



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

INVESTIGAÇÃO DE *SALMONELLA* E *VIBRIO*
PARAHAEMOLYTICUS NOS CARANGUEJOS
COMERCIALIZADOS POR AMBULANTES NA AVENIDA
BEZERRA DE MENEZES EM FORTALEZA-CE

ELENICE ARAÚJO DE LIMA

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA - CEARÁ
AGOSTO/2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L697i Lima, Elenice Araújo de.

Investigação de Salmonella e Vibrio Parahamolyticus nos caranguejos comercializados por ambulantes na Avenida Bezerra de Menezes em Fortaleza - CE / Elenice Araújo de Lima. – 2003.

31 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2003.

Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Salmonella. 2. caranguejo. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a REGINE HELENA SILVA DÓS FERNANDES VIEIRA
Orientador/Presidente

Prof^a Dr^a SILVANA SAKER SAMPAIO

Prof^a MSc. ARTAMÍZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA

VISTO:

Prof. Dr. MOISÉS ALMEIDA DE OLIVEIRA
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof^a MSc. MARIA SELMA RIBEIRO VIANA
Coordenadora do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

- Aos meus amados pais Edmilson e Francisca, que com amor me conduziram para este ideal, a minha mais profunda gratidão e agradecimento.
- Às minhas “pupilas” e amigas Leyla (Maria) e Dannielle, sem as quais a realização desse trabalho seria impossível.
- À querida Gleire, por sua amizade e paciência na elaboração deste trabalho.
- Às colegas de laboratório que fazem com que o trabalho seja alegre e prazeroso: Anahy, Cristiane, Hilda, Susy, Norma, Isabel, Luana, Oscarina, Karla, Janisi (a pupila rebelde), Ilene, Waleska e D. Zuíla.
- Aos amigos do Departamento de Engenharia de Pesca em especial Augusto, Ticiano, Sheila, Cristiane, Gledson, Alisson, Márcio (cachorro), Flávia, Max, Lélis, Viviane, Túlio e Rossi.
- Aos amigos que fiz no PET Ariévilo, Alessandra, Cristiane, Cristiano, Duciene, Horácio, Karine, Ronaldo, Éder, Luciana M., Luciana Q. e em especial minha amiga de todas as horas Nadjane.
- Ao LABOMAR pelo uso de suas instalações.
- Aos professores e funcionários do Curso Engenharia de Pesca.
- Às formandas do semestre 2003.1, Cilene, Daniele (xuxinha), Janaína e Neuma.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram presentes na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

RESUMO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	<i>SALMONELLA</i>	4
2.1.1	Taxonomia	4
2.1.2	Características do microrganismo	4
2.1.3	Habitat	5
2.1.4	Fisiologia	5
2.1.5	Características da doença	5
2.1.6	Mecanismo de patogenicidade	6
2.2	<i>VIBRIO</i>	6
2.2.1	Taxonomia	6
2.2.2	Características do microrganismo	7
2.2.3	Habitat	7
2.2.4	Fisiologia	7
2.2.5	Características da doença	8
2.2.6	Mecanismo de patogenicidade	8
2.3	Caranguejo	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	10
4	RESULTADOS	16
5	DISCUSSÃO	18
6	CONCLUSÃO	21
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Padrão dos testes bioquímicos empregados na identificação de cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. 15
- Tabela 2 - Número de cepas confirmadas na sorologia para *Salmonella*, isoladas de caranguejos comercializados na Avenida Bezerra de Menezes, Fortaleza, CE. 16
- Tabela 3 - Número Mais Provável (NMP) de *Vibrio* nos caranguejos comercializados na Avenida Bezerra de Menezes, Fortaleza, CE 17

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o grau de contaminação por *Salmonella* (presença e ausência) e a enumeração de *Vibrio*, utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP). Foram feitas 15 coletas de caranguejos adquiridos em um local de venda da Av. Bezerra de Menezes, no período de fevereiro a maio de 2003. Em cada semana eram coletados no mínimo quatro e no máximo oito indivíduos vivos. De 44 cepas isoladas da carne do caranguejo, retirada das quelas e cefalotórax dos animais, suspeitas de *Salmonella*, 31 apresentaram aglutinação frente ao soro OH. Os resultados do NMP para *Vibrio* variaram de > 110/g a > 110.000/g de caranguejo. Foram isoladas 45 cepas de *Vibrio* sendo oito confirmadas como *Vibrio parahaemolyticus* e duas como *Vibrio alginolyticus*, o restante se chegou somente a gênero. Conforme a legislação brasileira em vigor, o pescado deve apresentar ausência de *Salmonella* em 25 g do produto, portanto os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o caranguejo adquirido na Av. Bezerra de Menezes está impróprio para o consumo pela presença da bactéria. Não existe legislação para *Vibrio* em caranguejos apesar de haver limites para *V. parahaemolyticus*, uma das espécies do gênero, mas somente para pratos consumidos crus, o que não foi o caso da presente pesquisa.

INVESTIGAÇÃO DE *SALMONELLA* E *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* NOS CARANGUEJOS COMERCIALIZADOS POR AMBULANTES NA AVENIDA BEZERRA DE MENEZES EM FORTALEZA-CE

Elenice Araújo de Lima

1. INTRODUÇÃO

O caranguejo representa um dos mais importantes recursos das regiões estuarinas da costa brasileira, passível de ser explorado com relativa intensidade sem entrar em situação de sobrepesca em função de seu processo de captura permitir a identificação das fêmeas, distintas em tamanho dos machos, permitindo sua fácil devolução ao *habitat* de origem (PAIVA, 1997).

