



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PESQUISA DE VÍBRIOS EM OSTRAS, *Crassostrea rhizophorae*,
COLETADAS NO ESTUÁRIO DO RIO COCÓ.

FRANCISCA GLEIRE RODRIGUES DE MENEZES

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 - BRASIL
FEVEREIRO/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)

M511p Menezes, Francisca Gleire Rodrigues de.

Pesquisa de Víbrios em ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas no estuário do Rio Cocó / Francisca Gleire Rodrigues de Menezes. – 2003.

41 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. Ostra. 2. Vibrio. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA, D.Sc.
Orientador/Presidente

Prof. OSCARINA VIANA SOUSA, M.Sc.

Prof^ª. SILVANA SAKER SAMPAIO, Ph.D.

VISTO:

Prof. MOISÉS ALMEIDA DE OLIVEIRA, D.Sc.
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof^ª MARIA SELMA RIBEIRO VIANA, M.Sc.
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

- Aos meus amados irmãos Suyane e Alexandre, e tia Francisca que sempre estiveram ao meu lado acreditando e torcendo por mim.
- Aos meus primos e tios pelo apoio.
- Às minhas companheiras Alessandra, Ana Maria, Claudia, Carol, Janisi, Karine e Melissa por todo carinho e paciência no decorrer dos anos.
- À Norma uma amiga valiosa, por seu apoio e paciência na elaboração deste trabalho.
- À “grande” Oscarina por sua amizade e companheirismo.
- À Cilene e Daniel pela valiosa colaboração nos trabalhos de campo.
- As companheiras do laboratório, Elenice, Daniele e Sandra (escravas), Ana Márcia, Isabel, Leyla, Edite, Cristiane, Hilda, Waleska e Karla (servas), Regina e Susy (senhoras feudais) Flávia, Carlos Riedel, Hauston (HBA), Leopoldo, Rômulo e dona Zuíla.
- À Prof^a Dr^a Silvana Saker por sua amizade.
- Aos companheiros de caminhada Evenice Neta, Ana, Paulo André, Kelly, Ediane, Naldo, Neide e Rafaella por toda força e compreensão.
- Ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) por ter permitido o uso de suas instalações para a realização desse projeto.
- A todos os colegas de jornada: Lula, Lelis, Neto, Marisa, Luciana, Emanuelle, Ronaldo, Alex (Chico Doido), Deibim, Kílvia, Cândida, Viviana, Kyria, Bartolomeu, Juninho, Tony, Seu Edílson e Leny...

RIO

Rios, precisamos navegar limpos
sob pena de sermos causadores
de doenças e males.

Rios precisamos navegar limpos
sob pena de prejudicarmos
os homens que nos vêem belos

Rios, precisamos navegar limpos
sob pena de encontrarmos o mar
e nos somarmos nas nossas sujeiras.

Rios precisamos ser limpos
para que românticos nos contemplem
e nos amem em seus versos.

Rios precisamos ser limpos
Pecados já tiramos dos homens,
agora não seremos nós, os pecadores.

Rios, somos água e como tal
lavamos as sujeiras do mundo
Por que nos atiram esta maldição?

Por que eles? Se os mesmos que sofrem,
são os que nos atiram dejetos?
Eles, um dia, serão julgados por tal ato.

Sumário

	Página
Resumo	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Anexo	x
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Objetivo Geral	3
1.1.1 – Objetivos Específicos	3
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – Surtos e Doenças Microbianas	4
2.2 – Víbrios	5
2.2.1 – Taxonomia	5
2.2.2 – Características do Microrganismo	5
2.2.3 – Habitat	6
2.2.4 – <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6
2.2.4.1 – Morfologia e caracterização	6
2.2.4.2 – Fisiologia	7
2.2.4.3 – Características da doença causada pelo <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7
2.2.4.4 – Mecanismo de patogenicidade	9
2.2.5 – <i>Vibrio cholerae</i>	10
2.2.5.1 – Morfologia e caracterização	10
2.2.5.2 – Fisiologia	11
2.2.5.3 – Características da cólera	11
2.2.5.4 – Mecanismo de patogenicidade	13

2.6 – Moluscos bivalves	14
3 – MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 – Obtenção das amostras para análise	15
3.2 – Medida de salinidade	15
3.3 – Preparo das amostras e suas diluições	15
3.4 – Isolamento e identificação das cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>V. cholerae</i>	16
3.5 – Identificação das cepas suspeitas	16
3.5.1 – Identificação presuntiva	16
3.5.2 – Identificação definitiva	18
4 – RESULTADOS	20
5 – DISCUSSÃO	23
6 – CONCLUSÃO	26
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

A contaminação do mar devido ao lançamento de efluentes origina dois tipos de problemas relevantes em saúde pública: riscos associados a banhos em locais contaminados e ao consumo de animais habitantes dessa zona. Este trabalho teve como objetivo principal pesquisar o nível de contaminação por *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*, em ostras, *Crassostrea rhizophorae*, provenientes de doze colheitas no estuário do rio Cocó, região de Sabiaguaba, Fortaleza - CE, no período de setembro de 2000 a abril de 2001. Cada colheita constava de aproximadamente 35 ostras, perfazendo um total de 420 indivíduos analisados. Das 39 cepas sacarose-negativas e 57 positivas, isoladas das amostras, apenas uma foi confirmada como *Vibrio parahaemolyticus* e 22 como *Vibrio cholerae*. Estas foram submetidas ao teste de sorologia, sendo que 20 apresentaram positividade para *Vibrio cholerae* não O1. Duas das cepas de *Vibrio cholerae* estavam na forma rugosa. O consumo de ostra, sem prévia cocção, representa um perigo para a saúde pública, com riscos de desenvolvimento de doença entérica nos consumidores.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Características bioquímicas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>V. cholerae</i> .	19
Tabela 2 – Resultado do número de isolamento de cepas das amostras de ostra, <i>Crassostrea rhizophorae</i> , sacarose negativas e positivas, e suas respectivas confirmações como <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>V. cholerae</i> .	20
Tabela 3 – Resultados das análises de salinidade (‰), nas águas do Rio Cocó, região de Sabiaguaba, Fortaleza, CE.	21
Tabela 4 – Número e característica sorológica das cepas de <i>Vibrio cholerae</i> isoladas das ostras, <i>Crassostrea rhizophorae</i> , no rio Cocó, mangue de Sabiaguaba, Fortaleza, CE.	22

PESQUISA DE VÍBRIOS EM OSTRAS, *Crassostrea rhizophorae*, COLETADAS NO ESTUÁRIO DO RIO COCÓ.

Francisca Gleire Rodrigues de Menezes

1 – INTRODUÇÃO

A utilização de moluscos bivalves como alimento, data da época paleozóica. O cultivo de moluscos foi realizado, inicialmente, pelos japoneses (2000 a.C.) e romanos (100 a.C.), alcançando, nos dias atuais, elevado nível tecnológico, tornando-os iguaria de real valor nutritivo e elevado consumo (LIRA et al., 2000).

