

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR-LABOMAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE OSTRAS,
Crassostrea rhizophorae, COMERCIALIZADA EM
FORTALEZA – CEARÁ

LEYLA MARIA DE OLIVEIRA BARROS

N.Cham. D 576.163 B279a

Autor: Barros, Leyla Maria

Título: Avaliação bacteriológica de ostr



13829784

Ac. 65791

BLCM

FORTALEZA - CE

Março/2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE OSTRAS,
Crassostrea rhizophorae, **COMERCIALIZADA EM**
FORTALEZA – CEARÁ

LEYLA MARIA DE OLIVEIRA BARROS

FORTALEZA - CE

Março / 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DE OSTRAS,
Crassostrea rhizophorae, COMERCIALIZADA EM
FORTALEZA – CEARÁ**

LEYLA MARIA DE OLIVEIRA BARROS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós - Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, outorgado pela Universidade Federal do Ceará

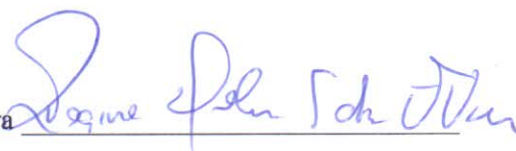
Orientadora: Profa. Dra. REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES
VIEIRA

FORTALEZA - CE

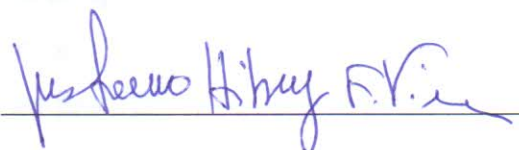
Março / 2004

Após a finalização dos trabalhos da defesa de Dissertação de Mestrado de **LEYLA MARIA DE OLIVEIRA BARROS**, intitulada "**Avaliação bacteriológica de ostra, crassostrea rhizophorae comercializada em Fortaleza/CE**", a Banca Examinadora considerando o conteúdo do trabalho e a apresentação realizada considera a **DISSERTAÇÃO APROVADA**.

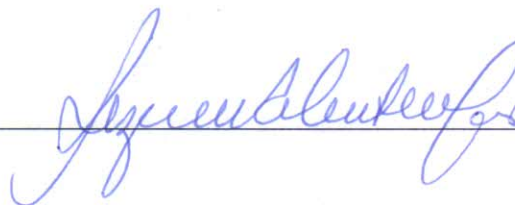
Profa Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira
(orientadora)



Prof. Dr. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira
(membro efetivo)



Profa. Dra. Rozane Valente Marins
(membro efetivo)



A OSTRAS

Sou ostra e escondo jóias nas minhas
entranhas.

Vivo no Oriente e Ocidente.

Não tenho morada certa,
mas meu corpo é valioso.

Por mais que me vulgarizem
em bancas de venda imundas,
sei que sou alimento e nutritivo.

Sou proteína para o pobre e
sou prazer para o rico.

Mas o homem há de aprender
a me tratar.

porque posso ser jóia e lixo.

Posso trazer riquezas e doenças,
o homem é quem escolhe.

Ele é o senhor e rei das minhas moradas.

Portanto, se querem prazer, aprendam
como me conservar.

porque posso ser zangada,

posso ser espada,

posso ser guilhotina,

posso ser faca afiada.

Preferiria ser a dama dos prazeres,
dos sonhos, das ilusões.

O homem há de fazer a
sua escolha.

Regine Limaverde

Ao meu amado Eudo Jr. (*meu bem*), tão especial pra mim e tão presente na minha vida, sobretudo nas horas difíceis, dando-me força, compreensão e carinho, e que sem medir esforços dedicou grande parte do seu precioso tempo na digitação desse trabalho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem atribuo toda minha força e sabedoria.

À minha mãe Maria Júlia, por ser tão especial na minha vida.

Ao meu saudoso pai Otilio (*In memorian*), por tudo que ele soube fazer.

Às minhas irmãs Zenilda (Didi) e Daniele, verdadeiras amigas e companheiras de todas as horas.

À Oscarina e a Susy, companheiras fiéis de longas datas, pela disponibilidade, carinho e amizade.

À amiga Elenice, pela valiosa ajuda prestada durante o experimento.

Às demais colegas e amigas: Isabel, Gleire, Waleska, Cristiane, Daniele, Hilda, Janise, Luana, Karla, Norma, Gardenny e Anahy, pelo carinho, ajuda e descontração.

Aos professores do Curso de Mestrado do LABOMAR, por suas disponibilidades.

Ao Ariel, pela confecção do abstract.

Aos colegas de turma: Rosa Alice, Edite, Lúcia, Saulo, Júnior, Antônio Carlos, Pedro Alexandre e Enox.

Ao LABOMAR, pelo uso de suas instalações.

À FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio à pesquisa, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todas as pessoas, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha tão estimada orientadora Regine Vieira, a quem devo tudo o que aprendi sobre Microbiologia e grande parte do meu desenvolvimento científico. Pela acolhida calorosa, atenção e amizade e, sobretudo por ter acreditado em mim, proporcionando-me mais uma vez o prazer de trabalhar ao seu lado, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

LISTAS DE TABELAS	
LISTAS DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 INCIDÊNCIA DE DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR	16
1.2 COLIFORMES FECAIS	18
1.2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	19
1.2.2 CARACTERIZAÇÃO	19
1.2.3 PATOGENICIDADE	19
1.2.4 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica	20
1.2.5 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica	20
1.2.6 <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	21
1.2.7 <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	21
1.2.8 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	22
1.3 <i>VIBRIO</i>	22
1.3.1 CARACTERIZAÇÃO	22
1.3.2 PATOGENICIDADE	23
1.3.3 CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES PATÓGENAS DE <i>VÍBRIO</i>	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	27
2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	27
2.2.1 DILUIÇÕES PARA CONTAGEM DE COLIFORMES FECAIS	27
2.2.2 DILUIÇÕES PARA CONTAGEM DE <i>VÍBRIO</i>	28
2.3 NMP DE COLIFORMES FECAIS	28
2.3.1 Teste Presuntivo	28
2.3.2 Teste Confirmatório	28

2.3.3	Teste Completo	29
2.3.4	Caracterização Morfológica e Provas Bioquímicas	29
2.3.5	TESTE DE TOXIDEZ E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	30
2.4	NMP DE <i>VÍBRIO</i>	31
2.4.1	ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS DE <i>VÍBRIO</i> SACAROSE NEGATIVAS	31
2.4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS DE <i>VÍBRIO</i> SACAROSE NEGATIVAS	31
3	RESULTADOS	37
4	DISCUSSÃO	44
5	CONCLUSÕES	50
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Número Mais Provável (NMP)/g de coliformes fecais e de *Vibrio* obtidos de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas nas Barracas A e B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará 39
- Tabela 2 Distribuição de cepas de *E. coli* isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca A da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará, quanto à sensibilidade a diferentes antimicrobianos 40
- Tabela 3 Distribuição de cepas de *E. coli* isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará, quanto à sensibilidade a diferentes antimicrobianos 41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema para a quantificação de coliformes fecais ou termotolerantes e identificação de *E. coli* isolados de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas nas Barracas A e B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará 35
- Figura 2 Esquema para a quantificação de *Vibrio* e identificação vibrios sacarose negativos isolados de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas nas Barracas A e B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará 36
- Figura 3 Percentual de cepas de coliformes fecais isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca A da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará 42
- Figura 4 Percentual de cepas de coliformes fecais isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará 42
- Figura 5 Percentual de cepas de *Vibrio* sacarose negativas isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca A da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará 43
- Figura 6 Percentual de cepas de *Vibrio* sacarose negativas isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará 43

RESUMO

Nesta pesquisa foi estimado o Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais (termotolerantes) e de *Vibrio* de 60 amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, comercializadas em duas barracas (A e B) da Praia do Futuro, Fortaleza - CE, no período de janeiro 2002 a fevereiro de 2003. Cada coleta constava de 24 ostras, totalizando um número de 720 animais analisados. O NMP de coliformes fecais variou de 4 a 930/g e de 4 a 430/g nas ostras coletadas das Barracas A e B, respectivamente. Foram confirmadas das amostras da Barraca A, 70 (86,%) cepas de *Escherichia coli*; 7 (9%) de *Enterobacter* e 4 (5%) de *Citrobacter*, e da Barraca B foram confirmadas 45 (64%) de *E. coli*; 18 (26%) de *Enterobacter*; 3 (4%) de *Citrobacter* e 4 (6%) de *Klebsiella*. Os antimicrobianos que exibiram maior eficiência para as cepas de *E. coli*, isoladas das ostras das duas barracas, foram: cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), imipenem (IMP), ácido nalidixico (NA), cefradina (CN) e sulfametoxazol-trimetoprim (SXT). Foi observada em 100% das cepas de *E. coli*, isoladas das amostras da Barraca A, sensibilidade ao cloranfenicol (CLO) e à tetraciclina (TE). Quatro (13%) cepas de *E. coli* isoladas das amostras de ostras da Barraca A foram resistentes a cefalotina (KF), enquanto que apenas uma (3%), isolada das amostras da Barraca B, foi resistente a esse antibiótico. Seis cepas de *E. coli* isoladas das amostras de ostras, 3 (10%) de cada uma das Barracas A e da B, apresentaram resistência a nitrofurantoína (NIT). Nenhuma das cepas isoladas das amostras de ambas as barracas, A e B, pertencia aos grupos das Enteroinvasivas (EIEC), das Enteropatógenicas (EPEC) ou ao sorogrupo O157. Os NMPs de *Vibrio* isolados das ostras coletadas da Barraca A variaram de 93 a 9.300/g e de 150 a 4.300/g para as amostras da Barraca B. As espécies confirmadas de *Vibrio* das amostras coletadas da barraca A foram: 18 (50%) cepas de *V. parahaemolyticus*; 9 (25%) de *V. mimicus*; 6 (17%) de *V. harveyi* e 3 (8%) de *V. vulnificus*, enquanto que da B, foram confirmadas 13 (52%) cepas de *V. parahaemolyticus*; 5 (24%) de *V. mimicus* e 3 (14%) de *V. vulnificus*.

Palavras-chave: ostra, coliformes fecais, vibrios sacarose negativos

ABSTRACT

The Most Probable Numbers (MPN) of fecal coliforms (thermotolerant) and *Vibrio* was estimated in 60 oyster (*Crassostrea rhizophorae*) samples, sold at two beach restaurants (A and B) at Praia do Futuro, Fortaleza-CE, between January 2002 and February 2003. 24 oysters were sampled each time, totaling 720 tested individuals. The MPNs for fecal coliforms ranged between $4.g^{-1}$ and $930.g^{-1}$, and between $4.g^{-1}$ and $430.g^{-1}$ in the oysters sampled at the A and B restaurants, respectively. At the A restaurant, the following strains were identified: 70 (86%) strains of *Escherichia coli*, 7 (9%) of *Enterobacter*, and 4 (5%) of *Citrobacter*. At the B restaurant, 45 (64%) strains of *E. coli*, 18 (26%) of *Enterobacter*, 3 (4%) of *Citrobacter*, and 4 (6%) of *Klebsiella* were confirmed. The antimicrobials that showed the best efficiency against the *E. coli* strains isolated from the oysters sampled at both sites were cefoxitin (FOX), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacin (CIP), imipenem (IMP), nalidixic acid (NA), cefradine (CN) and sulfamethoxazole-trimetoprim (SXT). 100% of the *E. coli* strains isolated from A were sensitive to chloramphenicol (CLO) and tetracycline (TE). Four (13%) of the *E. coli* strains, isolated from the oyster samples collected at A, showed resistance to cephalothin (KF), while only one (3%), isolated from the samples collected at B, was resistant to the same antibiotic. Six strains, 3 (10%) of them isolated from the samples collected at A and 3 from those collected at B, showed resistance to nitrofurantoin (NIT). None of the isolated strains belonged to the entero-invasive (EIEC) or entero-pathogenic (EPEC) groups, nor to the 0157 serotype. The MPNs for *Vibrio* isolated from the oysters sampled at A ranged between $93.g^{-1}$ and $9300.g^{-1}$, and for those sampled at B, between $150.g^{-1}$ and $4300.g^{-1}$. The confirmed *Vibrio* species isolated from the A samples were: 18 (50%) strains of *V. parahaemolyticus*, 9 (25%) of *V. mimicus*, 6 (17%) of *V. harveyi*, and 3 (8%) of *V. vulnificus*, while those isolated from the B samples were 13 (62%) strains of *V. parahaemolyticus*, 5 (24%) of *V. mimicus*, and 3 (14%) of *V. vulnificus*.

Key words: oyster, fecal coliforms, saccharose-negative vibrios

1 INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro é nacionalmente conhecido por sua riqueza gastronômica. Peixes e frutos do mar compõem a maioria dos pratos típicos da região (Silva *et al.*, 2002). Além das diversas espécies, provenientes do ambiente marinho, são bastante apreciadas aquelas capturadas do ambiente estuarino, tais como os moluscos bivalves.

As ostras são bem documentadas por seu valor nutritivo, com baixos teores lipídicos e calóricos (85 calorias/100g de carne crua) (Pedrosa & Cozzolino, 2001).

