confirma pela ausência de dados no sistema de nacional saúde, de casos ou surtos envolvendo *V. parahaemolyticus*. Essas falhas geram dúvidas, uma vez que este microrganismo é de primordial importância quando se fala de produtos marinhos.

Muitos dados apresentados em pesquisas destacam que as enfermidades veiculadas por alimentos são frequentes no Brasil, e diversos casos estão associados ao consumo de alimentos de origem marinha^{16,17,18}.

Apesar de não haver legislação específica para este alimento, podemos inferir que as contagens obtidas neste estudo foram baixas. Estes dados podem estar relacionadas a uma adaptação desenvolvida pelo *V. parahaemolyticus*, citada e confirmada por diversos autores, onde em condições adversas são capazes de produzir células viáveis que se tornam não cultiváveis, e somente em condições de ambiente e temperatura ideal podem se multiplicar e alcançar níveis que represente risco a saúde do consumidor. Esse estado celular pode tornar as cepas patogênicas mais resistentes aos métodos convencionais de processamento de alimentos. Então a dificuldade de isolamento e a não detecção do agente, por vezes pode estar relacionado a existência de células viáveis, porém não cultiváveis^{19,20}.

Diversos trabalhos de investigação da ocorrência desta bactéria em moluscos a nível ambiental também aparecem com contagens baixas, assemelhando-se aos resultados deste trabalho.

Souza²¹, investigando a incidência de *V. parahaemolyticus* em 12 amostras de ostras (*Crassostrea sp.*), provenientes de um criadouro natural, no estuário do rio Cocó, Fortaleza/CE, confirmou a presença de *V. parahaemolyticus* em apenas uma amostra, e a contagem variou de <3 a 7 NMP/g.

Ramos²², realizou a contagem de *V. parahaemolyticus* de 180 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) coletadas em seis diferentes regiões de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, e encontrou uma contagem que variou entre <3 a 7 NMP/g.

Pereira²³, avaliando a qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*), cultivadas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis, não encontrou contaminação por *V. parahaemolyticus* em nenhuma das amostras analisadas.

Porém em estudo que analisou 50 amostras de moluscos bivalves, sendo 40 amostras de ostras provenientes de restaurantes do Rio de Janeiro, e 10 amostras de mexilhões provenientes de banco natural de Niterói, obtiveram o isolamento de 141 cepas de *V.*

*parahaemolyticus*²⁴. O resultado deste estudo é superior ao encontrado nesta pesquisa, sendo importante ressaltar que a maioria das amostras do trabalho citado acima, foram coletadas a partir de restaurantes.

Os músculos das ostras apesar de estarem protegidos pela concha podem ser contaminados durante as etapas da cadeia produtiva. Alguns microrganismos já fazem parte da microbiota natural dos pescados, mas se forem ingeridos pelo homem, podem veicular doenças²⁵.

A multiplicação de *V. parahaemolyticus* pode ocorrer no período compreendido entre a coleta das amostras, no local de cultivo, até a sua chegada no comércio, sendo influenciada pelo tempo de coleta, pela temperatura da ostra durante o transporte, pela taxa de multiplicação de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura e pelo processo de depuração²⁶.

As espécies de *Vibrio sp.* desenvolvem, naturalmente em estuários e ambientes marinhos no mundo inteiro, sendo que a maioria das espécies por serem halófilas obrigatórias, são capazes de sobreviver e se multiplicar em águas com elevada salinidade e temperatura variando de 10 a 30°C²⁷. Semelhantemente, ao observado neste estudo, muitos autores também detectaram em suas pesquisas a influência positiva da salinidade sobre a contagem e isolamento de *V. parahaemolyticus*^{28,29}.

Doi, Barbieri e Marques³⁰, observaram que a pluviosidade, salinidade e as amplitudes de maré influenciaram na concentração bacteriana ao analisar as águas nos locais de extrativismo de ostras no Estuário de Cananeia - SP.

Em pesquisa de ostras (*Crassostrea gigas*) e águas provenientes da Baía Sul de Santa Catarina, Brasil, também foi verificado que o acumulado pluviométrico apresentou uma correlação positiva com as contagens de *V. parahaemolyticus* nas águas da Baía Sul³¹.

Nesta pesquisa a quase totalidade das cepas de *V. parahaemolyticus* apresentaram potencial patogênico. Aliado a isto é importante salientar que *V. parahaemolyticus* é um microrganismo termosensível, porém suas hemolisinas não são, sendo, portanto denominadas termoestáveis, pelo fato de não serem inativadas por aquecimento a 100°C por 10 minutos¹².