Pouco a pouco os moluscos foram se incorporando na dieta humana, aumentando desde então seu consumo. Inicialmente, a exploração de ostras se dava de forma artesanal e para o consumo doméstico. Nos últimos anos, devido à utilização industrial, a prática da ostreicultura tem-se intensificado, cada vez mais, no Brasil.

Os moluscos bivalves são organismos filtradores e por isso bioacumuladores, concentrando no seu interior elevadas doses de microrganismos e substâncias químicas presentes na água. Os moluscos são normalmente utilizados como indicadores de poluição marinha.

A descarga de esgotos domésticos e efluentes industriais sem um devido tratamento, em águas estuarinas e no oceano, vem causando problemas de contaminação nas águas marinhas e em animais aquáticos. A contaminação por esses organismos representa um grande risco à saúde pública e é responsável por impactos sociais e econômicos.

Segundo Cerutti e Barbosa (1991), a contaminação do mar devido ao lançamento de efluentes origina dois tipos de problemas relevantes em saúde pública: riscos associados a banhos em locais contaminados e riscos ligados ao consumo de animais habitantes dessa zona, como por exemplo, ostras e mexilhões.

Entre os mariscos, a ostra recebe particular atenção, em razão de sua capacidade de filtrar cerca de 5 litros de água por hora. A não seleção dos alimentos ingeridos, particularmente, dos microrganismos, os quais ficam retidos nos seus sífões, representam fator de risco para o homem. Uma vez que seu consumo normalmente se faz "in natura" a veiculação de inúmeros patógenos, inclusive o *Vibrio parahaemolyticus* é um fator de suma importância.

A ingestão de moluscos crus ou parcialmente cozidos é preocupante no que diz respeito à Saúde Pública, porque esses organismos são relacionados à veiculação de doenças tais como: hepatite, febre tifóide, cólera, salmoneloses, infecções por *V. parahaemolyticus*, e envenenamento por biotoxinas paralisantes que podem levar à morte (SANCHEZ et al., 1991).

Segundo Brea et al. (1994), a elevada incidência de processos infecciosos entéricos na população em geral, juntamente com os elevados índices de morbidade e mortalidade entre determinados grupos etários, como as crianças e os anciões, faz com que este tipo de patologia constitua motivo de especial interesse tanto do ponto de vista clínico como microbiológico.

Capazes de se multiplicar sem hospedeiro em águas marinhas e, possuindo nutrição saprófita, os víbrios demonstram ocorrência na coluna d'água e na fauna, em relação direta com a temperatura (LIMA, 1997). A presença de víbrios halofílicos é alta em amostras de água e alimentos marinhos (WONG et al., 1992).

Segundo DePaola, Mcheroy e Modlanes (1997), grande parte das doenças veiculadas por alimentos está relacionada à ingestão de alimentos crus. No período de julho a setembro de 1998, em Nova Jersey e Nova York, *V. parahaemolyticus* esteve associado a um surto de infecção ocasionado pelo consumo de ostras e moluscos crus (CDC, 1999).

Com a crescente tradição da ingestão de ostras cruas nas barracas de praia por banhistas e freqüentadores, as ostras se tornaram na atualidade, alimentos perigosos para o consumidor.

De acordo com Matté et al. (1994), quando o alimento está contaminado por *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ou *V. vulnificus*, aconselha-se impedir a distribuição do alimento até que, medidas preventivas sejam tomadas pelas autoridades da saúde.

Pereira, Guerra e Bernardo (2001), ressaltam ainda que os *Vibrio* spp. estão sendo freqüentemente encontrados em produtos marinhos considerados seguros, e que, o significado de Saúde Pública com relação a este fato não deve ser negligenciado.

A incidência de microrganismos em alimentos de origem marinha, tomando-se como exemplo as ostras, depende em grande parte da qualidade microbiológica do *habitat* desses animais. No cultivo de moluscos, todos os riscos de toxinfecções estão normalmente associados ao ambiente de cultivo. Nele, quando o molusco é cultivado intencionalmente, o produtor pode exercer controle sobre a qualidade intrínseca do produto, incluindo a segurança, o que não ocorre em criadouros naturais onde esse controle nem sempre é possível em razão do hábito alimentar filtrador do animal. Neste, quando capturado em águas estuarinas, persiste sempre a possibilidade de se encontrar contaminação por patógenos de esgoto e/ou mesmo do ambiente.

Assim sendo, torna-se imprescindível o monitoramento da qualidade microbiológica dos bivalves, como o principal método de prevenção de toxinfecção alimentar.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de contaminação por vibrios em amostras de ostras, no estuário do rio Cocó, na região de Sabiaguaba, Fortaleza, Ceará.

1.1 – Objetivo Geral

Avaliar o grau de contaminação por vibrios em amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, de um criadouro natural, no estuário do rio Cocó, região de Sabiaguaba, Ceará.

1.1.1 – Objetivo Especifico

- ✓ Identificar e quantificar *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae* em ostras, coletadas no estuário do rio Cocó.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Surtos e Doenças Microbianas

Doenças microbianas de origem alimentar ou toxinfecções alimentares constituem um grupo de doenças, no qual o alimento contaminado é o mais importante veículo do agente patogênico (PAIVA; BORGES; PANETTA, 2000).

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

Segundo a ASOCIACIÓN AMERICANA DE SALUD PÚBLICA (AASP, 1992), um fato de grande importância para a ocorrência de surtos, é o costume de muitos países em consumir frutos do mar “in natura”. O Japão figura entre os países onde ocorre maior número de surtos de intoxicação alimentar por *V. parahaemolyticus*, devido ao hábito do consumo de peixes, moluscos 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 ou com cozimento insuficiente.

Magalhães et al. (1991), analisando amostras de ostras coletadas no estuário do Rio Capibaribe, rio que margeia a cidade de Recife (PE), constataram que de 85% dessas ostras, 7,1% estiveram implicadas em surtos de gastroenterites, envolvendo o microrganismo *V. parahaemolyticus*.

Ostras coletadas na Baía de Galveston (Texas, EUA) foram responsáveis pela ocorrência de gastroenterites em 13 estados dos Estados Unidos, no período de 31 de maio a 10 de julho de 1998. Nesse período, 416 pessoas relataram ter tido diarreia após o consumo dessas ostras. Dos 416 indivíduos infectados, 28 apresentaram o sorotipo O3:K6 (DANIELS et al., 2000a).

No período de 1981 a 1988, 333 casos de surtos provocados por *vibrios* ocorreram em adultos na Flórida. De um total de 197 indivíduos, 59,2% haviam

consumido ostras cruas, uma semana antes de se tornarem doentes (DESENCLOS et al., 1991).