Entretanto, o consumo de ostra tem registros na literatura especializada como responsável por incontáveis surtos epidêmicos, respondendo diretamente por problemas de saúde pública, principalmente quando esses moluscos são ingeridos crus ou mal cozidos e a qualidade sanitária do ambiente aquático onde eles são capturados estiver comprometida (José, 1996).

Segundo Henriques *et al.* (2000), dentre os animais marinhos que vivem em ambientes contaminados por microrganismos tendo como exemplo o grupo coliforme (de origem fecal) e outros patógenos tais como, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp., os moluscos bivalves são os que oferecem maiores riscos à saúde pública, por serem filtradores e bioacumuladores.

A poluição dos mares, baías e estuários, provocada pela emissão de lixo, esgotos industriais e residenciais contendo metais pesados, coliformes fecais e outras bactérias patogênicas, são um dos principais fatores que favorece a contaminação dos moluscos (Rippey, 1994).

Lewis *et al.* (1996) estudaram a contaminação de moluscos por vírus e bactérias humanas, provenientes de cargas de esgotos, na Nova Zelândia. Por outro lado, Ni & Huang (1985) analisaram em Hong Kong, a contaminação de coliformes de origem fecal na água e correlacionou esse dado com a contaminação do mexilhão *Perna viridis*, habitante desse meio.

Muitos países que comercializam ostras desenvolveram um conjunto de normas próprias, baseadas em análises microbiológicas da água de seu cultivo e/ou da sua carne. A maioria desses padrões normativos está baseada na pesquisa de coliformes fecais, pois esse grupo é indicador de contaminação fecal (Machado *et al.*, 2001).

Nesses países, a obrigatoriedade de se proceder à purificação ou depuração dos bivalves depende da classificação das áreas de origem (NSSP, 1997). Quando provenientes de áreas aprovadas podem ser enviadas diretamente para a comercialização, quando oriundas de áreas restritas devem ser submetidas à purificação natural ou controlada antes da comercialização, sendo vedada à extração de bivalves em áreas proibidas ou não classificadas. Apesar desses procedimentos terem sido adotados internacionalmente, eles ainda não são observados no Brasil (Jacobi, 2000).

José (1996) estudando a relação entre os bivalves e a segurança do consumidor no Estado de São Paulo, constatou que não existem mecanismos legais ou políticos que permitam o conhecimento de sua área de origem, com exceção daqueles oriundos de cultivo.

Entretanto, a produção de moluscos bivalves no Brasil através do cultivo, ainda é incipiente, quando comparada a da extração (FIPERJ & IP-SP, 1989; Pereira *et al.*, 1991).

Em todo o mundo, investigações epidemiológicas evidenciam surtos e casos isolados de patologias de origem infecciosa e tóxica ocasionadas pela ingestão de bivalves (Kaysner *et al.*, 1989; Blake, 1993).

O perigo de se consumir ostra contaminada é alto porque esse molusco é tradicionalmente ingerido *in natura*, sem nenhum cozimento prévio, constituindo-se em motivo de preocupação para as autoridades sanitárias envolvidas na fiscalização e controle da qualidade desse alimento. Cólera, salmoneloses, infecções por *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, estão entre as diversas doenças citadas na literatura especializada (Cook *et al.*, 2001) que podem ser causadas pela ingestão de ostra contaminada. Assim, o hábito de se comer ostra crua constitui numa satisfação gastronômica que pode ser responsável por incontáveis surtos de toxinfecções bacterianas.

Dentre os microrganismos patogênicos mais importantes que ocorrem no pescado destacam-se os do gênero *Vibrio*. Dentro desse gênero, o *Vibrio parahaemolyticus* é de suma importância à saúde pública devido ao seu potencial enteropatógeno, sendo causador de gastroenterite aguda no homem, caracterizada por quadro disentérico principalmente após o consumo de pescado *in natura* (Lima, 1997).

A enumeração de coliformes fecais ou termotolerantes está entre as análises microbiológicas recomendadas pela literatura para pescado fresco, incluindo a ostra. Entre o grupo dos coliformes fecais, a população de *Escherichia coli* é cerca de 70% do total detectado (Hagler & Hagler, 1988).

Surtos de gastroenterites foram relacionados à presença de *E. coli*, com isso sua identificação em alimentos é de grande valor. Além disto, faz parte do grupo de microrganismos de importância na redução do OTMA (óxido de trimetilamina) a TMA (trimetilamina), composto de odor forte indicador de pescados em deterioração (Guzman, 1994; Vieira, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2001) estabelece, através da resolução nº 12, Artigo 7 alínea b, um limite de 5×10 coliformes a 45°C/g para moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, industrializados, resfriados ou congelados, e como neste trabalho foram analisados moluscos comercializados resfriados, parte das análises se voltaram para a enumeração de coliformes fecais. Além desses organismos foi pesquisado também o gênero *Vibrio*, embora a mesma resolução não recomende limites para este gênero. O estudo de alguns vibrios está fundamentado na observação científica, de que algumas espécies desse gênero podem causar problemas de saúde aos consumidores de ostras, que teimam em consumi-las sem nenhum cozimento (Daniels *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2001).

A Praia do Futuro é uma das áreas da cidade de Fortaleza onde se consome maior quantidade de ostras, comercializadas sem controle sanitário nas barracas. É então de suma importância, investigar a qualidade bacteriológica desse molusco servido à população.

A presente pesquisa objetiva: estimar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais e de *Vibrio* de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas em duas barracas da Praia do Futuro; isolar e identificar colônias típicas de *Escherichia coli*, determinando sua toxidez; quantificar, isolar e identificar colônias de *Vibrio* sacarose negativas, com ênfase em *V. parahaemolyticus*.

1.1 INCIDÊNCIA DE DOENÇAS BACTERIANAS DE ORIGEM ALIMENTAR

A manutenção da integridade e salubridade do homem depende da ingestão diária de alimentos quantitativa e qualitativamente adequados, saudáveis e que não coloquem em risco sua saúde (Valejo *et al.*, 2003).

Os alimentos podem servir como veículos de agentes patogênicos ao homem, ou como substrato para microrganismos que poderão elaborar substâncias nocivas, trazendo prejuízos quando ingeridos. Portanto, quando se fala em doenças que podem ser transmitidas por alimentos, observa-se a importância dos microrganismos neles presentes. Quando o assunto são as toxinfecções alimentares, o enfoque se situa em nível de contaminação bacteriana, uma vez que essa é a maior razão desse tipo de enfermidade (Gonçalves, 1998).

Segundo Andrade & Macedo (1996), dentre os agentes etiológicos responsáveis por cerca de 200 diferentes tipos de doenças transmitidas ao homem, através dos alimentos, as bactérias são os microrganismos de maior importância.

Bryan (1980) classifica as doenças de origem alimentar como síndromes causadas pela ingestão de alimentos onde estariam presentes agentes tóxicos ou infecciosos, ou seja, seriam as intoxicações ou infecções, respectivamente. As intoxicações seriam causadas pela ingestão de quaisquer substâncias tóxicas, incluindo aquelas encontradas no tecido animal ou vegetal e as toxinas elaboradas por microrganismos. Enquanto que, as infecções de origem alimentar são causadas pela ingestão de microrganismos patogênicos tais como as bactérias, que penetram na mucosa intestinal, multiplicam-se, podendo migrar para outros tecidos.

A grande maioria das infecções bacterianas de origem alimentar é caracterizada por sintomatologia restrita ao trato intestinal, sendo assim definidas como diarreias bacterianas (Valejo *et al.*, 2003).

Ainda é incipiente a falta de conscientização da população frente às doenças veiculadas por alimentos (DTAs), razão porque se estima que apenas de um a 10% do número de surtos dessas doenças sejam notificadas (Germano *et al.*, 1993).

Estima-se que nos países em desenvolvimento ocorram anualmente mais de um bilhão de casos de diarreias agudas em crianças menores de cinco anos, com cinco milhões de óbitos. E a contaminação bacteriana dos alimentos é uma das causas representativas desses casos (Germano & Germano, 2000).

Week *et al.* (1992) relataram a importância da investigação de surtos de doenças de origem alimentar, pois os gastos com esse problema são bastantes elevados e poderiam ser diminuídos.

Nos Estados Unidos, a estimativa é de que 24 a 81 milhões de pessoas tornem-se doentes a cada ano, a partir do consumo de alimentos contaminados. Essas doenças resultam numa estimativa de 10.000 mortes por ano, com um custo estimado entre 7,7 a 23 bilhões de dólares (FDA, 1997), afetando a cada ano, um em cada 10 habitantes (Paiva *et al.*, 2000).

Nos países onde se mantêm registros apropriados das DTAs, 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 diferenças sociais. Na Índia, produtos como peixes, moluscos e crustáceos marinhos são implicados como veículos de muitos casos de surtos de doenças alimentares (Mohamed Hatha & Lakshmanaperumalsamy, 1997).

A poluição dos ecossistemas aquáticos, rios, lagos e o mar, devido ao lançamento de esgotos domésticos e industriais, se constitui na maior causa de contaminação do pescado citada por diversos autores (Rippey, 1994; Constantinido, 1994). Segundo Germano *et al.* (1993), devido às constantes agressões aos ambientes aquáticos, juntamente com as práticas inadequadas de manuseio, o pescado pode veicular vários microrganismos patogênicos aos seus consumidores.

Lira *et al.* (2000) avaliando a qualidade sanitária de um ambiente aquático situado às margens do canal de Santa Cruz (PE), onde eram capturados moluscos bivalves, revelaram a presença de *E. coli* em 96% das amostras de água analisadas, além de outras enterobactérias. Estes achados mostram a importância da qualidade sanitária do ambiente aquático onde são capturados os moluscos bivalves.

Os alimentos marinhos são susceptíveis a todos os microrganismos causadores de toxinfecção alimentar, além dos exclusivos de ambientes marinhos, como *Vibrio* spp. De 1.586 surtos de doenças de origem alimentar, relatados no mundo inteiro entre 1977 e 1984, o pescado foi responsável por 59% do total dos alimentos marinhos, sendo que os bivalves foram responsáveis por 1/3 dos casos (Beirão *et al.*, 2002).

De acordo com Cook *et al.* (2001), a maior epidemia associada com o consumo de molusco ocorreu em 1988 na China. Foram reportados mais de 300.000 casos de hepatite A. Essa epidemia foi causada pelo consumo de moluscos crus capturados de um porto que recebia descargas de esgotos domésticos, sem tratamento.

Os exames bacteriológicos adotados para o pescado *in natura* e os cozidos, industrializados, resfriados ou congelados, compreendem a contagem de coliformes fecais a 45°C (este somente para os cozidos, industrializados, resfriados ou congelados), estafilococos coagulase positivas e pesquisa de *Salmonella* em 25g de amostra (Brasil, 2001).

1.2 COLIFORMES FECAIS

Coliformes fecais fermentam a lactose com produção de gás, quando em temperaturas entre 44,5 a 45,5°C por até 48h (Hitchins *et al.*, 1998). O termo coliformes termotolerantes é algumas vezes usado para esses organismos, e talvez seja a descrição mais exata quando comparada ao termo coliforme fecal. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. (incluindo *agglomerans*, *aerogenes* e *cloacae*) e *Citrobacter freundii* podem ser encontradas em alimentos, através do teste de colimetria, e o isolamento delas irá depender do tipo de alimento e da temperatura de incubação dos caldos (Splittstoesser *et al.*, 1980).

Segundo Hagler & Hagler (1988), todas essas bactérias são típicas da microbiota fecal, mas também podem ser isoladas de outros locais, com exceção da *E. coli*, cuja origem é estritamente fecal.

Apesar das controvérsias com relação aos microrganismos mais representativos da qualidade sanitária de um produto alimentício, os coliformes em geral, a *E. coli* e os enterococos têm merecido maior consideração. Esses microrganismos podem indicar condições sanitárias que conduzem a deteriorações e perda da qualidade dos alimentos, com conseqüente perigo à saúde humana (Andrade *et al.*, 2002).

1.2.1 *ESCHERICHIA COLI*

1.2.2 CARACTERIZAÇÃO

E. coli pertencem à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar a glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose, com produção de ácido e gás, embora algumas sejam anaeróbias (Franco & Landgraf, 1996).

A temperatura ótima de crescimento para essa bactéria está na faixa de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. São oxidases negativas, podendo usar o acetato como única fonte de carbono, o mesmo não acontecendo com o citrato, que não é utilizado pela bactéria.

O habitat natural da *E. coli* é o trato intestinal dos animais de sangue quente, incluindo o homem (Brenner, 1984). Conseqüentemente, a presença desse organismo na água e nos alimentos é considerada como indicação de contaminação fecal (Bopp *et al.*, 1999).

1.2.3 PATOGENICIDADE

E. coli é parte comum da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e normalmente não causa doenças ao ser humano. Contudo, certas cepas podem causar infecções intestinais e extra-intestinais em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. Infecções urinárias, bacteremia, diarreia e meningites são as síndromes mais comuns, causadas por algumas cepas patogênicas de *E. coli* (Bopp *et al.*, 1999).