Ainda segundo o autor, a situação dos estoques é relativamente estável, apesar da elevada taxa de exploração, principalmente na área entre Tutóia-MA e o Delta do Parnaíba-PI, devido à elevada demanda de consumo nas capitais do Nordeste setentrional, em especial Fortaleza.

O crustáceo é um decápoda que vive principalmente em ambientes aquáticos, mas alguns podem ser encontrados em ambientes terrestres úmidos, sempre próximos do mar ou de estuários (COSTA, 1972). São comestíveis e muito apreciados, daí sua importância econômica.

A captura do caranguejo é feita manualmente pelos pescadores e os animais são trazidos em caminhões dos Estados do Piauí e do Maranhão até à Avenida Bezerra de Menezes. O transporte é feito sem o menor controle de higiene visto que os animais são trazidos dentro de sacos de estopa contendo ainda todo o resíduo de lama dos manguezais. Os caranguejos ficam expostos no canteiro central da avenida, também sem nenhuma higienização prévia, sendo lavados somente, mais tarde, pelo consumidor.

A maioria dos alimentos *in natura* apresenta uma considerável variedade de microrganismos. Esta carga pode facilmente se elevar ou diminuir

dependendo das condições de manuseio e tratamento, tais como resfriamento, congelamento, cozimento, etc (MAGALHÃES, 1996).

Bactérias do gênero *Salmonella* têm sido os principais agentes etiológicos de surtos das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) de todo o mundo, constituindo-se um importante problema sócio-econômico (ALVES et al., 2001).

Essa bactéria é amplamente distribuída na natureza sendo o trato intestinal do homem e de animais seu principal reservatório natural (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Embora não seja isolada normalmente de peixes e moluscos bivalves capturados em mar aberto, *Salmonella* pode ser encontrada em produtos marinhos capturados em águas contaminadas.

A preocupação em realizar estudos relativos à presença de *Vibrio parahaemolyticus* surgiu depois de ter sido constatado em vários países a presença da bactéria em pescados sendo um possível causador de surtos de gastroenterites em seres humanos, razão de sua importância para a saúde pública.

Em relação aos surtos com a bactéria acima citada, a maioria resultou do consumo de alimentos marinhos crus ou parcialmente cozidos. Entre eles podem ser mencionados caranguejo, camarão, moluscos e os alimentos de origem japonesa como o *sushi* (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

No Brasil poucos são os trabalhos referentes ao isolamento dessa bactéria em caranguejos, considerando a extensa faixa litorânea do país, aliada ao crescente consumo do crustáceo (THEOPHILO, 1992).

Sendo de importância fundamental para a Saúde Pública, torna-se urgente o monitoramento de *Salmonella* e *V. parahaemolyticus*, na qualidade microbiológica dos caranguejos. Portanto, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o grau de contaminação por *Salmonella* através de testes de presença e ausência e a enumeração de *V. parahaemolyticus* utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) nos caranguejos comercializados na Avenida Bezerra de Menezes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A sigla DTA refere-se às aquelas Doenças Transmitidas pelos Alimentos ao homem. Existem basicamente duas maneiras dos microrganismos provocarem doenças ao consumidor: através de intoxicação, quando há ingestão da toxina previamente formada pelo microrganismo no alimento e por infecção, que é a ingestão do microrganismo no alimento, sua fixação, colonização de órgãos ou tecidos específicos, desenvolvimento, multiplicação e lançamento de suas toxinas, por ventura, elaboradas (LEITÃO, 1988).

Nos países onde se mantêm registros apropriados das doenças veiculadas pelos alimentos, os produtos de pesca contribuem com uma significativa proporção dos surtos relatados, variando de um país para outro dependendo do clima, costumes da dieta e outras diferenças sociais (MOHAMED HATHA; LAKSHMANAPERUMALSAMY, 1997).

As salmonelas já foram isoladas de peixes provenientes de rios poluídos e também de peixes tirados do porão de navios e lavados com água poluída das docas. Camarões cozidos e congelados e caudas de lagosta são processados por alguns países para o comércio internacional. Eles podem ser manipulados extensivamente depois de cozidos e antes do congelamento. Em amostras coletadas em portos, a taxa de isolamento de *Salmonella* é baixa; mesmo em amostras congeladas cruas, raramente se encontra essa bactéria (HOBBS; ROBERTS, 1998).

Ainda segundo Hobbs; Roberts (1998), em alguns países como a Índia e em certos países da África, frutos do mar: peixes, camarões e caranguejos são secos ao sol, espalhados ou pendurados nas praias, sendo alvo de contaminação por aves, através de suas fezes. Produtos secos ao sol são conhecidos por sua alta taxa de contaminação por salmonelas.

De ostras coletadas no estuário do Rio Cocó foram isoladas cepas de *Salmonella* (SILVA, 2003).

O primeiro surto de DTA reconhecidamente causado por *V. parahaemolyticus*, data de 1950, quando o microrganismo foi isolado de um alimento japonês (*shirasu*) constituído por sardinha fervida em salmoura e, concomitantemente, das fezes de pacientes, na cidade de Osaka, Japão. No

Brasil, cepas de *V. parahaemolyticus* foram isoladas de ostras coletadas no litoral de São Paulo, de crustáceos e moluscos provenientes da baía de Sepetiba, RJ e de caudas de lagostas, coletadas na feira do pescado de Fortaleza (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Segundo a Asociación Americana de Salud Pública (AASP, 1992), um fato de grande importância para a ocorrência de surtos é o costume de em muitos países se consumir frutos do mar *in natura*. O Japão figura entre os países mais citados em surtos de DTAs por *V. parahaemolyticus*, devido ao hábito culinário em consumir pescado, mariscos e crustáceos crus. Nos Estados Unidos, a fonte mais comum de intoxicação é o consumo de ostras cruas, bem como o consumo de certos crustáceos sem cozimento ou com cozimento insuficiente.