V. parahaemolyticus também esteve associado a um surto, que envolveu 209 pessoas, ocasionando uma morte, no período de julho a agosto de 1997. Estas pessoas haviam consumido ostras cruas provenientes da Califórnia, Oregon e Washington, nos Estados Unidos, e Columbia Britânica no Canadá (CDC, 1998). No período de 1997 a 1998, *V. parahaemolyticus* esteve implicado em vários surtos, ocasionados pelo consumo de ostras cruas provenientes do Noroeste do Pacífico e do Texas (CDC, 1999).

Daniels et al. (2000b) relataram que no período de 1988 a 1997, ocorreram 345 infecções esporádicas, causadas por *V. parahaemolyticus*. Desses casos, 59% apresentaram gastroenterites, 34% infecções em feridas, 5% sofreram septicemia e 2% outros sintomas.

2.2 – Vibrios

2.2.1 – Taxonomia

O gênero *Vibrio*, definido de acordo com a última atualização do Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany (DSMZ, 2002) possui atualmente 42 espécies descritas. Sua importância tem aumentado nos últimos anos com reconhecimento de espécies, que não o *V. cholerae* serovar O1 (cólera clássica) e o *V. parahaemolyticus* (manifestações gastroentéricas), como patógenos humanos. Estes incluem *V. cholerae* não O1, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. hollisae* e *V. metschnikovii*, que produzem uma variedade de infecções entéricas e não entéricas (LIMA, 1997).

2.2.2 – Características do Microrganismo

Os vibrios pertencem à família Vibrionaceae, com seus membros sendo caracterizados como bacilos Gram-negativos, retos ou curvos; móveis devido a presença de um único flagelo polar; produzem oxidase e catalase e fermentam

V. parahaemolyticus é uma bactéria anaeróbia facultativa, com metabolismo tanto respiratório como fermentativo, tendo como aceptor de elétrons o O₂ molecular (FRANCO ; LANDGRAF, 1996).

2.2.4.2 – Fisiologia

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria halófila, que melhor cresce em meios contendo 2-3% de cloreto de sódio, podendo porém se multiplicar a uma concentração de até 8% desse sal. Seu ótimo de crescimento encontra-se na faixa de 2 a 4% de cloreto de sódio (THEOPHILO, 1992). Na maioria dos casos, as cepas isoladas são urease negativas, porém com algumas urease positivas, diferença essa que pode servir de marcador epidemiológico (AASP, 1992).

A temperatura ótima de crescimento de *V. parahaemolyticus*, em meio de cultura, é de 37°C. No entanto, esta bactéria 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 de 7,3, mas este valor eleva-se para 7,6 na concentração salina de 7%. O crescimento ocorre em uma ampla faixa de pH (5,0 a 11,0), sendo o ótimo entre 7,5 e 8,5 (FRANCO ; LANDGRAF, 1996).

Ainda segundo os autores, *V. parahaemolyticus* é um microrganismo relativamente frágil, sendo muito sensível à desidratação e ao calor. Estudos realizados demonstraram que em amostras de homogeneizados de ostras, aquecidos a 60°C e 80°C, poucos sobreviventes restaram após 15 minutos. Quando a temperatura foi elevada para 100°C, nenhuma cepa foi recuperada. A sensibilidade do *V. parahaemolyticus* com relação ao frio é amplamente reconhecida, embora haja controvérsias entre os pesquisadores, de qual seja a melhor temperatura para sua estocagem.

2.2.4.3 – Características da doença causada pelo *Vibrio parahaemolyticus*

As infecções alimentares por *V. parahaemolyticus* ocorrem de forma esporádica e de uma fonte comum. Os países mais afetados pelos surtos são o

Japão, Taiwan e outras regiões litorâneas da Ásia. Casos de surtos são descritos também em muitos países e continentes (AASP, 1992).

O Japão teve o primeiro caso de surto por *V. parahaemolyticus* descrito em 1953 (CHEN ; CHANG, 1996). Nesse país, dos surtos de infecções alimentares que ocorrem nos meses de verão, 50 a 70% deles se deveram a essa bactéria (SNYDMAN ; GORBACH, 1991).

Freqüentemente, a doença causada pelo *V. parahaemolyticus* se manifesta como casos esporádicos de uma gastroenterite relativamente leve, com sintomas tais como diarreia, vômito e cólicas abdominais. Raramente o microrganismo pode produzir septicemia grave, com perigo para a vida do paciente. Isto ocorre, especialmente, em pessoas enfermas por doenças hepáticas ou deficiências imunológicas (INFORMATIVO INSPETOR DE PESCADO, 2000).

V. parahaemolyticus é isolado com freqüência de peixes, moluscos e crustáceos em águas litorâneas de climas tropicais ou nos meses de verão em climas frios ou temperados (AASP, 1992).

O período de incubação da doença varia de 12 a 24 horas, podendo ainda variar de 6 a mais de 96 horas. Os sintomas mais comuns são uma disenteria aquosa com duração de 2 a 3 dias, que em alguns casos envolve fezes mucóides e sangüinolentas, podendo haver então nos casos mais graves, necessidade de hospitalização. Os outros sintomas mais comuns são diarreia, dores abdominais, náuseas, vômito, dor de cabeça, febre baixa e calafrios (TWEDT, 1989). Essa infecção pode causar ainda problemas sérios em pessoas com doenças já existentes, como por exemplo, alcoólatras, diabéticos, portadores de doenças renais, sistema imunológico comprometido e problemas gastrintestinais (CDC, 1998).

V. parahaemolyticus pode causar ainda infecções extra-intestinais, tendo sido isolado de feridas das extremidades dos olhos, ouvidos e do sangue (FRANCO ; LANDGRAF, 1996).

Os peixes, crustáceos e moluscos infectam o microrganismo da água do mar, servindo então de fonte de infecção para o homem, quando este os consome "in natura" ou insuficientemente cozidos. Para infectar-se, o homem necessita de uma carga de *V. parahaemolyticus*, de 10^5 a 10^7 da bactéria (TWEDT, 1989).

Peixes recém-capturados apresentam uma carga de *V. parahaemolyticus* de 100/g ou menos, enquanto que nos moluscos essa carga é de $\pm 1.100/g$. De acordo com alguns pesquisadores, presume-se que essa carga microbiana elevada dos moluscos se deva mais ao seu manuseamento desde sua captura, do que mesmo da água de onde eles provêm. Devido ao tempo de geração do *V. parahaemolyticus* ser muito breve (em torno de 12 minutos), basta a exposição do alimento à temperatura ambiente por algumas horas, para que a carga bacteriana seja suficiente para produzir infecção no homem (AASP, 1992).

Gooch et al. (2002), analisando o tempo de geração de *V. parahaemolyticus* em amostras refrigeradas de ostras, verificaram um elevado aumento de células após 24 horas de refrigeração (log 2,9 UFC/g), com uma diminuição ocorrendo após 14 dias de refrigeração (log 0,8 UFC/g).