Diante da especificidade do teste em Ágar Wagatsuma, pôde-se confirmar a veracidade das análises desta pesquisa, inferindo-se que há um possível risco das ostras deste estudo veicular doença alimentar provocada pelo *V. parahaemolyticus*, onde mesmo que este alimento seja submetido a um tratamento térmico para destruir o microrganismo, se este método não for eficiente, não será suficiente para destruir as hemolisinas, podendo desta forma provocar uma toxi-infecção alimentar. Na Ilha de São Luis, este fato se torna ainda mais alarmante, uma vez que dificilmente a ostra passa por algum tipo de preparo, sendo ingerida preferencialmente crua.

Diferentemente do observado neste estudo, pesquisas realizadas desde a década de 90, demonstram que culturas isoladas do ambiente marinho apresentaram pouca ou nenhuma atividade hemolítica, em oposição às culturas Kanagawa positivas, frequentemente isoladas de casos clínicos^{32,33,34}.

Costa Sobrinho³⁵, avaliando a ocorrência de *V. parahaemolyticus* patogênicos em 123 amostras ambientais de ostras (*Crassostrea brasiliana*) em São Paulo, detectou *V. parahaemolyticus* em 99,2% das amostras, com densidades variando de $< 0,5 \log_{10}$ NMP g⁻¹ a $5,0 \log_{10}$ NMP g⁻¹ e apenas uma amostra de ostra (0,8%) foi Kanagawa e *tdh* positivos.

DePaola³², afirma que cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras clínicas demonstraram esta atividade hemolítica, que tem sido chamada de fenômeno de Kanagawa (KP), ao passo que somente 1 a 2% das cepas de fontes não clínicas são KP positivas.

Os dados obtidos neste estudo com 77,77% de cepas ambientais Kanagawa positivas, se confrontam com o que foi afirmado pelos autores acima, e vai de encontro ao que foi demonstrado por Paranjpye³⁶, encontrou 13 amostras ambientais (21%) positivas para TDH.

Por vezes cepas de *V. parahaemolyticus*, podem apresentar reação fraca de hemólise sobre o Ágar Wagatsuma, o que pode gerar dúvidas, e parecer que não foram positivas ao teste²⁶. Nishibuchi³⁷, ao estudarem cepas apresentando com fraca reação de hemólise em Ágar Wagatsuma, verificaram que 86% delas apresentaram o gene *tdh*, e 16% das cepas que não mostraram nenhuma hemólise, ou seja, Kanagawa negativas, foram positivas para o gene *tdh* em teste de hibridização de DNA.

A habilidade de hidrolisar ureia é citada por diversos autores como indicador da presença de TRH^{38,39}. Evidências sugerem que a hidrólise da uréia é um marcador seguro para identificar TRH em *V. parahaemolyticus*, uma vez que já foi demonstrada uma ligação genética entre a estrutura do gene da uréase (*urec*) e *trh* no cromossomo de algumas espécies virulentas⁴⁰.

Diante do obtido nesta pesquisa, mais uma vez se confirma a patogenicidade das cepas isoladas, onde 7 de 9 cepas foram TDH positivas, 3 de 9 cepas foram TDH e TRH positivas, e apenas 1 das 9 não apresentou nenhum tipo de virulência.

O fato de terem sido isoladas cepas que apresentam potencial patogênico, deve servir de alerta aos consumidores e as autoridades sanitárias competentes para o desenvolvimento de medidas de controle através de legislação adequada, monitoramento constante, tanto ambientais quando de casos de diarreia e medidas educativas.

CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado e de acordo como os dados obtidos é possível concluir que:

As ostras (*Crassostrea sp.*) extraídas nos municípios da Ilha de São Luís, apresentam potencial risco à saúde pública, podendo veicular *V. parahaemolyticus*;

As cepas isoladas expressaram atividades das hemolisinas TDH e TRH, mostrando o potencial patogênico das cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas;

A salinidade parece ter influenciado quanto ao isolamento das cepas de *V. parahaemolyticus*.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Cavalcanti AD. Monitoramento da contaminação por elementos traço em ostras comercializadas em Recife, Pernambuco, Brasil. *Cad Saude Publica*.2003;19(5):1545-1551.
2. Monteles JS, Castro TCS, Viana DCP, Conceição FS, França VL, Funo ICSA. Percepção sócio-ambiental das marisqueiras no município de Raposa, Maranhão, Brasil. *Rev Bras Engenharia de Pesca*. 2009. 4(2):34-45.
3. Queiroz C, Júnior NS. Cultivo de ostras. Santa Catarina (BR): Acaresc;1990.
4. Galvão PMA, Rebelo MF, Torres, JPM, Guimarães JRD, MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. *Braz J Aquat Sci Tech*. 2009; 13(2):59-66.
5. Beirão H, Teixeira E, Meinert EM. Processamento e industrialização de moluscos. Seminário e workshop de tecnologias para o aproveitamento integral do pescado; Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000. p.38-84.