2.1 – *Salmonella*

2.1.1 – Taxonomia

As salmonelas são bastonetes Gram-negativos, flagelados, anaeróbios facultativos, e possuem três tipos de antígenos principais: flagelar (H), somático (O) e Vi (encontrados em alguns sorotipos) (SILVA, 1999).

Existem duas espécies de *Salmonella* e 2.501 sorotipos. A maioria delas é patogênica ao homem e aos animais. A *Salmonella* é eliminada pelas fezes e a possibilidade de contato dessas fezes contaminadas com águas, superfícies e manipuladores tornam iminente a sua veiculação por alimentos, inclusive o pescado (VIEIRA, no prelo).

2.1.2 – Características do microrganismo

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos. São anaeróbios facultativos, que produzem gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceção feita a *S. Pullorum* e a *S. Gallinarum*, que são imóveis (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

2.1.3 – Habitat

O principal *habitat* da *Salmonella* é o trato intestinal de animais como: aves, répteis, animais de granja, pessoas e insetos (BARROS et al., 2002).

2.1.4 – Fisiologia

A temperatura ideal para multiplicação de *Salmonella* é 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C. Vários estudos indicam, no entanto, que valores máximos e mínimos dependem do sorotipo. O pH ótimo para multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. As salmonelas não toleram concentrações de sal superiores a 9% (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

2.1.5 – Características da doença

As doenças causadas por *Salmonella* costumam ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi, as febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi (A, B e C) e as enterocolites (ou salmoneloses), causadas pelas demais salmonelas (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Ainda segundo os autores, a febre tifóide só acomete o homem, e normalmente é transmitida por água e alimentos contaminados com material fecal humano. Os sintomas são graves, e incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. As febres entéricas são semelhantes à febre tifóide, mas os sintomas clínicos são mais brandos. Enquanto a febre tifóide pode durar de uma a oito semanas, as febres entéricas duram, no máximo, três semanas. Essas doenças também podem ser causadas por consumo de água e alimentos, especialmente leite cru, vegetais crus, mariscos e ovos. As salmoneloses caracterizam-se por sintomas tais como: diarreia, febre, dores abdominais e vômitos, aparecendo em média, 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo, durando entre um e quatro dias. De modo geral, as enterocolites causadas por *Salmonella* não necessitam de tratamento com antibióticos.

2.1.6 – Mecanismo de patogenicidade

O potencial patogênico das salmonelas varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condição de saúde do hospedeiro (CAMPOS, 1999).

As infecções começam na mucosa do intestino delgado e do cólon. As salmonelas atravessam a camada epitelial intestinal, alcançam a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas) e então proliferam. Essas bactérias são fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando em resposta inflamatória, decorrente da hiperatividade do sistema reticuloendotelial. Ao contrário do que ocorre na febre tifóide e nas febres entéricas, nas enterocolites a penetração de *Salmonella* fica limitada à lâmina própria. Nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica, ficando a infecção restrita à mucosa intestinal. A resposta inflamatória está relacionada também com a liberação de prostaglandinas, o que resulta em um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa. Acredita-se que o processo diarréico manifesta-se às custas de uma enterotoxina de natureza protéica, cuja produção é mediada por um plasmídeo (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

2.2 – *VIBRIO*

2.2.1 – Taxonomia

O gênero *Vibrio*, descrito na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, 2002), possui atualmente 38 espécies. Sua importância tem aumentado nos últimos anos com reconhecimento de espécies, que não o *V. cholerae* sorogrupo O1 (cólera clássica) e o *V. parahaemolyticus* (manifestações gastrentéricas), como patógenos humanos. Estes incluem *V. cholerae* não O1, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. hollisae* e *V. metschnikovii*, os quais produzem uma variedade de infecções entéricas e não entéricas (LIMA, 1997).

2.2.2 – Características do Microrganismo

Os víbrios pertencem à família Vibrionaceae, com seus membros sendo caracterizados como bacilos Gram-negativos, retos ou curvos; são móveis devido à presença de um único flagelo polar; produzem oxidase e catalase e fermentam glicose sem produção de gás. Das 38 espécies que fazem parte do gênero, 10 são consideradas patogênicas para o homem (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

2.2.3 – Habitat

São capazes de multiplicar-se sem ajuda de hospedeiro em águas marinhas, alimentando-se de restos de animais e/ou vegetais. Os fatores que determinam a abundância dos víbrios na coluna d'água e fauna, entre outros, são a temperatura da água, a salinidade e o plâncton (AASP, 1992).

Dentre as espécies do gênero *Vibrio* figura o *V. parahaemolyticus* que é uma bactéria sacarose negativa, causadora de gastroenterite no homem.

Essa bactéria pode ser isolada de águas estuarinas e marinhas, em todos os continentes (CDC, 1999).

A distribuição do *V. parahaemolyticus* tem marcada diferença estacional nos reservatórios naturais. Durante os meses de frio, ela pode ser encontrada nos sedimentos marinhos enquanto nos meses de calor nas águas litorâneas, em peixes e mariscos (AASP, 1992). Em algumas ocasiões há relatos de isolamento de *V. parahaemolyticus* de águas continentais e peixes de rios e lagos, onde se presume que estas águas teriam uma alta concentração de cloreto de sódio, que permitiria a sobrevivência da bactéria (TWEDT, 1989).