2.2.4.4 – Mecanismo de Patogenicidade

Estudos voltados para o mecanismo de virulência do *V. parahaemolyticus* mostraram que amostras patogênicas produzem hemolisina. A hemólise ocorre devido à produção de uma hemolisina extracelular termoestável (Thermoestable Direct Hemolysin) que recebe o nome de fenômeno de Kanagawa (MATTÉ et al., 1994; YAM et al., 1999). A maioria das cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* são hemolíticas, não ocorrendo o mesmo com amostras ambientais de água e solo. Segundo DePaola et al. (2000), mais de 90% das cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* e menos de 1% de cepas ambientais e de alimentos produzem TDH. No entanto, tem-se demonstrado que cepas TDH negativas podem causar enfermidades, produzindo uma toxina imunológica TRH - Thermoestable Related Hemolysin com propriedades bastante similares a TDH (AASP, 1992).

Yoh et al. (1992), comparando cepas ambientais de *V. parahaemolyticus* isoladas de águas marinhas ou de frutos do mar, produtoras de TRH, com as TRH de cepas de pacientes diarreicos, encontraram resultados bastante similares.

Para Franco e Landgraf (1996), as cepas de *V. parahaemolyticus* são capazes de aderir à superfície epitelial da mucosa e penetrar no epitélio

intestinal produzindo uma bacteremia em coelhos recém-nascidos, em jejum. Outros testes realizados com cepas Kanagawa-positivas e negativas demonstraram a mesma aderência e invasão. No entanto, até o momento, a hemolisina de Kanagawa – termoestável – é considerada o principal fator de virulência para *V. parahaemolyticus*. Ela é letal, citotóxica e cardiotóxica.

2.2.5 – *Vibrio cholerae*

2.2.5.1 – Morfologia e caracterização

V. cholerae são bastonetes móveis de 0,5 por 1,5 a 3,0 micrômetros, geralmente apresentando uma forma curvada ou de vírgula, embora segundo Felsenfeld (1966), possam aparecer sob formas retas em algumas colônias mais velhas. Esses vibrios possuem um único flagelo polar e são incapazes de esporular ou formar cápsula.

A bactéria *V. cholerae* é a causadora da cólera epidêmica e existe sob dois biótipos (clássico e El Tor) e três sorotipos (Inaba, Ogawa e Hikojima) (FEACHEM et al., 1983). Até recentemente, associava-se a epidemia de cólera somente às cepas capazes de produzir toxina e pertencentes ao sorogrupo O1. Por essa razão, as cepas de *V. cholerae* eram classificadas em *V. cholerae* O1 e não O1. Entretanto, em 1993, houve o primeiro relato de uma nova doença, semelhante à cólera, na região da Índia e Bangladesh, onde estudos revelaram que o microrganismo isolado não pertencia a nenhum dos sorogrupos previamente descritos para *V. cholerae*, mas a um novo sorogrupo, ao qual foi dado a designação O139 e o sinônimo de Bengal (FRANCO ; LANDGRAF, 1996). Segundo alguns autores, é o indício do começo de uma oitava pandemia.

O sorogrupo O139 é o segundo agente etiológico na epidemia de cólera depois do clássico e El Tor. A bioquímica e a fisiologia deste novo sorogrupo se apresentam com maior semelhança para as cepas de El Tor O1 do que para as cepas clássicas O1 (JOHNSON et al., 1994).

O vibrião colérico é um germe frágil, que suporta mal certas condições ambientais desfavoráveis, como o dessecamento, a exposição à luz solar e a competição com outros organismos. Seu tempo de sobrevivência na água

depende de diversos fatores, como a temperatura, o pH, a riqueza em bactérias, sais e matéria orgânica (GÓES; PASSOS; MONTAL, 1996).

2.2.5.2 – Fisiologia

Segundo o ICMSF (1978), o ótimo de salinidade para o crescimento de *V. cholerae* é 1%, no entanto a bactéria pode apresentar crescimento na faixa de 0 a 6% , sendo inibido a 8%.

Colwell e Huq (1994) citam que no isolamento do vibrião colérico, de ambientes aquáticos, foi notado, com maior frequência, uma maior correlação linear entre a ocorrência do *Vibrio* e a salinidade, em locais onde este último parâmetro estava entre 0,2 e 2,0 mg/L.

O *V. cholerae* requer uma temperatura entre 10 e 40°C para se multiplicar, sendo o seu ótimo 35°C (OPS, 1993). Segundo Felsenfeld (1966), o *V. cholerae* possui pouca resistência ao calor, sendo eliminado por aquecimento a 56°C por 30 minutos e em temperatura de ebulição, em poucos segundos. Esse *Vibrio* tolera bem o frio, entretanto, quando em estações frias, sua sobrevivência vai depender de sua capacidade de permanecer em estado de letargia (COLWELL ; HUQ, 1994).

Com relação ao pH, as condições mais favoráveis para o desenvolvimento do *V. cholerae* estão no intervalo de 3,5 a 9,0, podendo o organismo sobreviver em pH de até 10,0 (OPS, 1993).

2.2.5.3 – Características da cólera

A cólera é causada pelo *V. cholerae*, uma bactéria Gram-negativa isolada por Robert Koch em 1883 (ALCAMO, 1994) e é uma doença endêmica no subcontinente da Índia, continuando a emergir em outros lugares na Ásia, África e nas Américas, com uma incidência estimada em 5 milhões de casos por ano (BANERJEE et al., 2002).

No entanto, só foi reconhecida em 1817 quando se espalhou por outros países, causando a Primeira Pandemia. A Segunda Pandemia teve início em 1829, quando o vibrião colérico disseminou-se através da Europa atingindo, em 1832, a América do Norte. A Terceira Pandemia, iniciada em 1852, foi

estudada por John Snow que esclareceu vários fatos relacionados à doença. A Quarta Pandemia durou de 1864 a 1875; a Quinta de 1887 a 1896 e a Sexta foi de 1902 a 1923 (FRANCO ; LANDGRAF, 1996).

Em 1961, teve início a Sétima Pandemia que dura até o momento. Nesta, o agente causador é o *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, sorotipo Inaba (MORAES et al., 2000). O período de incubação da cólera varia de seis horas a cinco dias. As pessoas infectadas com o vibrião podem, ou não, apresentar sintomatologia ou, ainda, apresentar diarreia moderada ou diarreia aquosa e profusa. Nos casos mais severos pode haver perda de mais de 1 litro de fezes por hora, levando à perda rápida de líquido, colapso circulatório e à morte, quando na ausência de terapia (FRANCO ; LANDGRAF, 1996).

A infecção aparece, no homem, pela ingestão de vibriões da cólera, cuja fonte são excretas de pessoas infectadas. Os mesmos mecanismos diretos ou indiretos de transmissão que ocorrem em outras infecções entéricas se aplicam à cólera. Todavia, é razoável supor que o contato direto e a transmissão indireta de pessoa a pessoa, através de alimentos contaminados com excretas por meio das mãos e moscas, também possam ser uma fonte de transmissão da enfermidade (OPS, 1991). Assim, o ciclo de transmissão homem-meio ambiente mantém a doença.