Os danos causados pela infecção do trato gastrointestinal devido a *E. coli*, segundo Mims (1993), se verifica como consequência da ação farmacológica das suas toxinas na reação inflamatória local, como resposta à invasão bacteriana e a disseminação pelas vias linfáticas e sanguíneas, atingindo regiões anatômicas distante do processo inicial.

Esses organismos também possuem antígenos (O, H e K) que segundo Mahon & Manuselis Jr. (1995) estão associados com as diversas doenças e infecções intestinais e do trato urinário, assim como infecções das meninges em recém-nascidos.

Segundo Campos & Trabulsi (1999), são conhecidos 174 antígenos O, 100 K e 57 H.

As cepas patogênicas de *E. coli* apresentam diferentes mecanismos de atuação, diferindo quanto as suas manifestações epidemiológicas. Como causadora de vários tipos de doenças diarreicas, essa bactéria foi dividida em seis grupos baseados em fatores de virulência, manifestações clínicas produzidas, epidemiologia e sorotipagem. Os grupos são: *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* Difusamente Agregada (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998).

Entre esses grupos, somente os quatro primeiros têm sido implicados com doenças transmitidas por alimentos e águas (Feng & Weagant, 2002).

1.2.4 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

As infecções causadas por ETEC ocorrem comumente em países em desenvolvimento, mas nos EUA esse grupo tem sido implicado em surtos esporádicos de doenças transmitidas por água, queijos e vegetais crus. Esse grupo também tem sido reconhecido como agente causador de “diarréia dos viajantes” (Nataro & Kaper, 1998).

Ainda de acordo com esses mesmos autores, cepas de *E. coli* enterotoxigênica produzem enterotoxinas termolábeis (LT), que é muito similar à toxina colérica (CT), e toxinas termoestáveis (ST), que são resistentes à fervura por 30 minutos.

As infecções causadas por esse grupo são caracterizadas por diarréias aquosas e dores abdominais, podendo ocorrer náuseas e dores de cabeça, mas usualmente com poucos vômitos e febre (Mahon & Manuselis Jr., 1995; Bopp *et al.*, 1999).

1.2.5 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

As cepas de *E. coli* pertencentes a esse grupo estão entre os principais agentes enteropatogênicos, principalmente nos países da América Latina e África (Jakabi & Franco, 1991).

Segundo Hicks *et al.* (1998), as EPEC causam diarréia aquosa pronunciada e são a principal causa de diarréia infantil em países em desenvolvimento.

Seu papel patogênico continua não definido, uma vez que apenas alguns sorotipos têm sido associados com infecções diarréicas (Mahon & Manuselis Jr., 1995),

Surtos de infecções por *E. coli* enteropatogênica têm sido associados ao consumo de água e produtos cárneos contaminados (Doyle & Cliver, 1990).

Petri *et al.* (1989) analisaram amostras de quibe cru comercializadas em Londrina (PR) e isolaram 16 cepas dessa bactéria, pertencentes a seis sorogrupos diferentes: O26, O142, O55, O119, O125 e O127.

1.2.6 *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Cepas de EIEC são capazes de invadir a mucosa intestinal, provocando uma síndrome clínica bastante semelhante àquela causada por *Shigella*, caracterizada por febre, dores abdominais, diarréia aquosa e indisposição (Mahon & Manuselis Jr., 1995).

Segundo Doyle & Cliver (1990), acredita-se que muitas infecções reportadas causadas por *Shigella* tenham sido provocadas por EIEC, em decorrência da grande semelhança entre as duas bactérias.

As EIEC podem ser difundidas pela água, alimentos e pelo contato pessoa a pessoa. Nos EUA, aproximadamente 380 pessoas ficaram doentes em 1971, após o consumo de queijo contaminado por *E. coli* enteroinvasiva (Doyle & Cliver, 1990).

Casos de transmissão via rota fecal-oral com subsequente ocorrência de surtos foram relatados pela literatura (Mahon & Manuselis Jr., 1995).

1.2.7 Escherichia coli Enterohemorrágica (EHEC)

Esse grupo é reconhecido principalmente por causar colites hemorrágicas ou diarreias sanguinolentas, podendo progredir para a Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH), potencialmente fatal (Griffin & Tauxe, 1991).

Entre os diversos sorotipos desse grupo, o sorotipo O157: H7 é o mais frequentemente implicado em doenças de origem alimentar no mundo inteiro (Meng *et al.*, 2001).

E. coli O157: H7 é comumente identificada como *E. coli* diarreiaigênica isolada na América do Norte e Europa, suspeito de causar pelo menos 80% dos casos de SUH, sendo conhecido como causa comum de diarreias sanguinolentas em países desenvolvidos (Bopp *et al.*, 1999).

Em Washington 1993, várias crianças adoeceram e duas morreram após a ingestão de hambúrguer contaminado por esse sorotipo (Kushner, 1993; Mermelstein, 1993).

De acordo com Bopp *et al.* (1999) carnes vermelhas, leite cru, vegetais crus, saladas, maioneses, suco de maçã não pasteurizado e água de abastecimento não clorada, são alguns dos meios de transmissão de *E. coli* O157: H7.

1.2.8 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Genes de resistências a agentes antibacterianos podem ocorrer em populações bacterianas e serem espalhados de um ecossistema para outro. Genes resistentes a determinados antibióticos primeiramente descritos em bactérias específicas de seres humanos foram encontrados em espécies de microrganismos específicos de animais, e vice-versa, sugerindo que populações bacterianas podem compartilhar e trocar esses genes (ASM, 1999).

Segundo Cooke (1985), coliformes resistentes a antibióticos constituem em importância não só por suas potencialidades de patogenias, mas por transmitirem resistências a outras bactérias patogênicas, podendo ser motivo de preocupação em saúde pública.

1.3 VIBRIO

1.3.1 CARACTERIZAÇÃO

O gênero *Vibrio* é constituído por bacilos Gram-negativos curvos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, geralmente halodependentes, ou seja, requer para seu crescimento a presença obrigatória em maior ou menor concentração de cloreto de sódio. São móveis, e a maioria apresenta um flagelo polar em meio líquido. Possuem oxidase e catalase, e fermentam a glicose sem produção de gás. São bactérias caracteristicamente indígenas de ambientes marinhos, costeiros e estuarinos, aparecendo em grandes concentrações (*blooms*), quando as temperaturas das águas aumentam (17-20°C). Em regiões temperadas, os víbrios estão presentes na água do mar durante todo o ano, porém sua concentração é exacerbada nos meses quentes, aumentando sua acumulação nos moluscos filtradores e em outros animais marinhos (West, 1989).

1.3.2 PATOGENICIDADE

Nos últimos 30 anos, muitas espécies de *Vibrio* têm sido relacionadas a doenças tais como gastroenterites em pessoas saudáveis e septicemia em pacientes debilitados, sobretudo portadores crônicos de doenças hepáticas.

A transmissão de infecções por *Vibrio* ocorre primariamente pela ingestão de mariscos crus (Cook *et al.*, 2001), e as ostras em particular, têm um importante papel na transmissão desses agentes etiológicos, uma vez que são concentradores biológicos e tradicionalmente são consumidas *in natura* (Morris & Blake, 1985).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em Atlanta (USA), estima que 8.028 infecções por *Vibrio* com 57 mortes ocorrem anualmente nos Estados Unidos (Mead *et al.*, 1999). A maioria destas infecções envolve *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

De acordo com Hlady & Klontz (1996), um total de 690 infecções por *Vibrio* em 675 pessoas foram reportadas na Flórida entre 1981 e 1983. As espécies envolvidas foram: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. damsela* e *V. fluvialis*. A maior proporção (51%) dos pacientes apresentaram gastroenterites, seguida por infecções em feridas (24%) e septicemia primária (17%).

Segundo Levine & Griffin (1993), a mais comum apresentação clínica das infecções por *Vibrio* é gastroenterite auto-limitante, mas infecções por lesões na pele e septicemia primária, também, podem ocorrer.

1.3.3 CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES PATÓGENAS DE *VIBRIO*

São conhecidas 12 espécies de *Vibrio* patógenas para o homem, a maioria das quais tem sido implicadas em doenças veiculadas por alimentos (Elliot *et al.*, 2001). Entre essas, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são as de maiores significância clínica, citadas na literatura especializada.

a) *Vibrio cholerae*

V. cholerae O1 e O139 são agentes causadores da cólera, com potencial epidêmico e pandêmico. Estirpes não-O1 e não-O139 podem igualmente ser patogênicas, mas sem potencial epidêmico, dando origem a sintomas gastrintestinais de menor gravidade (Pereira, 2002).

Surtos de cólera associados ao consumo de alimentos marinhos incluem ostras, caranguejos e camarões (Oliver & Kaper, 1997).

Durante a expansão da sétima pandemia de cólera, que teve como agente causador o *V. Cholerae* O1, biotipo El-Tor, sorotipos Inaba e Ogawa, o consumo de ostras e pescados crus foi considerado de alto risco na transmissão dessa doença (Moraes *et al.*, 2000).

Segundo Wolfe (1992), na última pandemia de cólera, que teve início na América do Sul, no começo dos anos 90, a bactéria causou mais de 400.000 casos e 4000 mortes.

b) *Vibrio parahaemolyticus*

A espécie encontra-se amplamente distribuída no ambiente marinho e estuarino, e foi identificada pela primeira vez no Japão em 1951, através de um surto de gastroenterite, associado ao consumo de pescado não submetido à cocção. Desde então, tem sido reconhecido no mundo inteiro como um patógeno capaz de causar manifestações gastrointestinais após o consumo de pescado e mariscos crus ou mal cozidos (Matté *et al.*, 1994; Lima, 1997).

Estirpes patogênicas do *V. parahaemolyticus* são conhecidas por produzir hemolisina termo-estável, capaz de causar hemólise de eritrócitos humanos, conhecida como reação de Kanagawa (Huss, 1994).

De acordo com o CDC (1998), durante as três últimas décadas, essa bactéria foi implicada como uma causa comum de surtos de gastroenterites nos Estados Unidos.

c) *Vibrio vulnificus*

É um patógeno de origem marinha com grande potencial invasor, podendo ser letal. Tem sido relacionado com feridas infeccionadas e responsáveis por incontáveis casos de gastroenterites e septicemias primárias. Sua frequência em organismos marinhos é considerada alta, principalmente em moluscos (Nascimento *et al.*, 2001).

Nos EUA, a bactéria tem sido reconhecida por diversos autores como responsável por altos índices de fatalidades, associados ao consumo de alimentos marinhos (Daniels & Stafán, 2000).

Segundo Pereira (2002), não existe informação adequada que permita distinguir entre estirpes virulentas e não virulentas de *V. vulnificus*. Dessa forma, todas as estirpes desse *Vibrio* são consideradas patogênicas.

d) *Vibrio alginolyticus*

A espécie foi originalmente classificada como um biotipo do *V. parahaemolyticus*, por serem geneticamente similares. Entretanto, podem ser facilmente diferenciadas, uma vez que o *V. alginolyticus* apresenta habilidade de fermentar a sacarose e de crescimento em meios contendo até 10% de cloreto de sódio (Oliver & Kaper, 1997).

V. alginolyticus é conhecida como uma das espécies halofílicas de *Vibrio* mais comumente isolada de peixes, caranguejos, camarões e ostras (Oliver & Kaper, 1997).

Como patógeno para humanos, as infecções de feridas adquiridas pela exposição dos ferimentos no ambiente marinho constituem em 71% das infecções causadas por esse *Vibrio* (Hlady & Klontz, 1996).

e) *Vibrio mimicus*

Até 1981, esse organismo era considerado uma variante bioquímica do *V. cholerae* não-O1, entretanto estudos mais detalhados revelaram espécies distintas. As duas espécies podem ser facilmente diferenciadas, pela habilidade do *V. mimicus* em fermentar a sacarose.

A bactéria tem sido isolada de pacientes com gastroenterite, pelo consumo de alimentos marinhos, e ocasionalmente tem sido detectado em infecções de ouvido (Oliver & Kaper, 1997).

Em 1989, em um levantamento sobre as infecções causadas por *Vibrio* na Costa do Golfo, *V. mimicus* foi isolado de quatro casos de gastroenterite, comparado com 26 por *V. parahaemolyticus* e 18 por *V. cholerae* não-O1 (Levine & Griffin, 1993).

f) Outras espécies

V. holisae, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela* e *V. carchariae* são, assim como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus*, espécies halofílicas, associadas com doenças em humanos (Elliot *et al.*, 2001).

V. holisae é mais comumente isolado de pacientes com gastroenterite, mas septicemias e infecções em ferimentos têm sido relatadas. As infecções causadas por esse *Vibrio* estão fortemente relacionadas com o consumo de alimentos marinhos (Hlady & Klontz, 1996).

V. fluvialis foi isolado de mais de 500 pessoas com diarreia entre 1976 e 1977 em Bangladesh, sendo considerado o maior registro de infecções causadas por essa bactéria (Huaq *et al.*, 1980).

V. metschnikovii foi isolado do sangue de um paciente diabético com inflamação na vesícula, sendo reportado como o primeiro caso de infecção humana causada por essa bactéria (Jean-Jacques *et al.*, 1981).

Há relatos de que a bactéria foi isolada de cinco crianças com diarreia, durante um programa de vigilância da cólera no Peru (Dalsgaard *et al.*, 1997).