2.2.4 – Fisiologia

V. parahaemolyticus é uma bactéria halófila, que cresce melhor em meios contendo 2-3% de cloreto de sódio, porém pode se multiplicar a uma concentração de até 8% desse sal. O ótimo de crescimento encontra-se na faixa de 2 a 4% de cloreto de sódio (THEOPHILO, 1992).

A temperatura ótima de crescimento dessa bactéria em meio de cultura, é de 37°C. No entanto, ela cresce na faixa de 5 a 43°C, dependendo do pH do meio de cultura. O pH mínimo de crescimento a 5°C em caldo tripticase-soja com 3% de NaCl é 7,3, mas este valor eleva-se para 7,6 na concentração salina de 7%. O crescimento ocorre em uma ampla faixa de pH de 5,0 a 11,0, sendo o ótimo entre 7,5-8,5 (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

2.2.5 – Características da doença

Quase sem exceção, as infecções provocadas por alimentos envolvendo o *V. parahaemolyticus* como agente causador, são associadas ao consumo de peixes, crustáceos e moluscos contaminados. Os sintomas mais freqüentes da doença são: diarréia aquosa, cólicas abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça, febre e calafrios. O período de incubação entre o consumo do alimento e o início dos sintomas varia de 4 a 96 horas, e a duração da doença compreende um período de algumas horas até 10 dias, perdurando em média, 3 dias. Varia também com o número de organismos ingeridos, a natureza do alimento e a acidez gástrica (THEOPHILO, 1992).

2.2.6 – Mecanismo de patogenicidade

Estudos voltados para seu mecanismo de virulência mostraram que amostras patogênicas produzem hemolisina. A hemólise ocorre devido à produção de uma hemolisina extracelular termoestável (thermostable direct hemolysin-TDH) que recebe o nome de fenômeno de Kanagawa (MATTÉ et al., 1994).

A maioria das cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* são hemolíticas, não ocorrendo o mesmo com amostras ambientais de água e solo. No entanto, tem-se demonstrado que cepas TDH negativas podem causar enfermidades, produzindo uma toxina imunológica com propriedades bastante similares (TRH-thermostable related hemolysin) (AASP, 1992).

2.3 - Caranguejo

A ordem decápoda, maior ordem dos crustáceos, inclui os camarões, lagostins, lagostas e caranguejos. A maioria dos decápodos é marinha, mas os lagostins e alguns camarões e caranguejos invadiram a água doce. Também existem alguns caranguejos terrestres. Os decápodos exibem uma larga variedade de hábitos e dietas alimentares, mas a maioria das espécies combina a alimentação predatória com o consumo de detritos (RUPPERT; BARNES, 1996).

O consumo de mariscos tem demonstrado um crescimento sustentável durante os últimos anos, principalmente nos países em desenvolvimento, cuja tomada de conscientização visa ressaltar as vantagens em se consumir os produtos pesqueiros por seu valor nutritivo e seu baixo colesterol (PRADO et al., 1990).

Pereira et al. (2001), estudando a ocorrência natural de víbrios em frutos do mar em Lisboa, Portugal, analisaram 61 amostras de 14 diferentes espécies de moluscos e crustáceos. Destas amostras foram isolados os seguintes víbrios; *V. alginolyticus* de 11,4%, *V. parahaemolyticus* de 6,5%, *V. vulnificus* de 22,9%, *V. damsela* de 9,8%, *V. metschnikovii* de 1,6% e *Vibrio* spp. de 21,3%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Obtenção das amostras

No período de fevereiro a maio de 2003, semanalmente, foram realizadas 15 coletas de caranguejos (número mínimo de quatro e máximo de oito indivíduos vivos) na Av. Bezerra de Menezes, próximo ao Mercado São Sebastião. Em seguida, os animais eram transportados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), onde eram sacrificados e analisados de acordo com o planejamento do experimento.

3.2 – Preparação das amostras

Os caranguejos eram esfregados com escova sob água corrente a fim de se remover todos os resíduos aderidos à carapaça. Foram utilizadas para as análises as quelas e o cefalotórax dos animais. Eram pesados 25 g para a investigação de *Salmonella*, e colocados em 250 mL de caldo lactosado por 24 horas a 35°C.

Para a investigação de *Vibrio parahaemolyticus* eram pesados 50 g e homogeneizados com 450 mL de uma solução salina fosfatada tamponada (PBS). As diluições, de 10^{-1} a 10^{-5} , eram feitas em 9 mL da mesma solução salina de onde se retirava 1 mL e se inoculava em tubos em triplicata, de água peptonada alcalina (APA) 1%, adicionados de 3% de NaCl .

3.3 – Isolamento e identificação de cepas de *Salmonella*

3.3.1 – Enriquecimento seletivo

Após 24 horas, a partir do pré-enriquecimento em caldo lactosado eram inoculados 1 mL em 100 mL do meio Rappaport-Vassiliadis (Difco) e 10 mL em 100 mL do meio caldo tetrionato (Difco) e incubados em banho-maria a 42°C e 43°C, respectivamente, por 24 ± 2 horas.

3.3.2 – Isolamento em meios seletivos

A partir de inóculos dos meios de Rappaport-Vassiliadis e caldo tetrionato eram estriadas, em duplicatas, placas contendo ágar sulfito de bismuto (BS-Difco) e ágar entérico de Hektoen (HE-Difco). As placas eram incubadas invertidas, a 35°C por 24 ± 2 horas. As colônias típicas de *Salmonella* apresentavam-se escuras com ou sem brilho metálico no ágar BS e verde-azuladas com ou sem o centro negro no ágar HE. As colônias atípicas produzem coloração salmão com ou sem centro negro no ágar HE.