Segundo Franco e Landgraf (1996), nos surtos, pode haver associação com uma fonte comum de alimento. Além disso, o *V. cholerae* sobrevive por longos períodos em água do mar não esterilizada (sete dias) e esterilizada (25 dias). Em frutos do mar, o período de sobrevivência é de 45 dias. Estes intervalos de tempo, no entanto, variam conforme a temperatura de armazenamento, sendo que a refrigeração tende a prolongá-los.

Devido ao *V. cholerae* se apresentar muito sensível em pH ácido, é necessário a ingestão de uma alta dose infectante (entre 10^6 e 10^8 por grama) para ultrapassar a acidez gástrica, reconhecida como a primeira linha de defesa contra esse organismo (OPS, 1993). Em indivíduos sensíveis, que apresentam a barreira da acidez estomacal ausente ou menor, esse número pode ser mais baixo (mínimo de 10^3 /g ou mL) (MORAES et al., 2000).

A doença geralmente tem um começo brusco, com perdas volumosas, mas também pode começar lentamente com diarreia leve nas primeiras 24 horas. A partir daí, pode ocorrer vômito, junto com câibras musculares devido à

baixa nos níveis de potássio sangüíneo (hipocalemia) e febre (FEACHEM et al., 1983; OYOFO et al., 2002).

O primeiro sintoma da doença é a sede, que começa quando a perda de água é igual a 20-30 mL/Kg. Uma perda de 50-80 mL/Kg causa debilidade, letargia e sinais de hipotensão como desmaio ou síncope. Caso o déficit aumente além de 80 mL/Kg, a sede torna-se mais intensa, diminuindo o fluxo renal, resultando em oligúria, seguida de anúria (SOUSA, 1999).

2.2.5.4 – Mecanismo de Patogenicidade

V. cholerae penetra no organismo humano através da via oral e, após vencer a acidez estomacal, atravessa o piloro atingindo o intestino delgado. Nesse local produz uma exotoxina (toxina da cólera) que atua nas células da mucosa intestinal localizadas na cripta das vilosidades. A presença da toxina colérica altera o balanço do transporte de íons (Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+), provocando a diminuição do fluxo de íons Na^+ para o interior do tecido, causando um aumento no fluxo de íons Cl^- (água) do tecido para o lúmen, resultando em diarreia intensa e alteração no balanço de eletrólitos (FRANCO ; LANDGRAF, 1996).

Existem evidências de que as prostaglandinas e o sistema nervoso entérico também estejam envolvidos na resposta do organismo à presença da toxina colérica e que o mecanismo “clássico” de ativação da adenilciclase não seja o único responsável pela perda de líquido causada por essa toxina (OLIVER ; KAPER, 1997).

A importância da toxina como fator de virulência é indiscutível. Cepas mutantes de *V. cholerae* que não a produzem causam a diarreia característica, apesar de provocarem uma forma branda de diarreia devido, provavelmente, à presença de outras toxinas. Apesar destas não serem responsáveis pela diarreia característica associada à cólera, elas podem estar relacionadas à colonização bacteriana do intestino (FRANCO ; LANDGRAF, 1996).

2.6 – Moluscos Bivalves

De acordo com Lira et al. (2000), a utilização de moluscos bivalves como alimento, data de épocas bem remotas, e a qualidade sanitária do ambiente influencia a boa qualidade dos mesmos.

As ostras são moluscos sedentários, de concha dura com duas valvas. Vivem fixas a rochas ou raízes dos mangues e possuem hábito alimentar filtrador. Usam as vilosidades que existem nas suas brânquias para reter os microrganismos, isso ocorre quando correntes de água passam entre suas valvas. Dependendo do grau de poluição da água onde elas estejam fixadas, pode ocorrer um acúmulo de bactérias em seus organismos (FERREIRA ; COSTA, 2000; MORAES et al., 2000).

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

Pereira, Guerra e Bernardo (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 e constataram a presença de *V. alginolyticus* (11,4%); *V. parahaemolyticus* (6,5%); *V. vulnificus* (22,9%); *V. damsela* (9,8%) ; *V. metschnikovii* (1,6%); e *Vibrio* spp (21,3%).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Obtenção das amostras para análise

No período de setembro de 2000 a abril de 2001 foram realizadas quinzenalmente, 12 colheitas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, no estuário do rio Cocó, na região de Sabiaguaba. Cada colheita era composta de aproximadamente 35 animais, o que correspondeu no final, a análise de, aproximadamente, 420 ostras. O local escolhido para as amostragens é reconhecidamente uma área de extração de ostras, *Crassostrea rhizophorae* para comercialização e está situado entre as latitudes 03°46' S e 03°47' S a 0,2 Km da foz.

Após serem colhidas, as amostras eram transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) para a realização das análises microbiológicas.

3.2 – Medida de salinidade

A salinidade das amostras de água foi medida no laboratório utilizando o refratômetro da marca ATAGO S/MILL.

3.3 – Preparo das amostras e suas diluições

Das amostras de ostras foram retirados 25 g dos tecidos moles (com líquido intervalvar) e homogeneizadas em 225 mL de água peptona alcalina (APA) 1% adicionado de 1% de NaCl. O homogeneizado era então incubado por um período de 18 horas a uma temperatura de 42°C. Decorrido esse período foram realizadas diluições decimais (até 10⁻⁵) em água peptonada alcalina (APA).

3.4. – Isolamento e identificação das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae*

Após a realização das diluições, foi realizada a inoculação das amostras em placas com o meio agar tiosulfato-citrato-bile-sacarose – (TCBS, Difco), pela técnica de esgotamento, utilizando uma alça de níquel-cromo. As placas de TCBS foram então incubadas por 24 horas a 35°C. O método de plaqueamento para identificação de *V. parahaemolyticus* seguiu Brasil (1992).

No ágar TCBS as colônias que se apresentavam amarelas (sacarose positivas) eram suspeitas de serem *V. cholerae*, enquanto que, aquelas de coloração esverdeada (sacarose negativas) eram suspeitas de serem *V. parahaemolyticus*.

3.5 – Identificação das cepas suspeitas

As provas bioquímicas de identificação, citadas a seguir, foram selecionadas de acordo com Brasil (1992).

3.5.1 – Identificação presuntiva

Cada uma das colônias suspeitas (tanto as sacaroses positivas quanto as negativas) foi semeada em tubos de ágar tripton soja (TSA, Difco), adicionado de 1% de NaCl (para as cepas suspeitas de *V. cholerae*) e 3% de NaCl (para as suspeitas de *V. parahaemolyticus*) inclinados, foram incubados em estufa por 18-24 horas a 35°C. Decorrido esse período as culturas crescidas em ágar TSA foram utilizadas para a prova de Gram, teste de citocromo-oxidase, motilidade e teste de triagem em TSI.