V. cincinnatiensis, *V. damsela* e *V. carchariae* não têm sido associados com gastroenterites, e raramente têm sido relatados como patógenos para o homem (Elliot *et al.*, 2001).

V. cincinnatiensis foi isolado do fluido cérebro espinhal e do sangue de um paciente com septicemia e meningite. Aparentemente a vítima não apresentava nenhuma doença no fígado, além de não ter tido contato com a água do mar e nem ter consumido alimentos marinhos (Bode *et al.*, 1986).

V. damsela e *V. carchariae* são reconhecidos por causarem infecções em feridas traumáticas, atribuídas concomitantemente à injúria do tecido e a exposição do ferimento a águas marinhas e salobra (West, 1989; Oliver & Kaper, 1997).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas semanalmente, 60 amostras de ostra, *Crassostrea rhizophorae*, de duas barracas (A e B) da Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará, no período de janeiro de 2002 a fevereiro de 2003. Cada amostra constava de 12 ostras, totalizando um número final de 720 animais analisados.

As ostras foram coletadas previamente resfriadas, sendo transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizadas as análises bacteriológicas.

2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Imediatamente à chegada ao laboratório, as ostras, depois de passarem pelo processo de limpeza, com lavagem em água corrente, foram abertas assepticamente e delas retirado todo o material interno, compreendendo o músculo inserido no interior das conchas e a água intervalvar. Em seguida foram maceradas em gral estéril, para a preparação das diluições descritas a seguir.

2.2.1 DILUIÇÕES PARA CONTAGEM DE COLIFORMES FECAIS

Após a maceração, de cada amostra foram pesados assepticamente 50g, os quais foram homogeneizados separadamente, em 450ml de solução salina 0,85% durante dois minutos em liquidificador, obtendo-se assim, a diluição 10^{-1} . A partir dessa, foram preparadas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}), usando-se o mesmo diluente.

2.2.2 DILUIÇÕES PARA CONTAGEM DE *VIBRIO*

Na preparação das diluições para a quantificação de *Vibrio* e isolamento de vibrios sacrose negativos, foi utilizado o mesmo procedimento do item anterior, entretanto a solução salina usada como diluente foi de 3% de cloreto de sódio.

2.3 NMP DE COLIFORMES FECAIS

Para a determinação do NMP de coliformes fecais ou termotolerantes, foi empregada a técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo Feng *et al.* (2002). Esse teste foi dividido em três etapas: teste presuntivo, confirmatório e completo (Figura 1).

2.3.1 Teste Presuntivo

Foram transferidas porções de 1ml de cada diluição (10^{-1} a 10^{-6}) previamente preparadas, em três tubos contendo Caldo Lauryl Sulfato (CLS)-Difco, com tubos de Durham invertidos. Em seguida, os tubos foram incubados a 35°C/48 horas. Após esse período, os tubos que apresentaram turvação e produção de gás, com formação de bolhas, foram considerados positivos e submetidos aos demais testes.

2.3.2 Teste Confirmatório

Dos tubos que apresentaram resultados positivos no teste presuntivo foram retiradas alíquotas, com o auxílio de uma alça níquel-cromo, e transferidas para tubos contendo caldo EC-Difco, com tubos de Durham invertidos. Esses tubos foram incubados a 45°C em banho-maria por 24 horas. A positividade do teste foi verificada pela turvação do meio e produção de gás com formação de bolha.

O cálculo do NMP foi feito através da consulta à tabela do NMP (Garthright, 2001).

2.3.3 Teste Completo

Os tubos que apresentaram resultados positivos no teste confirmatório foram semeados por estriamento, com uma alça de níquel-cromo, sobre a superfície do meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB)-Difco em placas, e incubados a 35°C/24 horas. Após o período de incubação, com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, foram isoladas de cada placa de duas a três colônias típicas de *E. coli*, ou seja, com 2 a 3mm de diâmetro, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado, em tubos contendo ágar TSA-Difco inclinado. Em seguida, os tubos foram incubados a 35°C/24 horas. Esses cultivos foram utilizados na caracterização morfológica e nas provas bioquímicas das cepas para a identificação de *E. coli*.

2.3.4 Caracterização Morfológica e Provas Bioquímicas

As características morfológicas das cepas isoladas em meio TSA foram observadas em esfregaços em lâminas, corados pelo método de Gram. As cepas que se revelaram bastonetes Gram-negativos foram submetidas ao teste do IMVIC (Indol, Vermelho de Metila, Voges- Proskauer e Citrato), de acordo com Feng *et al.* (2002), que será descrito a seguir.

✓ Teste de Produção do Indol

As cepas crescidas no meio TSA foram semeadas, por picada profunda, utilizando-se uma agulha de níquel-cromo, no meio Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM)-Difco, incubado a 35°C/48 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 0,2ml do reativo de Kovacs (*p*-dimetilaminobenzaldeído). A produção de Indol, oriunda da degradação do aminoácido triptofano presente no meio, é observada pela formação de um anel vermelho sobre a superfície do meio (teste positivo). As cepas de *E. coli* apresentam positividade para este teste.

✓ Teste Vermelho de Metila (VM)

Para este teste foi retirada uma alíquota, através de uma alça de níquel-cromo, das culturas crescidas no meio TSA, e transferida para tubos contendo caldo MR-VP-Vetec e incubados a 35°C/96 horas.

Após esse tempo, foram adicionadas cinco gotas do reagente vermelho de metila. O aparecimento de uma coloração vermelha (teste positivo) é devido à produção de grande quantidade de ácidos pela bactéria, resultante da fermentação da glicose contida no meio. *E. coli* apresenta positividade para esse teste.

✓ Teste de Voges-Proskauer (VP)

De cada cepa crescida no meio TSA, foi retirada uma alíquota com uma alça de níquel-cromo e transferida para tubos contendo caldo MR-VP-Vetec, seguindo-se a incubação a 35°C/48 horas. Após a incubação, foram adicionados para cada ml do meio, 0,1ml do reagente Barrit I (α -naftol) e 0,2ml do reagente Barrit II (KOH a 40%). O surgimento de uma coloração rósea a vermelho rubro (teste positivo), indica a formação de um produto final neutro, diacetilmetilcarbinol, durante a fermentação da glicose. Esse teste é negativo para *E. coli*.

✓ Teste de Utilização do Citrato de Simmons

Com a utilização de uma alça de níquel-cromo, foi retirada de cada cepa crescida em meio TSA, uma alíquota e estriada sobre o meio ágar Citrato de Simmons-Difco inclinado em tubos, e incubados a 35°C/96 horas. A mudança da coloração do meio de verde para azul intenso (teste positivo), principalmente no ápice, é devido à elevação do pH por bactérias que utilizam o citrato como única fonte de carbono. Esse teste é negativo para *E. coli*.

2.3.5 TESTE DE TOXIDEZ E SENSIBILIDADE DAS CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* A ANTIMICROBIANOS

As cepas identificadas como *E. coli*, pelo teste do IMVIC, foram enviadas à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), para serem analisadas frente as suas toxidez e sensibilidade as drogas antimicrobianas. Os antimicrobianos empregados para o teste de sensibilidade foram: ampicilina (AMP), cloranfenicol (CLO), tetraciclina (TE), cefalotina (CF), cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), imipenem (IMP), ácido sulbânico (NA), cefradina (CN), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) e nitrofurantoína (NT), seguindo as recomendações da NCCLS (2001).

2.4 NMP DE *VIBRIO*

Para a estimativa do NMP de *Vibrio*, e isolamento de colônias sacarose negativas também foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos segundo Elliot *et al.* (2001) (Figura 2). Das diluições 10^{-1} a 10^{-6} previamente preparadas, foram inoculadas porções de 1ml em tubos contendo Água Peptona Alcalina (APA) a 3% de cloreto de sódio, em triplicata, que foram em seguida incubados a 37°C/16-18 horas.

Após o período de incubação foi verificada a positividade dos tubos (turvação) para a confirmação da presença de *Vibrio*. Os tubos positivos foram semeados em estrias na superfície do meio ágar Tiosulfato-Citrato Sais Biliares (TCBS)-Difco em placas, que posteriormente foram incubadas a 37°C/18 horas.

O cálculo do NMP foi feito através da consulta à tabela do NMP (Garthright, 2001).

2.4.1 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS DE *VIBRIO* SACAROSE NEGATIVAS

A partir do crescimento no meio ágar TCBS, foram isoladas de cada placa, com uma agulha de níquel-cromo, de duas a três colônias sacarose negativas, de 1 a 3mm de diâmetro, circulares, com centro verde-azulado, suspeitas de *V. parahaemolyticus*. Cada colônia foi semeada em tubos contendo TSA inclinado, adicionado de 3% de cloreto de sódio, e incubados a 35°C/24 horas (Elliot *et al.*, 2001) (Figura 2).

2.4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS DE *VIBRIO* SACAROSE NEGATIVAS

As cepas isoladas no meio TSA + 3% de NaCl foram testadas quanto as suas características morfológicas, em esfregaços corados pelo método de Gram. Aquelas que se apresentaram como bacilos Gram-negativos, polimorfos, encurvados ou não, foram submetidas a uma série de testes bioquímicos de acordo com Elliot *et al.* (2001), que serão descritos a seguir.

✓ **Teste de Produção da Citocromo-oxidase**

Com palitos de madeira estéreis, foram colhidas algumas colônias crescidas no meio TSA + 3% de NaCl e esfregadas em discos de papel de filtro, embebidos em solução aquosa de cloridrato de tetrametil-p-fenilenediamino 1%. O surgimento de uma coloração azul-escuro (teste positivo), dentro de um intervalo máximo de dois minutos, indica a habilidade da bactéria em produzir o azul de indofenol, pela oxidação do tetrametil-p-fenilenediamino. A família Vibrionaceae é positiva para esse teste.

✓ **Teste de Motilidade**

As culturas crescidas no meio TSA + 3% de NaCl foram inoculadas, por picada profunda, através de uma agulha de níquel-cromo, em tubos com meio SIM-Difco + 3% de NaCl. O crescimento difuso ao longo da linha de inoculação com turvação do meio indica prova positiva. Os víbrios são móveis, conseqüentemente positivos para esse teste.

✓ **Teste do Tríplice Açúcar Ferro (TSI)**

Com uma agulha de níquel-cromo, as cepas crescidas no meio TSA + 3% de NaCl foram semeadas, por picada profunda e estriamento na superfície, no meio ágar TSI-Difco + 3% de NaCl inclinado em tubos. Em seguida os tubos foram incubados a 37°C/24 horas. Os víbrios são produtores de ácidos a partir da glicose, tornando a base do meio amarelo e sem produção de gás ou H₂S.

✓ **Teste de fermentação de carboidratos (sacarose, lactose, arabinose e manitol)**

As culturas crescidas em TSA + 3% de NaCl foram inoculadas, com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, em tubos contendo caldo Púrpura de Bromocresol-Difco (0,04%, pH 7,2-7,5, acrescidos de 0,5% de sacarose, lactose, arabinose e manitol, separadamente. Em seguida, os meios foram cobertos com uma camada de 1 a 2cm de óleo mineral estéril, e incubados a 37°C por quatro a cinco dias. A reação positiva é observada pela mudança da cor do meio de púrpura para amarelo, fermentação ácida.

✓ Teste de Descarboxilação de Aminoácidos (Arginina, Lisina e Ornitina)

A partir das culturas em meio TSA + 3% de NaCl, cada cepa foi inoculada, com uma alça de níquel-cromo, em três tubos contendo o meio caldo Púrpura de Bromocresol-Difco 0,002% pH 7,2-7,5, acrescidos também de 3% de cloreto de sódio. Esses tubos foram, em seguida, adicionados de 0,5% de arginina, lisina e ornitina, separadamente. Paralelamente, cada cepa foi inoculada em um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem nenhum aminoácido (meio controle). Após a inoculação foi adicionada em cada tubo uma camada de 1 a 2cm de óleo mineral estéril, seguindo-se da incubação a 37°C por até quatro dias.

Durante todo esse período os tubos foram examinados todos os dias. A coloração amarela do meio resulta da produção de ácido, proveniente da fermentação da glicose presente no meio basal (reação negativa).

Na reação positiva ocorre a descarboxilação dos aminoácidos, que é evidenciado pela viragem do pH do meio, passando de ácido (amarelo) para alcalino (púrpuro). Os tubos controle permanecem ácidos, com coloração amarela.

✓ Teste do halofilismo

A partir do crescimento em TSA + 3% de NaCl, as cepas foram inoculadas com uma alça de níquel-cromo, em quatro tubos de caldo Triptona-Difco a 1%, contendo 0, 3, 6, 8 e 10% de cloreto de sódio, respectivamente e incubados a 37°C/24 horas. A turvação do meio indica crescimento e conseqüentemente, teste positivo.

✓ Teste de Voges Proskauer

As culturas crescidas em TSA + 3% de NaCl foram inoculadas, com uma alça de níquel-cromo, em tubos contendo caldo MR-VP-Difco, contendo 3% de cloreto de sódio e incubados a 37°C/48 horas.