3.3.3 – Provas bioquímicas de triagem

Eram transferidas duas colônias suspeitas de cada placa para tubos inclinados contendo ágar ferro três açúcares (TSI-Difco) e ágar ferro lisina (LIA-Difco). Os tubos de TSI eram incubados com a tampa ligeiramente frouxa para manter as condições aeróbias e prevenir a excessiva produção de H₂S. Os tubos contendo LIA eram incubados com a tampa bem fechada mantendo condição anaeróbia para a descarboxilação da lisina. Os tubos eram incubados a 35°C por 24 ± 2 horas. As colônias típicas de *Salmonella* apresentam ápice alcalino (vermelho) e base ácida (amarela), com ou sem produção de gás e de H₂S nos tubos contendo TSI e base alcalina com ou sem produção de H₂S nos tubos contendo LIA.

As provas bioquímicas de triagem foram selecionadas de acordo com Vieira, no prelo.

3.3.4 – Identificação sorológica

Este teste foi realizado a partir de cepas em ágar soja triptona (TSA-Difco) incubadas por 24 horas a 35°C usando anti-soro *Salmonella*

polivalente OH. As cepas que apresentaram aglutinação foram enviadas à Fundação Oswaldo Cruz-RJ, laboratório de referência para *Salmonella*, para identificação do sorogrupo e do sorotipo da bactéria.

3.4 – Isolamento e identificação das cepas de *Vibrio parahaemolyticus*

3.4.1 – Semeadura inicial das amostras

Após 24 horas, foram retiradas alçadas com alça de níquel-cromo dos tubos turvos de APA e estriadas placas de ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS-Difco) as quais foram incubadas por 24 horas a 35°C. O método de plaqueamento para identificação de *V. parahaemolyticus* seguiu a metodologia preconizada por Kaysner; DePaola Jr (2001).

As colônias que apresentavam coloração verde (sacarose negativas) no ágar TCBS eram suspeitas de serem *V. parahaemolyticus*.

3.4.2 – Identificação das cepas suspeitas

As provas bioquímicas de identificação, citadas a seguir, foram realizadas de acordo com Kaysner; DePaola Jr (2001).

3.4.3 – Identificação Presuntiva

As colônias suspeitas de *V. parahaemolyticus* foram semeadas em tubos inclinados contendo TSA adicionado de 3% de NaCl, e incubados em estufa por 18-24 horas a 35°C. Decorrido esse período as culturas em ágar TSA eram utilizadas para a prova de Gram, prova de produção de citocromo-oxidase, prova do TSI e motilidade.

A prova de Gram foi utilizada para verificar as características morfológicas das cepas isoladas, em esfregaços corados pelo método de Gram. As cepas que se revelaram no esfregaço corado, como bacilos Gram-negativos, polimorfos, encurvados ou não, eram considerados da família Vibrionaceae.

Para a prova da produção de citocromo-oxidase foram colhidas, com a alça de níquel cromo, algumas colônias do TSA 3% de NaCl e esfregadas em disco de papel de filtro embebidos em solução aquosa de cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina 1%. O teste era considerado positivo quando ocorria o escurecimento do esfregaço.

A prova do TSI foi utilizada para verificar a capacidade das cepas isoladas de produzirem ácido sem gás a partir da glicose, e fermentar a sacarose e lactose, sem produção de H₂S. Nesta prova os tubos apresentam-se alcalino na rampa, vermelhos (não fermentadores da sacarose e lactose) e ácido na base, amarelos (produtores de ácido a partir da glicose).

Para o teste de motilidade inoculou-se com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo longa, tubos contendo o meio semi-sólido SIM (Difco) que, em seguida, foram incubados por 24 horas a 35°C. O teste positivo apresenta um crescimento ao longo da linha de inoculação, com turvação do meio.

3.4.1 – Identificação Definitiva

Cada colônia isolada foi inoculada em TSA 3% de NaCl, incubada por 24 horas a 35°C e estocada em estufa BOD a 23°C para posteriores provas bioquímicas.

Antes de iniciar a bateria de provas bioquímicas (prova de halofilismo, prova de fermentação de carboidratos, prova da hidrólise de arginina e descarboxilação da lisina, prova de crescimento a 42°C, prova de ONPG e prova de Voges-Proskauer) as cepas foram renovadas em TSA e incubadas por 24 horas a 35°C.

Na prova de halofilismo, foram inoculados, a partir de culturas de TSB (caldo triptona soja-Difco) 3%, quatro tubos de caldo triptona contendo 0%, 3%, 6% e 8% de NaCl e incubados durante 24 horas. Após esse período verificou-se a positividade através da turvação do meio.

A prova de fermentação de carboidratos foi realizada a partir do crescimento em TSA acrescido com 3% de NaCl, foram inoculados quatro tubos contendo caldo púrpura de bromocresol-Difco, pH 7,0 ± 0,2, acrescido de sacarose, lactose, celobiose e arabinose, separadamente. Após a inoculação os meios foram cobertos com uma camada de 1 cm de óleo de

vaselina estéril e, em seguida, incubados a 35°C por 4-5 dias. *V. parahaemolyticus* apresenta-se positivo para arabinose e negativo para lactose, celobiose e sacarose. Este teste é visualizado pela viragem do meio de púrpura para amarelo.