As cepas de *V. parahaemolyticus* são verdes, circulares com 1 a 3 mm enquanto que as de *V. cholerae* são amarelas, translúcidas e circulares.

Teste de Gram:

Este teste foi utilizado para verificar as características morfológicas das cepas isoladas, em esfregaços corados pelo método de Gram, preparados a partir das culturas de TSA contendo 1% e 3% de NaCl. As cepas que se revelarem no esfregaço corado, como bacilos Gram-negativos, polimorfos, encurvados ou não, com o teste positivo para produção de citocromo-oxidase, foram consideradas da família *Vibrionaceae*.

Prova da produção de citocromo-oxidase:

A partir da cultura em ágar TSA, uma pequena porção do crescimento foi transferido, por meio de palitos de madeira esterilizados, para um papel de filtro "Inlab" tipo 10, com 11,0 cm embebido com o reagente aquoso para oxidase (cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina a 1%). Logo a seguir, foram realizados as leituras. O teste era considerado positivo quando ocorria o escurecimento do esfregaço. A família *Vibrionaceae* apresenta como característica, o teste da produção de citocromo - oxidase positivo.

Motilidade:

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) e em seguida incubados por 24 horas a 35°C. O teste positivo é apresentado pelo crescimento ao longo da linha de inoculação, com turvação do meio.

Teste de triagem em TSI:

Esta prova 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. Para o *V. parahaemolyticus* esta prova apresenta-se alcalina na rampa (não fermentador da sacarose e lactose) e ácida na base (produziu ácido a partir da glicose). Já o *V. cholerae*, apresenta neste meio de cultura, rampa ácida e base ácida.

3.5.2 – Identificação definitiva

Cada colônia isolada foi inoculada em ágar triptona soja (TSA, DIFCO) a 1% e 3% de NaCl, incubada por 24 horas a 35°C e estocada em estufa B.O.D. a 23°C para posteriores provas bioquímicas.

Antes do início das provas bioquímicas as cepas foram renovadas em TSA e incubadas por 24 horas a 35°C.

As provas bioquímicas utilizadas na identificação de cepas suspeitas de *V. cholerae* foram as mesmas utilizadas para *V. parahaemolyticus*, mudando apenas a concentração de cloreto de sódio que é de 1% (BRASIL, 1992).

Prova de Halofilismo:

Nestas provas, a cultura foi inoculada com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, em dois tubos de caldo triptona a 1% contendo 0 e 6% de cloreto de sódio, respectivamente. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. O *V. parahaemolyticus* cresce bem em 6% de cloreto de sódio, não se multiplicando, ou crescendo pobremente, na ausência de cloreto de sódio. O *V. cholerae* cresce bem em ausência de cloreto de sódio e, pode ou não crescer na presença de 6% de cloreto de sódio.

Prova de Fermentação de Carboidratos:

A partir do crescimento em TSA contendo com 3% de cloreto de sódio para *V. parahaemolyticus* e com até 1% de cloreto de sódio para *V. cholerae*, foram inoculados quatro tubos contendo caldo púrpura de bromocresol (DIFCO), pH $7,0 \pm 0,2$, 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, enquanto, *V. cholerae* é positivo para lactose e sacarose, e negativo para celobiose e arabinose. Este teste é visualizado pela viragem do meio de púrpura para amarelo.

Prova de Voges Proskauer:

Para este teste, foram inoculados tubos contendo caldo MR-VP (DIFCO), com alça de níquel-cromo de 3 mm, com cultivos de 24 horas em TSA 3% e 1% NaCl, incubadas a 35°C, para confirmação de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*, simultaneamente. Os tubos foram então incubados a 35°C por 48 horas. Após a incubação foram adicionados 0,6 mL de solução alcoólica de alfa-naftol a 5% (Barrit I) e 0,2 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio a 40% (Barrit II). Após a adição dos reagentes, os tubos foram agitados e os resultados observados em até 30 minutos. A positividade desta prova é visualizada pelo aparecimento de uma coloração vermelha. *V. parahaemolyticus* é negativo para esta prova, enquanto *V. cholerae* pode apresentar-se negativo ou positivo.

Na tabela 1 são apresentadas as características bioquímicas das bactérias estudadas.

Tabela 1 – Características bioquímicas de *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae*.

Testes	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>
Gram	-	-
Oxidase	+	+
Fermentação da arabinose	+	-
Fermentação da lactose	-	+
Fermentação da celobiose	-	-
Fermentação da sacarose	-	+
Motilidade	+	+
Voges Proskauer	-	-/+
Halofilismo		
0% de NaCl	-	+
6% de NaCl	+	+/-

4 – RESULTADOS

Os resultados encontrados na análise das amostras obtidas nas 12 colheitas de ostras encontram-se dispostos abaixo:

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da análise de aproximadamente 420 ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae*, coletadas no mangue do rio Cocó. Nesta tabela são apresentadas as colônias suspeitas e as confirmadas como *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*.

Tabela 2 – Resultado do número de isolamento de cepas das amostras de ostra, *Crassostrea rhizophorae*, sacarose negativas e positivas, e suas respectivas confirmações como *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae*.

Número de cepas	Total de cepas isoladas	%
Cepas sacarose negativas	39	100,00
Cepas sacarose positivas	57	100,00
<i>V. parahaemolyticus</i>	01	2,56
<i>V. cholerae</i>	22	38,60

A Tabela 3 apresenta a variação de salinidade, determinada na água do rio Cocó, durante o período das coletas realizadas.

Tabela 3 – Resultados das análises de salinidade (‰), nas águas do Rio Cocó, região de Sabiaguaba, Fortaleza, CE.

Coletas	Salinidade (‰)
1 ^a	27
2 ^a	27
3 ^a	25
4 ^a	27
5 ^a	27
6 ^a	10
7 ^a	8
8 ^a	8
9 ^a	17
10 ^a	3
11 ^a	3
12 ^a	3

Na Tabela 4 são apresentados os resultados relativos à confirmação de cepas de *V. cholerae*, através do método da sorologia.

Tabela 4 – Número e característica sorológica das cepas de *Vibrio cholerae* isoladas das ostras, *Crassostrea rhizophorae*, no rio Cocó, mangue de Sabiaguaba, Fortaleza, CE.

Coleta	Nº	Cepas isoladas	Sorologia
1ª	-	-	-
2ª	-	-	-
3ª	-	-	-
4ª	-	-	-
5ª	-	-	-
6ª	-	-	-
7ª	-	-	-
8ª	-	-	-
9ª	01	<i>V. cholerae</i>	Não O1
10ª	04	<i>V. cholerae</i>	Não O1
	02	<i>V. cholerae</i> forma rugosa	*
11ª	09	<i>V. cholerae</i>	Não O1
12ª	05	<i>V. cholerae</i>	Não O1
	01	<i>V. cholerae</i>	Não O1

*Não foi possível fazer a identificação sorológica.