Após a incubação, foram adicionados para cada ml do meio, 0,6ml do reagente Barrit I (α-naftol), e 0,2ml do reagente Barrit II (KOH a 40%) seguindo-se as agitações dos tubos. O desenvolvimento de uma coloração rósea a vermelho rubro (teste positivo) indica a formação de um produto final neutro, diacetilmetilcarbinol, durante a fermentação da glicose.

23829784

13829784 ✓

✓ Teste do crescimento a 42°C

As cepas crescidas em TSA + 3% de NaCl foram inoculadas, através de uma alça de níquel-cromo, em tubos contendo caldo Triptona-Soja (TSB)-Difco contendo 3% de cloreto de sódio, e incubados a 42°C em banho-maria por 24 horas. A turvação do meio indica crescimento e conseqüentemente, teste positivo.

✓ Teste da hidrólise do Orto-Nitrofenil- β -D-Galacto-Piranosídeo (ONPG)

Para a realização desse teste, foram retiradas com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, aliquotas a partir do crescimento em TSI + 3% de NaCl, e transferidas para tubos esteréis contendo 0,25ml de solução salina 3% estéril. Em cada tubo foi adicionada uma gota do reagente tolueno, seguindo-se a agitação dos tubos para a liberação da enzima β -galactosidase. Em seguida os tubos foram colocados em estufa a 37°C/5 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 0,25ml da solução ONPG, seguindo-se a incubação dos tubos a 37°C/24 horas. A positividade do teste é evidenciada pela mudança da cor do meio de incolor para amarelo, devido a hidrólise do ONPG, por bactérias produtoras da enzima β -galactosidase.

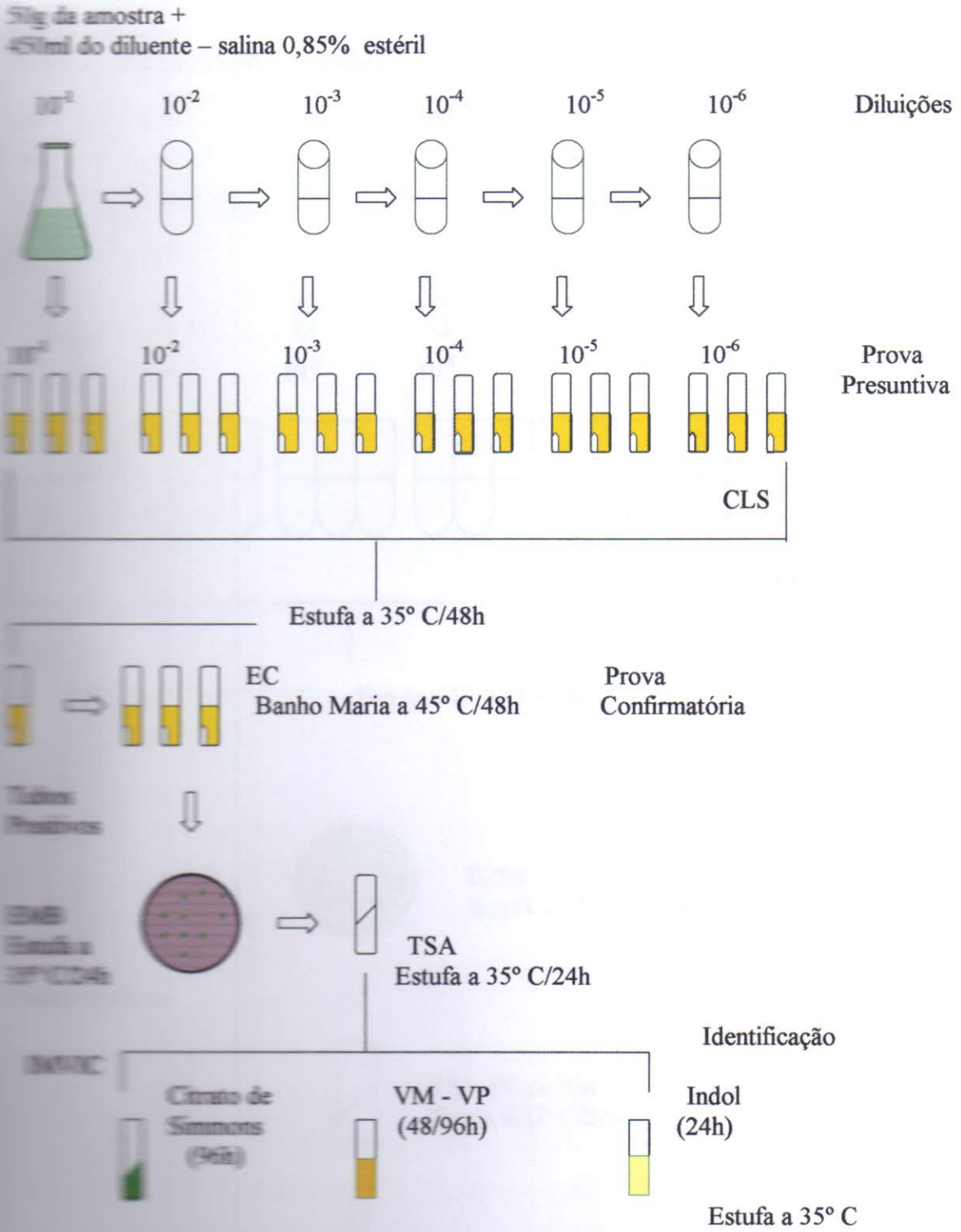


Figura 1. Esquema para a quantificação de coliformes fecais ou termotolerantes, e identificação de *E. coli* isolados de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas nas Barracas A e B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

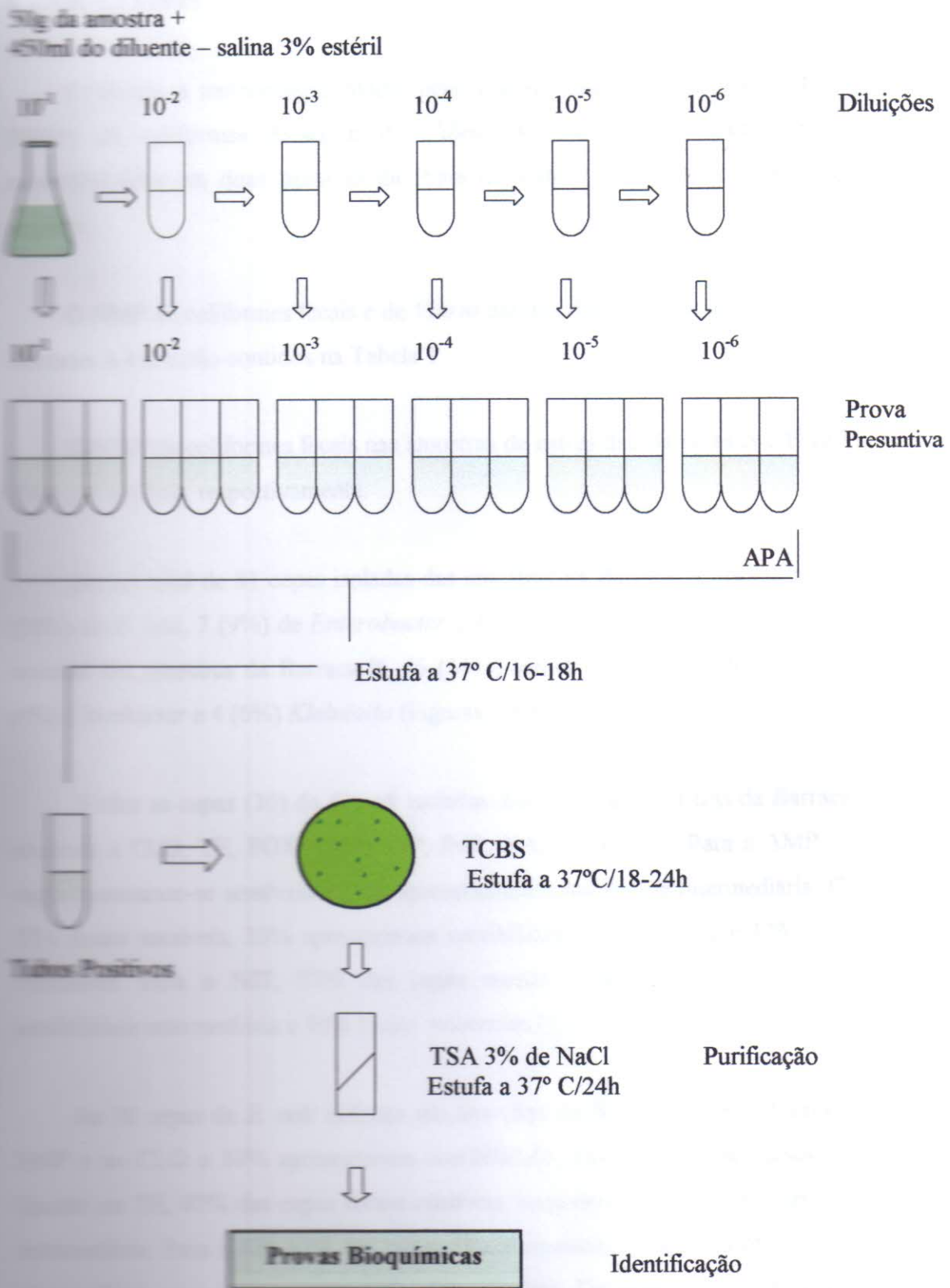


Figura 2. Esquema para quantificação de *Vibrio*, e identificação de vibrios sacarose negativos isolados de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas nas Barracas A e B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

3 RESULTADOS

Conforme a metodologia citada, pela qual foi estimado o Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais e de *Vibrio* de ostras, (*Crassostrea rhizophorae*), comercializadas em duas barracas da Praia do Futuro, obteve-se os resultados que se seguem:

O NMP de coliformes fecais e de *Vibrio* obtidos das amostras de ostras coletadas das Barracas A e B estão contidos na Tabela 1.

O NMP de coliformes fecais nas amostras de ostras das Barracas A e B variou de 4 a 150/g e 4 a 430/g, respectivamente.

De um total de 81 cepas isoladas das amostras da Barraca A, foram confirmadas 70 (86%) de *E. coli*, 7 (9%) de *Enterobacter* e 4 (5%) de *Citrobacter*, enquanto que, das 70 isoladas das amostras da Barraca B, 45 (64%) foram *E. coli*, 18 (26%) *Enterobacter*, 3 (4%) *Citrobacter* e 4 (6%) *Klebsiella* (Figuras 3 e 4).

Todas as cepas (30) de *E. coli* isoladas das amostras de ostras da Barraca A foram sensíveis a CLO, TE, FOX, CRO, CIP, IMP, NA, CN e SXT. Para a AMP, 86,7% das cepas mostraram-se sensíveis e 13% apresentaram sensibilidade intermediária. Com o KF, 53% foram sensíveis, 33% apresentaram sensibilidade intermediária e 13% mostraram-se resistentes. Para o NIT, 77% das cepas mostraram-se sensíveis, 13% apresentaram sensibilidade intermediária e 10% foram resistentes (Tabela 2).

As 30 cepas de *E. coli* isoladas das amostras da Barraca B, 90% foram sensíveis a AMP e ao CLO e 10% apresentaram sensibilidade intermediária para esses antibióticos. Quanto ao TE, 87% das cepas foram sensíveis, enquanto 13% apresentaram sensibilidade intermediária. Para o KF, 53% das cepas foram sensíveis, 43% apresentaram sensibilidade intermediária e apenas uma cepa (3%) foi resistente. Em relação aos demais antibióticos, os resultados foram semelhantes aos encontrados para as cepas isoladas das amostras da Barraca A (Tabela 3).

Nenhuma das 60 cepas de *E. coli* isoladas das amostras de ostras coletadas das duas barracas, se mostrou positiva para os grupos EIEC, EPEC e o sorogrupo O157.

Os valores de NMP de *Vibrio* nas amostras de ostras variaram de 93 a 9.300/g para as coletadas na Barraca A e 150 a 4.300/g para as da Barraca B (Tabela 1).

Foram isoladas 140 cepas de *Vibrio* sacarose negativas das amostras de ostras coletadas das duas barracas. Dessas cepas, 57 foram identificadas (36 da Barraca A e 21 da B) (Figuras 5 e 6).

As espécies de *Vibrio* confirmadas das 36 cepas isoladas das ostras provenientes da Barraca A, por ordem de frequência foram: 18 (50%) cepas de *V. parahaemolyticus*, 9 (25%) de *V. mimicus*, 6 (17%) de *V. harveyi* e 3 (8%) cepas de *V. vulnificus* (Figura 5), enquanto que da Barraca B, das 21 cepas caracterizadas, foram confirmadas 13 (62%) de *V. parahaemolyticus*, 5 (24%) de *V. mimicus* e 3 (14%) de *V. vulnificus* (Figura 6).