6. Huss HH. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, 1997. 176 p. (Documento Técnico sobre as Pescas, n. 334).Dinamarca.Livro.
7. Moura Filho LGM, Mendes ES, Silva RPP, Goes LMNB, Vieira KPBA, Mendes PP. Enumeração e pesquisa de *Vibrio* spp. e coliformes totais e termotolerantes em sashimis de atum e vegetais comercializados na região metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco. *Acta Sci.* 2007; 29(1):85-90.
8. Nespolo NM. Características microbiológicas de salmão (*Salmo salar*) comercializado em algumas cidades da região nordeste do Estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009.
9. Huss HH, Reilly A, Ben-Embarek PK. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control.* 2000;11:149-156.
10. Boutin BK, Townsend SF, Scarpino PV, Twedt RM. Demonstration of invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in adult rabbits by immunofluorescence. *Appl Envir Microbiol.* 1979; 37:647-653.
11. García-Lázaro M, Pulido MCA, Rivero A, Torre-Cisneros J. Cólera y otras infecciones del género *Vibrio*. *Med.* 2010;10(52):3489-3496.
12. Kaysner CA, DePaola A. *Vibrio*. In: DOWNES, F. P. & K. ITO (eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 40, p. 405-420.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico dos princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.* DF, 1 jan. 2001. Seção 1, nº7-E.p.45-53.

14. Elliot EL, Kaysner AC, Tamplin ML. *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Bacteriological Analytical Manual Online, Chapter 9, 9^a ed. US FDA Center Food Safety and Applied Nutrition, 2004.
15. BRASIL. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente do Ministério do Meio Ambiente. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2005.
16. Potasman I, Paz A, Odeh M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide perspective. Clin Infect Dis; 2002;35:921-928.
17. Welker CAD, Both JMC, Longaray S.M, Haas S, Soeiro MLT, Ramos RC. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Bras Biocienc. 2010; 8(1):44-48.
18. Santos CAML, Vieira RHSF. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. Rev Inst Med Trop; 2013; 55(4):219-228.
19. Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. Bio and Tech. 1985;3:817-820.
20. Nishino T, Nayak BB, Kogure K. Density- Dependent sorting of physiologically different cells of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl Environ Microbiol 2003;69(6):3569-3572.
21. Sousa OV, Vieira RHF, Menezes FGR, Reis CMF, Hofer E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. Rev Inst Med Trop. 2004;46(2):59-62.

22. Ramos RJ. Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.
23. Pereira MA, Nunes MM, Nuemberg L, Schulz D, Batista CRV. Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis. Braz J Microbiol. 2006;37(2).
24. Pereira CS, Viana CM, Rodrigues DP. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. Cienc e tecnol de alimentos. 2004; 24(4):591-595.
25. Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Kambar A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Control. 2006; 17:183-188.
26. Sobrinho PSC. Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *vibrio parahaemolyticus* associado ao consumo de ostras (*crassostrea brasiliana*) cruas cultivadas e comercializadas no estado de São Paulo (Tese de doutorado em ciência dos alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2007
27. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 2004.
28. Fernandes RHS, Vieira, Vasconcelos RF, Carvalho EMR. Quantificação de víbrios, de coliformes totais e termotolerantes em ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, e na água do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim-CE. Rev Bras Hig e Sanidade Animal. 2007; 01(1):01 – 13.
29. Rodrigues LAP, Filho CDC. Avaliação da ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras (*crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Bahia de todos os santos. REVISTA?2012;14(19) 197-207.