5 – DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 2, ocorreu uma pequena incidência de *V. parahaemolyticus*. As 38,60 cepas restantes que apresentaram menos de 80% de similaridade com as características bioquímicas dessa bactéria foram classificadas como sendo *Vibrio* spp.

O baixo número de isolamentos desse vibrio pode ser atribuído à baixa salinidade encontrada no ambiente do estuário (Tabela 3) bem como ao próprio sistema de defesa das ostras.

Sendo uma bactéria halofílica, o *V. parahaemolyticus* revela uma exigência absoluta por cloreto de sódio com ótimo na faixa de 2 a 4% (LEITÃO, 1988).

Era de se esperar, então, que em amostras coletadas em águas cujas salinidades estivessem perto dessa faixa, tais como as das amostras de 1 a 5, fossem isoladas uma grande quantidade de cepas de *V. parahaemolyticus*, no entanto isto não aconteceu. Foi observado que alguns dos isolados apresentavam gás sulfídrico, dificultando o isolamento de *Vibrio*, levando-se a pensar que bactérias que produzem gás estivessem associadas a esse gênero.

Essa suspeita foi fortalecida pelo fato de que entre as cepas isoladas das placas de TCBS, várias foram identificadas como *Proteus* spp. e *Morganella morganii* que reconhecidamente possuem a característica de produzir H₂S (O'HARA; BRENNER ; MILLER, 2000). As bactérias pertencentes a esses gêneros têm seu habitat normal no meio ambiente, residindo no intestino de humanos saudáveis e animais (ALEKSIC ; BOCKEMÜHL, 1999).

Para Volety et al. (1999), durante o processo de filtração, as ostras são expostas a uma variedade de microrganismos do ambiente, incluindo patógenos tanto para o próprio animal, como para os humanos.

Joseph, Colwell e Kaper (1982), citam que o *V. parahaemolyticus* faz parte da microbiota das ostras e de outros organismos provenientes do estuário. As ostras estão dentre os vários alimentos marinhos, que podem servir de veículo de doenças ao homem. Ainda segundo os autores, essa bactéria é introduzida no estuário como resultado de poluição, não sendo removida durante o processo de depuração.

Segundo Sarkar et al. (1985), *V. parahaemolyticus* está associado com sedimentos, partículas suspensas, plâncton, peixes e moluscos. Para Chen e Chang (1996), essa bactéria é considerada de potencial patogenicidade.

Segundo Gooch et al. (2002), a densidade da bactéria em ostras na colheita é menor que as densidades no mesmo animal quando comercializadas.

Possivelmente, durante a comercialização, fatores tais como temperatura e higiene concorrem para aumentar a microbiota inicial.

Foi confirmada a presença de *V. cholerae* em seis, das colheitas realizadas. De um total de 57 cepas sacarose positivas isoladas, 22 (38,60%) foram confirmadas como sendo *V. cholerae* (Tabela 2).

Foi observado que o maior número de cepas identificadas como *V. cholerae* foram isoladas das últimas colheitas, quando se iniciava o período chuvoso na região, com diminuição da salinidade (Tabelas 3 e 4). *V. cholerae* apresenta seu ótimo de salinidade na faixa de 0 a 6% (ICMSF, 1978).

A importância do isolamento do *V. cholerae* em ostras está relacionada ao fato desse microrganismo já ter sido responsável por sete grandes pandemias, estando a última, endêmica até os dias atuais.

Segundo Albert, Nieira e Motarjemi. (1997), tradicionalmente a água é reconhecida como o principal veículo de transmissão da cólera, entretanto cada vez mais surtos dessa doença têm sido associados ao consumo de alimentos contaminados. Entre os alimentos marinhos mais freqüentemente associados com a cólera, os moluscos bivalves e os crustáceos são destaques.

Eyles e Davey (1988) citam que a presença de *V. cholerae* nas ostras de estuários é influenciada pela urbanização que contribui para uma maior contaminação ambiental.

Segundo CDC (1998), a monitoração das condições ambientais tais como, temperatura da água e salinidade, ajuda na escolha da melhor época da colheita ou retirada do molusco.

DePaola et al. (1992) e Oyofó et al. (2002) relatam que *V. cholerae* tem sido isolado freqüentemente em países temperados no período do verão.

Das 22 cepas identificadas como *V. cholerae*, 20 foram identificadas como não O1 (Tabela 4). Não foi possível tipar as demais cepas por se apresentarem na forma rugosa.

Radu et al. (2002), citam que o *V. cholerae* O1 é o agente responsável pela cólera, uma doença epidêmica, enquanto que as cepas consideradas não O1, apesar de não provocarem a doença, são também de grande valor epidêmico.

Segundo Blake et al. (1983) e Sakazaki e Shimada (1986), em vários países tem sido relatado o isolamento de cepas O1 e não O1 associadas a infecções onde os veículos de contaminação foram os alimentos marinhos.

Hernio-Health et al. (2002) chamam a atenção para o risco sanitário existente quanto ao consumo de moluscos cultivados em ambientes aquáticos contaminados por *vibrios*.

6 – CONCLUSÃO

–O elevado índice de *Vibrio cholerae* nas ostras analisadas é um dado preocupante, uma vez que estes animais são oriundos do maior mangue da cidade de Fortaleza e comercializados em vários pontos da cidade. Considerando o hábito de se consumir esses organismos crus ou sem tratamento térmico adequado, estes representam um risco potencial de doenças entéricas

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, M.J.; NIEIRA, M.; MOTARJEMI, Y. The role of food in the epidemiology of cholera. **World Health**, v.50, n.1/2, p.111-118, 1997.

ALCAMO, I.E. Chemical control of microorganisms. In: **Fundamentals of microbiology**. 4th ed. California: Benjamin/Cummings Publishing, 1994. p.665-687.

ALEKSIC, S.; BOCKEMÜHL, J. *Yersinia* and other Enterobacteriaceae. In: MURRAY, P.R., et al. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: ASM, 1999. p.483-496.

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

BANERJEE, R. et al. Involvement of in vivo induced che y-4 gene of *Vibrio cholerae* in motility, early adherence to intestinal epithelial cells and regulation of virulence factors. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.532, p.221-226, 2002.

BLAKE, P.A. et al. Vibrios on the half shell: what the walrus and the carpenter didn't know. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.99, p.558-559, 1983.

BRASIL. Ministério da Saúde. Subcomissão Nacional de Diagnóstico Laboratorial. Manual de diagnóstico laboratorial : cólera. Brasília, 1992. 25p.

BREA, L.M. et al. Gastroenterítis bacterianas, víricas, parasitárias y toxiinfecciones alimentarias. In: Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Espanola de Enfermendades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1994. Disponível em:

<<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap7.htm>> Acesso em 1 feb. 2003.