Amostra	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. vulnificus</i>
Barraca A	18	9	6	3
Barraca B	13	5	3	0
Total	31	14	9	3

Tabela 1. Número Mais Provável (NMP)/g de coliformes fecais e de *Vibrio* obtidos de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas das Barracas A e B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

Coletas	Coliformes Fecais		Vibrio	
	Barraca A	Barraca B	Barraca A	Barraca B
1ª	430	230	4.300	930
2ª	150	93	1.500	930
3ª	120	430	1.500	4.300
4ª	210	43	1.500	430
5ª	230	150	93	460
6ª	280	43	930	430
7ª	750	430	2.400	1.500
8ª	93	430	2.400	930
9ª	150	90	1.500	430
10ª	930	430	4.300	930
11ª	230	150	1.500	930
12ª	75	4	1.500	430
13ª	390	430	2.400	2.100
14ª	230	120	1.500	640
15ª	230	430	4.300	1.500
16ª	280	43	4.300	1.500
17ª	430	280	2.100	1.500
18ª	120	93	9.300	1.500
19ª	210	150	2.800	1.500
20ª	210	150	4.600	1.200
21ª	150	15	4.300	1.500
22ª	43	15	930	430
23ª	93	43	2.400	210
24ª	120	40	1.300	210
25ª	150	28	1.500	460
26ª	15	9	2.100	430
27ª	93	15	930	750
28ª	93	23	930	150
29ª	4	7	430	150
30ª	64	40	930	430

Tabela 2. Distribuição das cepas de *E.coli* isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca A da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará, quanto à sensibilidade a diferentes antimicrobianos.

Amostras	AMP	CLO	TE	KF	FOX	CRO	CIP	IMP	NA	CN	SXT	NIT
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
11	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I
15	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I
16	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R
21	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
27	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
28	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP = ampicilina; CLO = cloranfenicol; TE = tetraciclina; KF = cefalotina;
 FOX = cefoxitina; CRO = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacina; IMP = imipenem;
 NA = ácido nalidixico; CN = cefradina; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim;
 NIT = nitrofurantoina.

R = Resistente; I = Intermediário; S = Sensível.

Tabela 3. Distribuição das cepas de *E. coli* isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará, quanto à sensibilidade a diferentes antimicrobianos.

Amostras	AMP	CLO	TE	KF	FOX	CRO	CIP	IMP	NA	CN	SXT	NIT
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I
6	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I
7	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R
11	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	R
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
16	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R
18	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
25	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
26	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP = ampicilina; CLO = cloranfenicol; TE = tetraciclina; KF = cefalotina;
 FOX = cefotaxima; CRO = ceftioxona; CIP = ciprofloxacina; IMP = imipenem;
 NA = ácido nalidixico; CN = cefradina; SXT = sulfametoxazol-trimetoprim;
 NIT = nitrofurantoina.

R = Resistente; I = Intermediário; S = Sensível.

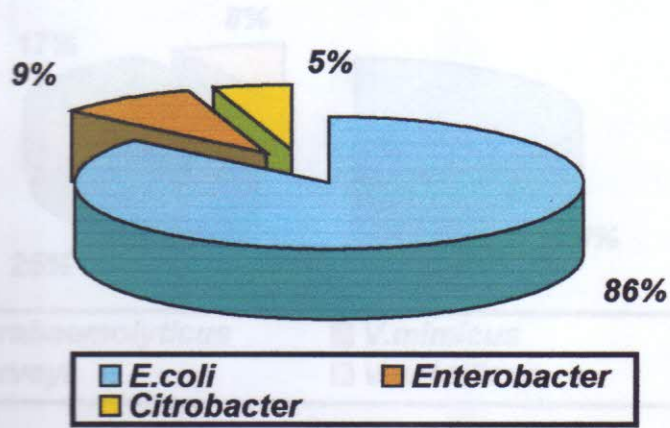


Figura 3. Percentual de cepas de coliformes fecais isoladas de ostras, *Crassostrea micophorae*, coletadas na Barraca A da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

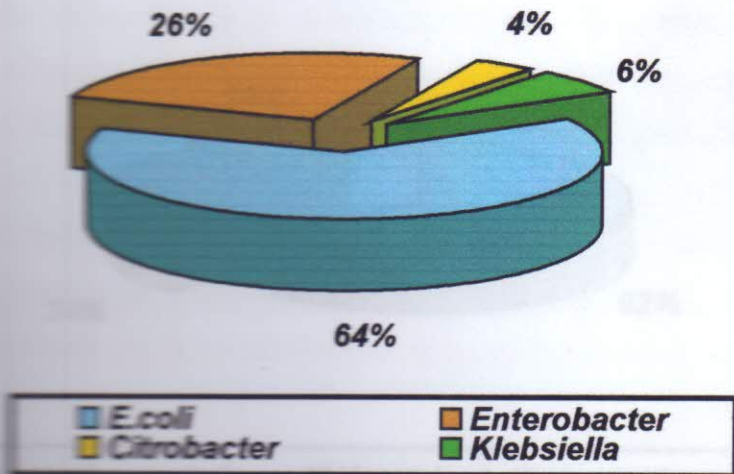


Figura 4. Percentual de cepas de coliformes fecais isoladas de ostras, *Crassostrea micophorae*, coletadas na Barraca B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

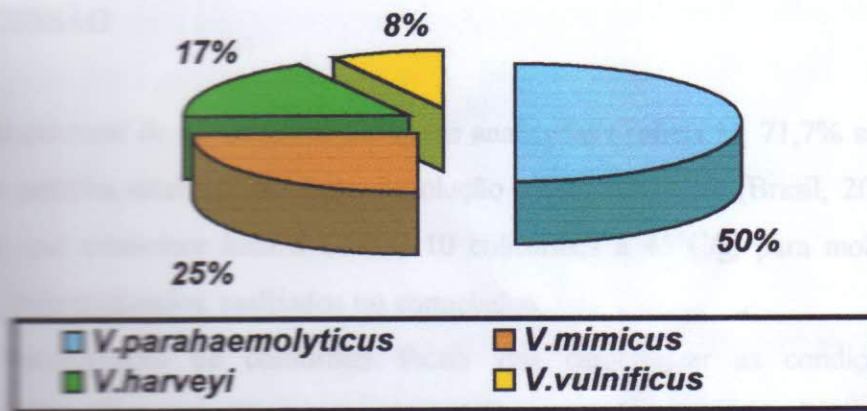


Figura 5. Percentual de cepas de *Vibrio* sacarose negativas isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca A da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

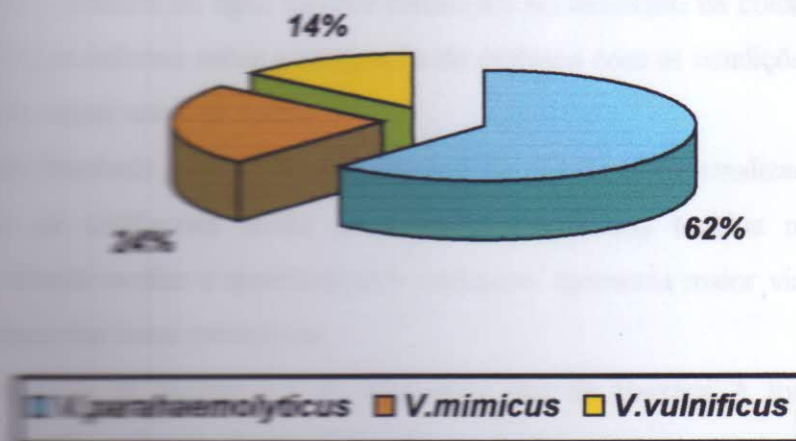


Figura 6. Percentual de cepas de *Vibrio* sacarose negativas isoladas de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas na Barraca B da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

4 DISCUSSÃO

De um total de 60 amostras de ostras analisadas (Tabela 1), 71,7% se apresentaram fora dos padrões estabelecidos pela Resolução 12 da ANVISA (Brasil, 2001), Artigo 7, item b, que estabelece limites de 5×10 coliformes a $45^\circ\text{C}/\text{g}$, para moluscos bivalves cozidos, industrializados, resfriados ou congelados.

A enumeração de coliformes fecais visa caracterizar as condições higiênico-sanitárias dos alimentos. Diversos autores (Germano *et al.*, 1993; Rippey, 1994), têm constatado que a presença desses microrganismos em pescado é originada principalmente pelo lançamento de esgotos próximos aos locais de captura, ou devido à manipulação inadequada, que pode ocorrer durante as etapas de transporte, beneficiamento e comercialização do produto.

A colimetria de águas provenientes das áreas onde são coletados bivalves destinados ao consumo humano constitui sempre em subsídio científico útil para as autoridades sanitárias envolvidas na fiscalização e controle da qualidade desse alimento (Wood, 1996).

Prasin, Cerratti & Barbosa (1991) estudaram amostras de águas e de ostras, e não observaram relação na quantidade de enterobactérias entre as amostras. Esses autores afirmam que a amostra de água fornece resultados no momento da coleta, enquanto que a amostra de ostra informa sobre a integração do molusco com as condições bacteriológica ambiental das águas antes da coleta.

Segundo Wachado *et al.* (2001), em termos de padrões de normalização do cultivo, a determinação de coliformes fecais ou termotolerantes nos tecidos moles e líquido viscosos, visando avaliar a qualidade dos moluscos, apresenta maior viabilidade do que a análise da água das áreas produtivas.

Analisando-se as figuras 3 e 4, observa-se que da Barraca A foram isoladas 70 (80%) colônias de *E. coli* e de B 45 (64%). Esses elevados percentuais revelaram a baixa qualidade das ostras. Uma vez que a bactéria não faz parte da microbiota do pescado, estes revelam um alto grau de poluição por coliformes fecais no ambiente aquático onde são capturados e comercializados.

Assim, práticas inadequadas de manuseio durante o transporte e a comercialização podem ser influenciado fortemente no aumento do comprometimento da qualidade das ostras.

De acordo com a literatura especializada, a ocorrência de *E. coli* está relacionada a doenças gastrointestinais tanto em pessoas imunocomprometidas, como em indivíduos saudáveis (Bopp *et al.*, 1999).

Deve-se levar em consideração ainda que, a presença dessa bactéria é indicadora das demais bactérias potencialmente patogênicas nos alimentos (Brasil, 2001), podendo trazer maiores prejuízos à saúde pública.

Além de *E. coli*, também foram encontradas nas ostras outras enterobactérias (*Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*), porém em menores percentuais (Figuras 3 e 4).

Nos testes realizados com antimicrobianos (Tabelas 2 e 3), pode-se observar que a maioria das cepas de *E. coli* isoladas das ostras mostraram-se sensíveis.

Quatro (13%) cepas de *E. coli* isoladas das amostras de ostras da Barraca A foram resistentes a cefalotina, enquanto que apenas 1 (3%), isolada das amostras da Barraca B, foi resistente a esse antibiótico. Seis cepas de *E. coli* isoladas das amostras de ostras, sendo 3 (31%) de cada uma das Barracas A e da B, apresentaram resistência a ampicilina.

Camafenicol e tetraciclina mostraram-se eficientes para todas as cepas isoladas das amostras de ostras da Barraca A. Para aquelas isoladas das amostras da Barraca B, 90% e 80% foram sensíveis ao primeiro e ao segundo antimicrobiano, respectivamente.

Em relação a ampicilina, 87% das cepas isoladas das amostras da Barraca A, e 90% não apresentaram sensibilidade.

Os antimicrobianos que exibiram maior eficiência sobre as cepas de *E. coli* isoladas das duas barracas foram: cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, imipenem, ácido nalidixico, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprim (Tabelas 2 e 3).

Wardell *et al.* (2003) testaram a sensibilidade a diferentes antibacterianos de cepas de *E. coli* isoladas de ostras, e também observaram que as maiores sensibilidades apresentadas pelas cepas foram detectadas para esses antimicrobianos.

Theophilo *et al.* (2002), isolaram 32 cepas de *E. coli* de pescados (camarão e pargo) comercializados numa feira em Mucuripe, Fortaleza (CE). Duas delas mostraram resistência a ampicilina, tetraciclina e a sulfametoxazol-trimetoprim, e duas a tetraciclina e ampicilina.

Bactérias resistentes a antimicrobianos constituem um importante dado para a saúde pública (Couto, 1985), tendo em vista que a circulação de microrganismos com genes determinantes de resistência a alguns antibióticos podem dificultar os tratamentos de doenças causadas por essas bactérias.

Apesar dos altos valores de *Vibrio* detectados nas amostras de ostras das duas Barracas de praia do Futuro (Tabela 1), não se pode fazer nenhuma comparação, uma vez que a legislação brasileira atual (Brasil, 2001), não estabelece limites para *Vibrio*, para amostras frescas *in natura*, cozidos, industrializados, resfriados ou congelados.

Examinando-se as Figuras 5 e 6, pode-se observar que as amostras de ostras provenientes das duas Barracas apresentaram maiores percentuais de *V. parahaemolyticus*. Das 36 cepas de *Vibrio* sacarose negativas identificadas nas amostras da Barraca A, 18 (50%) foram confirmadas como sendo essa espécie. Da Barraca B, de 21 cepas identificadas, 13 (62%) foram também para esta espécie de *Vibrio*.

A bibliografia cita inúmeros trabalhos sobre a presença de *V. parahaemolyticus* em ostras (Rodrigues & Hofer, 1986; Vieira & Iaria, 1993; Lima, 2003).