30. Doi AS, Barbieri E, Marques HLA. Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananeia (SP). *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 2014;19(2):165-171.
31. Ramos RJ. *Vibrio sp.* em ostras e águas de áreas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina [tese de doutorado]. Santa Catarina (SC): Universidade Federal de Santa Catarina;2012.
32. Depaola A, Hopkins LH, Peeler JT, Wentz B, McPhearson RM. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol*. 1990; 56: 2299–2302.
33. Hoashi K, Ogata K, Taniguchi H, Yamashita H, Tsuji K, Mizuguchi Y, Ohtomo N. Pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*: intraperitoneal and orogastric challenge experiments in mice. *Microbiol and Immunology J*. 1990; 34: 355366.
34. Kaysner CA, Abeyta C, Stott RF, Krane MH, Wekell MM. Enumeration of *Vibrio* species, including *Vibrio cholera*, from samples of an oyster growing area, Grays Harbor, Washington. *J of Food Protection*.1990; 53: 300-301.
35. Costa Sobrinho OS, Destro MT, Franco BDGM, Landgraf M. Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of São Paulo state, Brazil. *Appl environ microbiol*. 2010; 76:1290 – 1293.
36. Paranjpye R, Hamel OS, Stojanovski A, Liermann M. Genetic Diversity of Clinical and Environmental *Vibrio parahaemolyticus* Strains from the Pacific Northwest. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78(24):8631–8638.
37. Nishibuchi M, Ishibashi M, Takeda Y, Kaper JB. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in DNA colony hybridization test. *Infection and Immunity*. 1985; 49(3):481–486.

38. Kelly M, Stroh EMD. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2820–2822.
39. Cook DW, Bowers JC, DePaola A. Density of total pathogenic (tdh+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf Coast molluscan shellfish at harvest. *J Food Protection.* 2002; 65(12):1873-1880.
40. Iida TO, Suthienkul KS, Park GQ, Tang RK, Yamamoto M, Ishibashi K, Yamamoto, Honda T. Evidence for genetic linkage the ure and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Med Microbiol.* 1997; 46:639–645.

ANEXO

ESTADO DO MARANHÃO
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS
SECRETARIA ADJUNTA DE RECURSOS AMBIENTAIS
SUPERINTENDÊNCIA DE BIODIVERSIDADE E ÁREAS PROTEGIDAS



| AUTORIZAÇÃO DE ÓRGÃO GESTOR DE UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL | | |
|---|---|---|
| Nº da Autorização 003/2014 | Nº do Processo SEMA 21504/2014 | Período de Validade Maio de 2014 a Janeiro de 2015 |
| Objeto () Prosseguimento de Processo de Licenciamento Ambiental (X) Pesquisa Científica () Manejo da Natureza () Atividades Didáticas () Atividades Sócio-Culturais () Visitação | Descrição PROJETO: Ostra como Bioindicador de Poluição Aquática: Utilização de Biomarcadores e Análise Microbiológica para Validação do Potencial Indicador de Poluentes Ambientais. | |
| Localização Área de Proteção Ambiental de Upaon-Açu / Miritiba / Alto Preguiças; | | |
| Responsável (Pesquisador/Coordenador) Nome: Eliane Braga Ribeiro CPF: 711.805.163-20 Nº Identidade: 043177442011-5 Endereço: Rua São José Q 03, Casa 16A – Santa Clara São Luís-MA CEP: 65058544. Telefone: (98) 32573439 - Celular: (98) 87017746/82556145. Email: elianeribeiro.biologa@gmail.com Profissão: Bióloga Registro no Conselho: CRBio: 59836/05-D Cadastro Técnico Federal-CTF 2935757 | | |
| Instituição Nome: Universidade Estadual do Maranhão Endereço: Cidade Universitária Paulo VI, CP 09, Tirirical – São Luís – MA – CEP 65055970 CNPJ/CPF: 06.352.421/0001-68. | | |
| Haverá coleta de material biológico? (X) SIM () NÃO SISBIO: 43813-1 | | |
| FAMÍLIA | NOME COMUM | QUANTIDADE |
| Ostreidae | Ostra do Mangue | 80 dúzias, observando as condicionantes |
| Data e Local da Emissão São Luís, 22 de maio de 2014 | Autoridade Expedidora (Assinatura e Carimbo)  Genilde Campagnaro Secretária de Estado de Meio Ambiente e Recursos Naturais/SEMA | |
| AUTORIZAÇÃO VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS | | |
| AS CONDICIONANTES DESTA AUTORIZAÇÃO ESTÃO LISTADAS NO VERSO | | |
| 1ª VIA: INTERESSADO | 2ª VIA: PROCESSO | 3ª VIA: ARQUIVO INTERNO |

Esta Autorização encontra-se em conformidade com a Portaria nº 31 do dia 07 de março de 2012 desta SEMA publicada no DOE do dia 22 de março de 2012.