Para verificação da capacidade da bactéria em hidrolisar a arginina e descarboxilar a lisina eram inoculados, a partir das culturas em TSA 3%, dois tubos contendo o meio basal com 3% de NaCl e adicionados respectivamente, arginina e lisina. Paralelamente cada cepa era inoculada em um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem estes aminoácidos (controle). Após a inoculação era adicionada aos meios uma camada de aproximadamente 1 cm de óleo de vaselina estéril. A seguir procedia-se a incubação por até 4 dias a 35°C. O meio inoculado se torna amarelo como resultado da produção de ácido oriundo da glicose existente no meio basal. Na reação positiva, o meio se torna alcalino, de cor púrpura, e o tubo de controle permanece ácido, de cor amarela.

A prova de crescimento a 42°C foi realizada a partir das culturas do TSA 3%. Procedeu-se a inoculação em tubos contendo caldo TSB acrescidos com 2% de NaCl e, em seguida, incubou-se em banho-maria a 42°C por 24 horas. O teste é considerado positivo quando ocorre a turvação do meio.

Na prova do ONPG eram inoculados tubos, a partir de culturas inoculadas em TSI, contendo 0,25 mL de solução salina fisiológica esterilizada, adicionados de uma gota de tolueno para a liberação da enzima e 0,25mL de solução tamponada de ONPG e incubados a 37°C por 24 horas. A mudança da cor do meio de incolor para amarelo indica a hidrólise do ONPG pela enzima β -D-galactosidase.

Para a prova de Voges Proskauer, foram inoculados com alça de níquel-cromo, tubos contendo caldo MR-VP (Difco), a partir do crescimento de culturas de 24 horas a 35°C em TSA 3% para *V. parahaemolyticus*. Os tubos foram então incubados a 35°C por 48 horas. Após a incubação foram adicionados 0,6 mL de uma solução alcoólica de α -naftol (Barrit I) e 0,2 mL de uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 40% (Barrit II). Após a adição dos reagentes os tubos eram agitados e os resultados observados em até 30 minutos. *V. parahaemolyticus* é negativo para esta prova, isto é, não há o aparecimento de uma coloração vermelha.

Na Tabela 1 são apresentadas as características bioquímicas do *V. parahaemolyticus*.

Tabela 1– Padrão dos testes bioquímicos empregados na identificação de cepas de *Vibrio parahaemolyticus*.

Testes	<i>V. parahaemolyticus</i>
Gram	-
Oxidase	+
Fermentação de arabinose	+
Fermentação da lactose	-
Fermentação do celobiose	-
Fermentação da sacarose	-
Motilidade	+
Voges Proskauer	-
Arginina	-
Lisina	+
ONPG	-
Crescimento a 42°C	+
Halofilismo	
0% de NaCl	-
3% de NaCl	+
6% de NaCl	+
8% de NaCl	+

4. RESULTADOS

Na Tabela 2 são apresentados os resultados relativos à sorologia das cepas confirmadas de *Salmonella* por amostras. Das 44 cepas que foram isoladas, 31 apresentaram aglutinação frente ao antisoro para *Salmonella* O:H. As cepas confirmadas na sorologia foram enviadas à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para identificação do sorovar.

Tabela 2 – Número de cepas confirmadas na sorologia para *Salmonella*, isoladas de caranguejos comercializados na Avenida Bezerra de Menezes, Fortaleza, CE.

Coleta	Nº de cepas isoladas	Nº de cepas confirmadas	% de confirmação
1 ^a	3	1	33
2 ^a	3	1	33
3 ^a	3	3	100
4 ^a	2	2	100
5 ^a	2	2	100
6 ^a	2	0	0
7 ^a	4	2	50
8 ^a	3	3	100
9 ^a	4	1	25
10 ^a	5	5	100
11 ^a	4	4	100
12 ^a	1	1	100
13 ^a	1	1	100
14 ^a	3	2	67
15 ^a	4	3	75

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do Número Mais Provável de *Vibrio* nas amostras de caranguejos. O NMP de *Vibrio* variou de > 110/g a >110.000/g de carne de caranguejo.

Foram isoladas 45 cepas de *Vibrio* sendo oito confirmadas como *Vibrio parahaemolyticus* e duas como *Vibrio alginolyticus*. O restante das cepas não se pôde chegar à espécie.

Tabela 3 – Número Mais Provável (NMP) de *Vibrio* nos caranguejos comercializados na Avenida Bezerra de Menezes, Fortaleza, CE.

Coletas	NMP / g
1 ^a	> 110
2 ^a	>110
3 ^a	>110
4 ^a	4.600
5 ^a	24.000
6 ^a	11.000
7 ^a	110.000
8 ^a	>110.000
9 ^a	110.000
10 ^a	110.000
11 ^a	4.300
12 ^a	110.000
13 ^a	11.000
14 ^a	9.300
15 ^a	9.300

5. DISCUSSÃO

De 44 cepas isoladas das quinze amostras de caranguejo, foram confirmadas 31 como *Salmonella* spp. Isto significa que 70,45% das cepas eram da bactéria. Observando o número de cepas positivas para *Salmonella* em cada amostra verificou-se que de 15 amostras, oito apresentaram 100% de confirmação e o restante variando entre 25 a 75%. No entanto, ao se verificar o total de amostras contaminadas com a bactéria é possível constatar que 93,3% delas estavam infectadas por *Salmonella* (Tabela 1).

Os dados encontrados neste trabalho discordam daqueles publicados por Reinhard et al. (1996). Estes, analisando amostras de caranguejo azul, *Callinectes sapidus* provenientes da Baía de Chesapeake, Virgínia (EUA), não detectaram qualquer cepa de *Salmonella*.