Pereira *et al.* (1998) estudando amostras de ostras coletadas em restaurantes da cidade do Rio de Janeiro, obtiveram uma frequência de isolamento desse microrganismo nas ostras de 32,9%. Valores maiores foram encontrados por Lira *et al.* (2001), que confirmaram essa bactéria em 62% das cepas suspeitas isoladas, provenientes de ostras comercializadas no Grande Recife (PE).

V. parahaemolyticus tem sido implicado em numerosos surtos de gastroenterites, associados com o consumo de alimentos marinhos crus ou mal cozidos, ou a contaminação após o processamento (Pereira, 2002).

A ingestão de ostras cruas constitui uma fonte primária de infecção por esse organismo. Entre 1988 e 1997, uma revisão das infecções causadas por *V. parahaemolyticus* nos EUA, mostrou que 88% dos pacientes com gastroenterites e 91% com septicemia primária apresentaram histórico alimentar referente à ingestão de ostra crua (Dennis *et al.*, 2000). Entre os anos de 1997 e 1998, foram reportados ainda nesse país, grandes surtos de infecção pela bactéria, associados ao consumo de ostras cruas (Nagler & DePaola Jr., 2001).

No Japão e Taiwan, onde os alimentos marinhos são comumente ingeridos crus, *V. parahaemolyticus* tem sido responsável por mais de 50% das infecções causadas pelo consumo desses alimentos (Chiou *et al.* 1991).

No Recife (PE), Magalhães *et al.* (1991) relacionaram casos de diarreias humanas ao consumo de mariscos e peixes contaminados pela bactéria.

Com relação às outras espécies de *Vibrio* sacarose negativa caracterizada, pode-se observar que, com exceção do *V. harveyi*, detectado somente em amostras de ostras da Barraca A, num percentual de 17% das cepas isoladas (Figura 5), as demais (*V. mimicus* e *V. vulnificus*) foram isoladas das amostras de ambas as Barracas. Sendo que as maiores incidências foram para *V. mimicus* (Figuras 5 e 6). A confirmação dessas espécies de *Vibrio* em pescado tem sido relatada por diversos autores.

Rodrigues & Hofer (1986) avaliaram a presença de *Vibrio* em amostras de ostras coletadas na Baía de Sepetiba (RJ) e revelaram o isolamento de sete espécies, incluindo *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* e *V. vulnificus*.

Maté *et al.* (1994) ao estudar a distribuição de vibrios potencialmente patogênicos em ostras provenientes da costa Sudeste do Estado de São Paulo, isolaram sete espécies. Destas, *V. parahaemolyticus* (77%), *V. mimicus* (12%), e *V. vulnificus* (12%), de um total de 25 amostras analisadas.

V. mimicus tem sido relatado por causar diarreia em humanos, pelo consumo de alimentos marinhos crus ou parcialmente cozidos (Rippey, 1994). A bactéria foi isolada de amostras de pescas com gastroenterite devido à ingestão de ostras cruas em diversos países, como Canadá, México, EUA e Bangladesh. Nos EUA, entre os anos de 1977 e 1982, *V. mimicus* foi isolado de 21 casos de diarreia, sendo o consumo de ostra *in natura* o principal suspeito (O'Neill *et al.*, 1990).

Por outro lado, Hladý & Klontz (1996) relataram 40 casos de infecções por esse *Vibrio* na Flórida entre 1981 e 1993. Entre os quais, 34 (85%) foram causa de gastroenterite.

Igualmente, no Japão, durante um surto de gastroenterite que afetou 13 pessoas, a bactéria responsável foi *V. mimicus* e o veículo de transmissão foi alimentos marinhos crus, incluindo ostras. Foram reportados, ainda, nesse país, 59 casos de diarreia por esse mesmo *Vibrio*, entre 1984 e 1986, e em 27% dos casos, a bactéria foi isolada de diarreia em humanos (Katsuno & Ohnaka, 1989).

De acordo com a literatura científica (Kaysner & DePaola Jr., 2000), *V. mimicus* tem sido caracterizado por apresentar mecanismos de virulência similar às do *V. cholerae*, sugerindo-se potencial desse microrganismo em causar gastroenterites.

Apesar da baixa incidência de *V. vulnificus* nas amostras de ostras analisadas das duas Barras quando comparada às outras espécies encontradas (Figuras 5 e 6), deve-se levar em consideração o reconhecimento desse *Vibrio* como um patógeno altamente virulento, de elevada significância clínica (Daniels & Shafaie, 2000; Nascimento *et al.* 2001).

A espécie tem sido associada a septicemias primárias em indivíduos com doenças crônicas pré-existentes e que consumiram bivalves crus ou mal cozidos. Essa é uma doença grave, e com muita frequência fatal. Até a data, a maioria das infecções causadas por *V. vulnificus* tem sido quase exclusivamente associada ao consumo de ostras cruas (Oliver & Kaper, 1997).

Na Flórida, entre os anos de 1981 e 1987, as infecções causadas por *V. vulnificus* responderam por mais de 55% da mortalidade por septicemia primária, não se verificando casos por gastroenterites (Klontz *et al.*, 1988). Foram relatados ainda, casos de septicemia primária, infecções de ferimentos e gastroenterites, em outros países da Europa e da Ásia, comumente relacionados com o consumo de alimentos marinhos, principalmente no verão ou nos meses de temperaturas mais elevadas (Nascimento, 2000).

Mais recentemente houve relatos de gastroenterites por esse organismo no Japão e na Coreia, relacionadas à ingestão de uma variedade de produtos marinhos crus (Pereira, 2002).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em Atlanta-USA, foram reportados na Flórida entre os anos de 1981 e 1993, 30 casos de infecções por *V. vulnificus* em pessoas com pré-existência de doenças hepáticas após o consumo de ostras cruas (Hady & Klontz, 1996).

Sandgraf *et al.* (1996) estudaram a presença de *Vibrio* em alguns alimentos marinhos consumidos na cidade de São Paulo e observaram que as ostras foram as mais contaminadas. Foram isolados *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. mimicus* em 87% das amostras estudadas, além da identificação de outras espécies. *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* foram às espécies predominantes.

A ocorrência de vibrios geralmente não está associada à poluição humana (Cook *et al.* 2001), e a depuração dos mariscos normalmente não reduz os seus valores (Pereira, 2002).

Assim, a presença dessas bactérias em níveis elevados nas ostras, sobretudo *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, que são espécies de *Vibrio* bem documentadas como patógenos humanos, afigura-se como uma ameaça à saúde pública a ingestão desses moluscos crus.

Objetivando-se o desenvolvimento seguro, harmônico e sustentável da produção de ostras e, sobretudo a segurança dos seus consumidores, tornam-se necessárias medidas eficazes de monitoramentos e de fiscalização sanitária tanto desses bivalves, para se avaliar adequadamente as suas qualidades, como das suas áreas produtivas, a fim de se detectar as possíveis causas de contaminação.

A elaboração de programas educacionais em barracas e restaurantes da orla, bem como uma campanha de conscientização de turistas e moradores, de que as ostras não devem ser ingeridas cruas em nenhum lugar do mundo, são necessárias.

Recomenda-se ainda, a depuração dos moluscos antes de serem comercializados, a fim de se reduzir o número de bactérias que possam estar presentes, o que diminuiria substancialmente a fonte de infecções para os consumidores do alimento sem cozimento.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa suportam as seguintes conclusões:

1. Há necessidade de se promover medidas efetivas de proteção às áreas de captura das ostras, a fim de se prevenir à contaminação das mesmas por coliformes fecais, bem como maior rigor na fiscalização por parte das autoridades competentes, em relação às práticas adequadas de transporte, manipulação e comercialização desses moluscos.
2. Apesar da alta sensibilidade das cepas de *E. coli* frente aos antimicrobianos testados, foi detectada a resistência de algumas cepas da bactéria, isoladas das ostras das duas Barracas, aos antimicrobianos cefalotina (6,6%), e nitrofurantoína (5%). Esse fato constitui em perigo para a saúde pública, porque indica a circulação de genes de resistência no meio de onde às ostras procedem, podendo portanto, afetar a saúde dos consumidores desses moluscos.
3. Pelo elevado índice de *Vibrio* detectado nas amostras de ostras analisadas, com presença de espécies patogênicas principalmente *V. parahaemolyticus*, que foi a espécie predominante nas ostras estudadas, e ainda pelos altos valores de coliformes fecais apresentados, com elevada incidência de *E. coli*, não é recomendável o consumo dessas ostras *in natura*.
4. É importante que a população tenha consciência dos riscos que poderão advir do consumo de ostras cruas ou mal cozidas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, F.S.V; Carneiro, M.J.M; Martins, M.L.L; Cordeiro, C.A.M. Avaliação sensorial e microbiológica do peruá (*Balistes Capriscus*) capturado na Região Norte Fluminense e comercializado no mercado de Campos dos Goytacazes (RJ). *Hig. Alim.*, São Paulo, v.16, n.99, p.70-74, 2002.
- Andrade, N.J. & Macedo, J.A.B. *Higienização na Indústria de Alimentos*. Varela, 182p., São Paulo, 1996.
- ASM. American Society of Microbiology, *In Antimicrobial resistance – an ecological perspective*. Report of a colloquim by ASM, held in San Juan, 1999.
- Beirão, L.H.; Teixeira, E.; Meinert, E.M.; Santo, M.L.P.E. Processamento e industrialização de moluscos. *Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL*, 2002. Disponível em: <<http://www.setorpesqueiro.com.br/tecnologiadealimentos/moluscos/4.bioecologia6.shtm>>. Acesso em 20 maio 2003.
- Blake, P.A. Epidemiologic aspects of cholera, p.11-19, *In* Castro, A.F.; Almeida, W.F (eds.), *Cholera on the American Continents*. D.C. ILSI Press, Washington, 1993.
- Bode, R.B.; Brayton, P.R.; Colwell, R.R.; Russo, F.M.; Bullock, W.E. A new *Vibrio* species, *Vibrio cincinnatiensis*, causing meningitis: successful treatment in an adult. *Ann. Intern. Med.*, v.104, p.55-56, 1986.
- Bopp, C.A.; Brenner, F.W.; Wells, J.G.; Strockbine, N.A. *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*, p.459-482, *In* Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C.; Tenover, R.H. (eds.), *Manual of clinical microbiology*. APHA, 7th ed., Washington, 1999.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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, 2001.

Brenner, D.J. Enterobacteriaceae, p.409-423, *In* Williams & Wilkins (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, 1984.

Bryan, F.L. Epidemiology of foodborne disease transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970-1978. *J. Food Protect.*, v.43, n.11, p.859-876, 1980.

Campos, L.C.& Trabulsi, L.R. *Escherichia*, p.215-228, *In* Trabulsi, L.R. (ed.), *Microbiologia*. Atheneu, 3^a ed., São Paulo, 1999.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters or clams harvested from Long Island Sound, Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. *MMWR*, v. 48, p.48-51, 1999.

Cerrutti, R.L. & Barbosa, T.C.P. Flora bacteriana heterotrófica em ostra (*Crassostrea rhizophorae*) e águas da Baía Norte, Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.22,n.4, p.330-334, 1991.

Chiou, A.; Chen, L.H.; Chen, S.K. Food-borne illness in Taiwan, 1981-1989. *Food Australia*, v.43, p.70-71, 1991.

Constantinido, G. "A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente." *Hig. Alim.*, São Paulo, v.8, n.32, p.5-9, 1994.

Cook, D.W.; Burkhardt III, W.; DePaola, A.; McCarthy, S.A.; Calci, K.R. Molluscan, shellfish: oyster, mussels and clams, p.507-514, *In* Downes, F.P. & Ito, K. (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, 4th ed., Washington, 2001.

Cooke, E.M. *Escherichia coli* - an overview. *J. Hyg.*, New York, v.95, p.523-530, 1985.

Dalsgaard, A.; Glerup, P.; Høybye, L.L. Paarup, A.M.; Meza, R.; Bernal, M.; Shimada, T.; Taylor, D.N. *Vibrio furnissii* isolated from humans in Peru: a possible human pathogen? *Epidemiol. Infect.*, v.119, p.143-149, 1997.

Doyle, P.M. & Cliver, D.O. *Escherichia coli*, p.209-215, In Cliver, D.O. (ed.), *Foodborne diseases*. Academy Press, London, 1990.

Elliot, E.L.; Kaysner, C.A.; Jackson, L.; Tamplin, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* ssp. In *FDA bacteriological analytical manual on line*, jan. 2001. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam-4.html> >. Acesso em 16 jan. 2003.

FDA. Food and Drug Administration. *Food Code*. Public Health Service, Washington, 1997.

Feng, P.; Weagant, S.D.; Grant, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. In *FDA bacteriological analytical manual online*, sep. 2002. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html> >. Acesso em 28 jan. 2003.

Feng, P. & Weagant, S.D. Diarrheagenic *Escherichia coli*, In *FDA bacteriological analytical manual online*, sep. 2002. Disponível em < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html> >. Acesso em 28 jan. 2003.

FIPERJ & IP-SP. *Apoio ao Desenvolvimento de Cultivo de Moluscos Bivalves no Brasil*. Relatório técnico, Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 181 p., 1989.

Franco, B.D.G.M. & Landgraf, M. *Microbiologia dos Alimentos*. Atheneu, 182p., São Paulo, 1996.