CENTERS FOR INFECTIOUS DISEASES (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters - Pacific Northwest, 1997. **MMWR**, v.47, n.2, p.457-462, June. 1998.

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.

CERUTTI, R.L.; BARBOSA, T.C.P. Flora bacteriana heterotrófica em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e águas da baía Norte, ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, p.330-334, 1991.

CHEN, H.C.; CHANG, T.C. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters by immunofluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.29, p.311-319, 1996.

COLWELL, R.R.; HUQ, A. *Vibrios* in the environmental: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In: BLAKE, P.A., WACHSMUTH, I.K. (Ed.) ***Vibrio cholerae* and cholera - molecular to global perspectives**. 1994. p.127-133,

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

DANIELS, N.A. et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.181, n.5, p.1661-1666, May.2000b.

DePAOLA, A.; MCHEROY, S.; MODLANES, G. Distribution of *Vibro vulnificus* phage in oyster tissues and other estuarine habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.6, p.2464-2467, June. 1997.

DePAOLA, A. et al. Isolation of Latin American epidemic strain of *Vibrio cholerae* O1 from US Gulf coast. **Lancet**, London, v.339, n.8793, p.624-624, Mar. 1992.

DePAOLA, A. et al. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997-1998). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.4649-4654, 2000.

DESENCLOS, J.C.A. et al. The risk of *Vibrio* illness in the Florida raw oyster eating population, 1981-1988. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.134, n.3, p.290-297, Aug. 1991.

DSMZ. Bacterial nomenclature up-to-date. 2002. Disponível em: <[http:// www.gbf.de/dsmz/bactnom/bactname.htm](http://www.gbf.de/dsmz/bactnom/bactname.htm)> Acesso em: 12 Feb. 2003.

EYLES, M.J.; DAVEY, G.R. *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of two urban estuaries in Australia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, p.207-218, 1988.

FEACHEM, R.G. et al. **Sanitation and disease**: health aspects of excreta in waste water management. John Wiley and Sons, 1983. 501p.

FELSENFELD, O. A review of recent trends in cholera research and control - with an annex on isolation and identification of cholera vibrios. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.34, n.2, p.161-195, 1966.

FERREIRA, M.G.A.B.; COSTA, N.C.M. Vida-de-prateleira de ostras de mangue (*Crassostrea rhizophorae*) submetidas a dois processos de embalagem e armazenadas sob refrigeração. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.78-79, p.95-99, 2000.

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

GÓES, J.A.W.; PASSOS, C.M.S.; MONTAL, M.C.C. Cólera versus alimentos: estudo do nível de conhecimento da população do bairro de Alagados, Salvador-BA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.41, p.23-28, 1996.

GOOCH, J.A. et al. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, n.6, p.970-974, Jun., 2002.

HERVIO-HEATH, D. et al. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, n.6, p.1123-1135, 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microrganisms in foods: their significance and methods of enumerations**. 2 ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978.

INFORMATIVO INSPETOR DE PESCADO. **Boletim de informações de origem geral**. n.49, dez. 2000. Disponível em:
< http://www.infopesca.org/inspector/nump_49.htm>, Acesso em: 1 fev. 2003.

JOSEPH, S.W.; COLWELL, R.R.; KAPER, J.B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.10, n.1, p.77-124, 1982.

JOHNSON, J.A. et al. *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal is closely relate to *Vibrio cholerae* El Tor but has important diferences. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, p.2108-2110, 1994.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de Alimentos. In: ROITMAN, I., TRAVASSOS, L.R., AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Tratado de Microbiologia**, São Paulo: Manole, 1988. v.1, p. 3-81.

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

LIRA, A.A. et al. Aspectos sanitários do ambiente aquático onde são capturados moluscos bivalves para consumo no grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.77, p.53-57, out. 2000.

MAGALHÃES, M. et al. Caracterização Bacteriológica e Sorológica de Linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* Isoladas de Humanos e de Ostras no Recife, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, p.83-88, 1991.

MATTÉ, G.R. et al. Distribution of potentially pathogenic *Vibrios* 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.

MORAES, I.R. et al. Estudo da radiosensibilidade ao ^{60}Co do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.1, p.29-32, 2000.

O'HARA, C.M.; BRENNER, F.W.; MILLER, J.M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.534-546, Oct., 2000.

OLIVER, J.D.; KAPER, J.B. *Vibrio* Species. In: DOYLE, M.P., BEAUCHAT, I.R. MONTVILLE, T.J. (Ed.). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. cap.13, p.228-264.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPS). **Boletim epidemiológico**, v.12, n.1, 1991. 24p.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPS). **Riscos de transmissão de cólera por alimentos**, 1993. 24p.

OYOFO, B.A. et al. Enteropathogens associated with acute diarrhea in community and hospital patients in Jakarta, Indonesia. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.34, p.139-146, 2002.

PAIVA, C.P.; BORGES, R.G.; PANETTA, J.C. Frequência de quadros gastroentéricos em aeronautas: pressuposta ligação com toxinfecções alimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.75, p.13-23, ago. 2000.

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.

RADU, S. et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 outbreak strains in Miri, Sarawak (Malaysia). **Acta Tropica**, Amsterdam, v.83, p.169-176, 2002.

SAKAZAKI, R.; SHIMADA, T. *Vibrio* species as causative agents of food-borne infection. In: ROBINSON, R.K. (Ed.) **Developments in Food Microbiology-2**, London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p.123-151

SANCHEZ, S.P. et al. Caracterização da qualidade microbilógica de águas marinhas e moluscos bivalves do litoral norte do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 16., 1991. **Anais...** 1991.

SARKAR, B.L. et al. Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh-water environs and in association with fresh-water fishes in Calcutta. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, n.1, p.132-136, 1985.

SNYDMAN, D.R.; GORBACH, S.L. Bacterial food poisoning. In: Evans, A.S., BRACHMAN, P.S. (Ed.). **Bacterial Infections of Humans**. 2nd ed. New York: Plenum Medical Book, 1991.

SOUSA, O.V. **Efeitos do cloro sobre cultivos de *Vibrio cholerae***. 1999. 76p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999

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

TWEDT, R.M. *Vibrio parahaemolyticus*. In: DOYLE M. (Ed.). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcial Dekker, 1989. 324p.

VOLETY, A.K. et al. A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.172, p.205-222., 1999.

WONG, H.C.; TING, S.H.; SHIEH, W.R. Incidence of toxigenic *Vibrios* in foods available in Taiwan. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, p.197-202, 1992.

YAM, W.C. et al. Abundance of clinical enteric bacterial pathogens in coastal waters and shellfish. **Water Research**, New York, v.39, n.1, p.51-56, 1999.

YOH, M. ; MIWATANI, T.; HONDA, T. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin (Vp-TRH) produced by environmental and clinical isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.71, p.157-161, 1992.

Anexo 1 – Mapa da localização do mangue de Sabiaguaba, Ceará