As salmonelas são microrganismos de ampla disseminação, capazes de se difundir com facilidade pelos alimentos a partir de um único produto contaminado (SANTOS et al., 2002), razão por que a RDC 12/2001 tem a tolerância zero para esta bactéria (BRASIL, 2001).

Embora não seja isolada normalmente de peixes e moluscos bivalves capturados em mar aberto, esses microrganismos podem ser encontrados em produtos marinhos capturados em águas contaminadas. Em produtos crus que serão posteriormente cozidos, *Salmonella* não apresenta perigo direto à saúde, uma vez que a cocção a destrói, completamente. Há uma grande preocupação em produtos ingeridos crus e em produtos prontos para o consumo que não sofram um processamento térmico posterior. *Salmonella* pode ser transmitida para outros alimentos através de contaminação cruzada. Por ser um habitante normal do trato intestinal do homem e animais, sua presença indica contaminação fecal direta ou indireta (BEIRÃO et al., 2003)

A grande preocupação é que nos caranguejos que foram cozidos a *Salmonella* é destruída, mas a bactéria pode ser reintroduzida do ambiente ou de caranguejos crus durante o processamento (JACKSON et al., 1997).

Nos Estados Unidos, salmonelas não tifóides têm sido associadas a peixes e crustáceos, enquanto *S. Paratyphi* e *S. Enteridis*, a camarão e

moluscos bivalves. *S. Typhi* tem sido a principal bactéria associada com doenças veiculadas por moluscos (FELDHUSEN, 2000).

Mohamed Hatha, Lakshmanaperumalsamy (1997), analisando 730 espécies de peixes e 276 de crustáceos em mercados de peixe em Coimbatore, sul da Índia, encontraram *Salmonella* em 14,25% das amostras de peixes e 17,39% nas de crustáceos, tendo sido o canal alimentar, nos peixes e as brânquias, nos crustáceos, o *habitat* favorito da bactéria.

De um modo geral, tem-se observado que os produtos não cozidos suficientemente ou que não sejam mantidos sob refrigeração apropriada são os que oferecem maiores riscos, sendo que a manipulação excessiva pode representar um agravamento da situação. As infecções por *Salmonella* assumem um caráter especial, pois sua presença não é denunciada pela alteração do aspecto, sabor ou outras características visíveis nos alimentos (MAGNANI et al., 2002).

Os NMPs para *Vibrio*, apresentados pelas amostras de caranguejo e com grande variações, estão dispostos na Tabela 2. Somente 10, das 45 cepas isoladas, foram identificadas, sendo oito de *V. parahaemolyticus* e duas de *V. alginolyticus*.

V. parahaemolyticus tem sido reconhecido como um importante patógeno capaz de determinar manifestações gastrentéricas após o consumo de pescado crus ou mal cozidos. Encontra-se amplamente distribuído no ambiente aquático, particularmente salino, tendo sido isolado em águas costeiras de todos os continentes. Apresenta uma variação sazonal, com maior freqüência de isolamento nos meses de verão quando a temperatura é mais propícia. Nesse período podem ocorrer surtos ou casos esporádicos de gastroenterite causados por esse microrganismo (HAGEN et al., 1994).

Vibrio spp. tem sido isolado de várias amostras do meio ambiente incluindo água, sedimentos, plâncton, mariscos, crustáceos e superfície de peixes (DALSGAARD, 1998).

Sousa (1989) isolou 127 cepas a partir de amostras de carne de caranguejo e de ostras coletadas em praias de João Pessoa, Paraíba e obteve confirmação de 10,6 e 42,7%, respectivamente, como sendo de *V. parahaemolyticus*.

De 1973 a 1998 ocorreram 40 surtos de gastroenterite registrados nos Estados Unidos. O consumo de ostras cruas foi responsável por 35% do total. Outros alimentos implicados foram: caranguejos, camarões, lagostas e polvos (DANIELS et al., 2000).

Theophilo (1992), ao analisar carne crua e cozida de caranguejo comercializado em três barracas da Praia do Futuro em Fortaleza – CE pôde confirmar *V. parahaemolyticus* em um percentual de 42,1% na carne crua e 32,4% na carne cozida.

V. alginolyticus foi originalmente classificado como um biotipo do *V. parahaemolyticus*. Os dois são geneticamente iguais, diferindo somente na capacidade do *V. alginolyticus* fermentar a sacarose. O *V. alginolyticus* é habitante da água e de alimentos marinhos. É amplamente encontrado nos peixes, moluscos, caranguejos, ostras e camarões. Há uma maior incidência de *V. alginolyticus* em pescado durante os meses mais quentes (OLIVER; KAPER, 1997).

Apesar da grande e variada quantidade de víbrios na carne de caranguejo crua, não é possível se fazer nenhuma comparação porque a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não apresenta limites para nenhum representante desse gênero.

6 – CONCLUSÕES

Conclui-se que o elevado índice de isolamento de *Salmonella* nos caranguejos analisados é um dado preocupante, pois mostra que nas proximidades de onde os caranguejos são capturados há influência de esgotos domésticos, uma vez que a *Salmonella* é um habitante normal do trato intestinal do homem e animais, portanto, sua presença indica contaminação fecal direta ou indireta.

Ainda que o NMP de *Vibrio* tenha se apresentado em algumas coletas com valores elevados, a RDC 12/2001 não estabelece limite para *Vibrio* em carne de crustáceo “in natura” que não será consumido cru.

Recomenda-se que a cocção dos animais seja bem feita e que não haja contacto dos caranguejos cozidos, com nenhum recipiente que tenha entrado em contacto com os crus a fim de evitar a contaminação cruzada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N.; SILVA, M. I. S. Toxinfecção alimentar por *Salmonella enteritis*: relato de um surto ocorrido em São Luís-MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.80/81, p. 57-58, 2001.

ASOCIACIÓN AMERICANA DE SALUD PÚBLICA (AASP). **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre**, 15 ed. (1990). Benenson (Ed.) Traducción al español publicada por la Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C., 1992 (Publicación Científica Nº 538).

BARROS, V. R. M.; PAVIA, P. C.; PANETTA, J. C. *Salmonella* spp: sua transmissão através dos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.94, p.15-19, Mar. 2002.

BEIRÃO, L. H. et al. Bioecologia de Produtos Marinhos. In: **Processamento e Industrialização de Moluscos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL. 2003. Disponível em: <<http://www.setorpesqueiro.com.br/tecnologiadealimentos/moluscos/4bioecologia/microbiologia6.shtm>>. Acesso:10 Mai. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 janeiro 2001.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERT, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. (Ed.) **Microbiologia**, 3ª ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 1999.

CENTERS FOR INFECTIOUS DISEASES (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Infection Associated with Eating Raw Oysters and Clams Harvested from Long Island Sound – Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. **MMWR**, v.48, n.3, p.48-51, Jan. 1999.

COSTA, R. S. **Fisioecologia do caranguejo Uçá –*Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus ,1763) (Crustáceo, decápode) do nordeste brasileiro**. 1972. p.121. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

DALSGAARD, A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp and *Salmonella* in aquaculture. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 33, p. 127-138, 1998.

DANIELS, N. A. et al. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.284, n.12, p.1541-1545, 2000.

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN (DSZM). Bacterial nomenclature up-to-date. 2002. Disponível em: <<http://www.gbf.de/dsmz/bactnom/bactname.htm>> Acesso em: 01 Jun. 2003

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

HAGEN, C. J. et al. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in various seafoods with two enrichment broths. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.5, p.403-409, 1994.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. Tradução de Silvia Penetta Nascimento e Marcelo Arruda Nascimento. São Paulo: Varela, 1998. Título original: Food poisoning and food hygiene.

JACKSON, T. C.; ACUFF, G. R.; DICKSON, J. S. Meat, poultry, and seafood. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington DC: ASM Press, 1997, p. 83-99.

LEITÃO, M. F. F. Microrganismos patogênicos em alimentos. In: ROITMAN, I; TRAVASSO, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed) **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. p. 30-31.

LIMA, F. C. Víbrios marinhos II. Víbrios não coléricos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.49, p.8-13, Maio/Jun., 1997.

KAYSNER, C. A.; DePAOLA JR, A. *Vibrio*. In : DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association (APHA). Washington, DC. 2001

MAGALHÃES, T. F. **Influência da temperatura na recuperação de cepas de *V. parahaemolyticus* inoculadas em caudas de lagosta do gênero *Panulirus white***. p. 75 Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

MAGNANI, A. L. et al. Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína in natura e salame colonial, consumido pela população de Chapecó-SC. **Higiene Alimentar**. São Paulo, vol.14, n. 73, p. 44-47. Jun. 2002.

MATTÉ, G. R. et al. Distribution of Potentially Pathogenic *Vibrio* in Oysters from a Tropical Region. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.10, p. 870-873, 1994.

MOHAMED HATHA, A. A.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, London, v. 14, p. 111-116, 1997.

OLIVER, J. D.; KAPER, J. B. *Vibrio* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington DC. ASM Press, 1997, p. 228-264.

PAIVA, M. P. **Recursos pesqueiros estuarinos marinhos do Brasil**. Fortaleza: UFC. p. 238-239, 1997.

PEREIRA, F. S.; GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. A. Natural occurrence of *Vibrio* spp. and *Listeria monocytogenes* in molluscan shellfish in Portugal. **Journal of Shellfish Research**, v.20, n.3, p.1229-1233, Dec. 2001.

PRADO, R.; HERRERA, P.; CLAVERIE, I. Moluscos bivalves el mundo de la depuration - controles al por mayor. **Aquanotícias Internacional**, p. 29-33, Sept. 1990.

REINHARD, R. G. et al. Analysis of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* O157:H7 in fresh hand-picked blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. **Journal of Food Protection**. Des Moines. v. 59, n. 8, p. 803-807, 1996.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca. p. 659-700, 1996.

SANTOS, L. R. et al. *Salmonella* Enteritis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102/103, p. 93-99, Nov/Dec, 2002.

SILVA, A. I. M. **Bactérias de origem fecal, contaminantes de ostras *Crassostrea rhizophorae*, oriundas de criadouro natural no estuário do Rio Cocó, Fortaleza-Ceará**. p.64. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, 2003.

SOUSA, C. P. Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em águas marinhas costeiras em carne de caranguejo (*Callinectes sp*) e ostras (*Crassostrea sp*) em João Pessoa. p.99. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, 1989.

THEOPHILO, G. N. D. Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em caranguejos comercializados em Fortaleza - CE - Brasil. p .122. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, 1992.

TWEDT, R. M. *Vibrio parahaemolyticus*. In: Doyle, M. (Ed.). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcial Dekker, 1989.

VIEIRA, R. H. S. F. (Ed) **Microbiologia , higiene e qualidade do pescado : teoria e prática**. São Paulo: Dissertação (Mestrado) Ed Varela. (no prelo).