Garthright, W.E. Appendix 2: most probable number from serial dilutions, In *FDA bacteriological analytical manual online*, sep. 2001. Disponível em < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html> >. Acesso em 10 jun.2002.

Germano, P.M.L.; Miguel, M.; Miguel, O.; Germano, M.I.S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.7, n.27, p.6-11, 1993.

Germano, P.M.L. & Germano, M.I.S. A vigilância sanitária de alimentos como fator de promoção de saúde. *O Mundo da Saúde*, São Paulo, v.24, n.2, p.59-66, 2000.

Germano, P.M.L.; Oliveira, J.C.F.; Germano, M.I.S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.7, n.28, p.40-45, 1993.

Gonçalves, P.M.R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.12, n.53, p.38-44, 1998.

Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* v.13, p.60-98, 1991.

Guzman, E.S.C. *Bioquímica de Pescado e Derivados*. Funep, 409p., Jaboticabal, 1994.

Hagler, A.N. & Hagler, L.C.S.M. Microbiologia Sanitária, p.85-102, *In* Roitman, I.; Travassos, L.R. & Azevedo, J.L.(eds.) , *Tratado de microbiologia*. Manole Ltda, São Paulo, 1988.

Henriques, M.B.; Zamarioli, L.A.; Pereira, O.M.; Faustino, J.S. Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (LINAEUS, 1758), nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista, Estado de São Paulo. *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, v.33, p.69-76, 2000.

Hicks, S.G.; Frankel, J.B.; Kaper, G.D.; Phillips, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. *Infec. Immun.*, v.66, p.1570-1578, 1998.

Hitchins, A.D.; Feng, P.; Watkins, W.D.; Rippey, S.R.; Chandler, L.A. *Escherichia coli* and the coliform bacteria, p.401, *In FDA bacteriological analytical manual*, Rev. A. AOAC International, 8th ed., Gaithersburg, 1998.

Hlady, W.G. & Klontz, K.C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.167, p.479-483, 1996.

Huq, M.I.; Alam, K.M.J.; Brenner, D.J.; Morris, G.K. Isolation of *Vibrio* like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, v.11, p.621-624, 1980.

Huss, H.H. Assurance of Seafood Quality. In FAO, Fisheries Technical (Eds.), *Food and Agriculture Organization (Rome)*. Paper n.34, 169p, 1994.

Jacobi, P.R. *Ciência Ambiental: Os desafios da interdisciplinaridade*, Annablume-Fapesp, 388p., São Paulo, 2000.

Jakabi, M. & Franco, B.D.G.M. Frequência de isolamento de cepas de *E. coli* patogênicas em alimentos de origem animal. *Ciê. Tecnol. Alim.*, Campinas, v.11, n.1, p.170-181, 1991.

Jean-Jacques, W.; RajashekaRaiah, K.R.; Farmer III, J.J.; Hickman, F.W.; Morris, J.G.; Kallick, C.A. *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. *J. Clin. Microbiol.*, v.14, n.6, p.711-712, 1981.

José, V.F. *Bivalves e a segurança do consumidor*. Tese de Mestrado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 182p., São Paulo, 1996.

Kaysner, C.A.; Tamplin, M.L.; Wekell, M.M.; Stott, R.F.; Colburn, K.G. Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.55, n.12, p.3072-3079, 1989.

Kaysner, C. A. & DePaola Jr., A. *Vibrio*, p.405-419, In Downes, F.P. & Ito, K. (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, 4th ed., Washington, 2001.

Klontz, K.C.; Lieb, S.; Scheriber, M.; Janowski, H.T.; Baldy, L.M.; Gunn, R.A. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections in Florida, 1981-1987. Clinical and Epidemiologic Features - *Ann. Intern. Med.*, v.109, p.318-323, 1988.

Kobayashi, L.R. & Ohnaka, T. Food poisoning due to newly recognized pathogens. *Appl. Bacteriol.*, p.1-12, 1989.

Kushner, G.J. Meat safety under fire. *Food Processing*, London, p.17-20, 1993.

Landgraf, M.; Leme, K.B.P.; Garcia-Moreno, M.L. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio* spp in seafood consumed in Sao Paulo city, Brazil. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.27, p.126-130, 1996.

Levine, W.C. & Griffin, P.M. *Vibrio* infection on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance and the Gulf Coast *Vibrio* Working Group. *J. Infect. Dis.*, v.167, p.479-483, 1993.

Lewis, G.D.; Hough, A.; Green, D.H.; Hay, J.E. & Ferguson, L.R. Modification of the polyethylene glycol 6000 precipitation method for recovering human and indicator viruses from oyster and mussels. *N.Z.J. Mar. Freshwat. Res.*, Arlington, v.30, n.4, p.443-447, 1996.

Lima, F.C. Vibrios marinhos: 1. *Vibrio parahaemolyticus*. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.11, n.47, p.14-22, 1997.

Lima, E.A. Investigação de *Salmonella* e de *Vibrio parahaemolyticus* nos caranguejos comercializados por ambulantes na Avenida Bezerra de Menezes, Fortaleza, Ceará. Monografia (conclusão do curso de graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, 64p., Fortaleza, 2003.

Lira, A.A.; Barros, G.C.; Lima, M.C.G.; Mota, R.A. Aspectos sanitários do ambiente aquático onde são capturados moluscos bivalves para consumo no Grande Recife, PE. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.11, n.77, p.53-57, 2000.

Lira, A.A.; Barros, G.C.; Mota, R.A. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife, PE. *Hig. Alim.*, v.15, n.90/91, p.50-59, 2001.

Machado, I.C.; Koga, S.M.; Woioechovsky, E.; Gelli, D.S. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia-SP, Brasil, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliana*). 2- Análise da ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). *Hig. Alim.*, São Paulo, v.15, n.83, p.44-48, 2001.

Magalhães, M.; Magalhães, V.; Antas, M.G.; Tateno, S. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de humanos e de ostras no Recife, Brasil. *Rev. Microbiol.*, v.22, n.2, p.83-88, 1991.

Mahon, C.R. & Manuselis, Jr.G. Enterobacteriaceae, p.447-487, *In* Mahon, C.R. & Manuselis Jr.G.(eds.), *textbook of diagnostic microbiology*. Saunders Company, Philadelphia, 1995.

Matté, G.R.; Matté, M.H.; Rivera, I.G.; Martins, M.T. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from tropical region. *J. Food Prot.*, v.57, n.10, p.870-873, 1994.

Mead, P.S.; Slutsker, L.; Dietz, V. Food-related illness and disease in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, v.5, p.1-20, 1999.

Meng, J.; Feng, P.; Doyle, M.P. Pathogenic *Escherichia coli*, p.331-341, *In* Downes, F.P. & Ito, K. (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, 4th ed., Washington, 2001.

Mermelstein, N.H. Controlling *Escherichia coli* O157: H7 in meat. *Food Technol.*, Chicago, v.47, n.47, p.90-91, 1993.

Mims, C.A.; Playfair, J.H.L.; Roitt, I.M.; Wakelin, D.; Willams, R. *Medical Microbiology*. Mosby Europe, London, 1993.

Mohamed Hatha, A.A. & Lakshmanaperumalsamy. Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiol.*, London, v.14, p.111-116, 1997.

Moraes, I.R.; Mastro, N.L.D.; Jakabi, M.; Gelli, D.S. Estudo da radiosensibilidade ao ^{60}CO do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. *Saúde Pública*, São Paulo, v.34, p.29-32, 2000.

Morelli, A.M.F.; Vieira, R.H.S.F.; Reis, C.M.F.; Rodrigues P.D.; Fonteles-Filho, A.A. Indicadores de contaminação fecal para ostra-do-mangue, (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas em Fortaleza, Ceará. *Hig. Alim.*, v.17, n.113, p.81-88, 2003.

Morris, J.G. & Blake, R.E. Cholera and other vibrios in the United States. *New Engl. J. Med.*, v.312, p.343-350, 1985.

Nascimento, S.M.M.; Vieira, R.H.S.F.; Theophilo, G.N.D.; Rodrigues, D.P.; Vieira, G.H.F. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. *Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v.43, n.5, p.263-266, 2001.

Nascimento, S.M. Pesquisa de *Vibrio vulnificus* em camarões marinhos comercializados na Feira do Mucuripe em Fortaleza-Ceará-Brasil. Tese de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos da universidade Federal do Ceará, 61p., 2000

Nataro, J.P.; Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. American Society for microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh Informational Supplement 11 M100, Washington D.C., v.1, n.1, p.123, 2001.

Ni, C.Z. & Huang, Z.G. Faecal Coliform contamination of intertidal bivalves from Hong Kong. *In Second International Workshop on the Malacofauna of Hong Kong and Southern China*, Hong Kong, v.2, p.473-478, 1985.

NSSP. National Shellfish Sanitation Program. *Guide for the control of Molluscan shellfish (rev.)*. Dep. of Health and Human Serv., Public Health Serv., Washington, 1997.

Oliver, J.D. & Kaper, J.B. *Vibrio* Species, p.228-264, In Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (eds.), Food microbiology: Fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, 1997.

O'Neill, K.R.; Jones, S.H.; Grimes, D.J. Incidence of *Vibrio vulnificus* in northern New England water and shellfish. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.17, p.163-168, 1990.

Paiva, C.P.; Borges, R.G.; Panetta, J.C. Frequência de quadros gastrintestinais em aeronautas: pressuposta ligação com toxinfecções alimentares. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.14, n.75, p.13-23, 2000.

Pereira, C.S.; Viana, C.M.; Rodrigues, D.P. Enumeração e isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras consumidas *in natura* nos restaurantes do Rio de Janeiro. In II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente. Santa Catarina, 1998. Disponível em < <http://www.ufsc.br/ccb/titulos.htm> >. Acesso em 16 jan.2004.

Pereira, F.S. Methodologies to assess *Vibrio* spp virulence. In *Proceedings of the Veterinary Sciences Congress*, SPVC, Oeiras, 2002.

Pereira, O.M.; Scorvo, J.D.; Marques, H.L.A.; Ostini, S.; Bastos, A.; Magnavita, O.; Flores, R. *Estudo sobre os moluscos bivalves distribuídos na costa do litoral brasileiro de importância comercial*. FAO/ Instituto de Pesca / FIPERJ, 194p., 1991.

Pedrosa, L.F.C. & Cozzolino, S.M.F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal (RN). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.21, n.2, 2001

Petri, C.M.; Antunes, L.A.F.; Saridakis, H.O. *Escherichia coli* em produtos cárneos comercializados em Londrina-PR. I- Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC). *Rev. Microb.*, São Paulo, v.20, n.4, p.421-426, 1989.

Rippey, S.R. Infections diseases associated with Molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev.* v.7, p.419-425, 1994

Rodrigues, D.P. & Hofer, E. *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev. Microbiol.*, v.17, n.14, p.332-338, 1986.

Saliba, L.J. & Helmer, R. Health risks with pollution of coastal waters. *Wld. Hlth. Statist. Quart.*, v.43, n.3, p.177-187, 1990.

Silva, M.C.D.; Normande, A.C.L.; Ferreira, M.V.; Ramalho, L.S. Avaliação microbiológica de pescado comercializado em Maceió, AL. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.16, n.96, p.60-64, 2002.

Splittstoesser, D.F.; Queale, D.T.; Bowers, J.L.; Wilkison, M. Coliform content of frozen blanched vegetables packed in the United States. *J. Food Safety*, v.2, p.1, 1980.

Theophilo, G.N.D.; Vieira, R.H.S.F.; Rodrigues, D.P.; Menezes, F.G.R. *Escherichia coli* isolates from seafood: toxicity and plasmid profiles. *Int. Microbiol.*, v.5, p.11-14, 2002.

Valejo, F.A.N.; Andrés, C.R.; Mantovan, F.B.; Rister, G.P.; Santos, G.D.; Andrade, F.F. Vigilância Sanitária: Avaliação e controle da qualidade dos alimentos. *Hig. Alim.*, São Paulo, v.17, n.106, p.16-20, 2003.

Vieira, R.H.S.F. & Iaria, S.T. *Vibrio parahaemolyticus* in lobster *Panulirus laeviscauda* (La Treile). *Rev. Microbiol.*, v.24, p.16-21, 1993.

Vieira, R.H.S.F.; Rodrigues, D.P.; Barreto, N.S.E.; Sousa, O.V.; Torres, R.C.O.; Ribeiro, R.V.; Saker-Sampaio, S.; Nascimento, S.M.M. *Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado: Teoria e prática*. Varela, 381p., São Paulo, 2003.

Week, M.E.; Weitzman, I.; Swanson, R.C.; Lucas, J.P. Investigation of foodborne illness outbreaks, p.747-761, In Vanderzant, C. & Plittstoesser, D.F (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, 3th. ed., Washington, 1992.

Week, M.E.; Weitzman, I.; Swanson, R.C.; Lucas, J.P. Investigation of foodborne illness outbreaks, p.747-761, In Vanderzant, C. & Plittstoesser, D.F (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA, 3th. ed., Washington, 1992.

West, P.A. The human pathogenic vibrios. A public health update with environment perspectives. *Epidem. Inf.*, v.103, p.1-34, 1989.

Wolfe, M. The effects of cholera on the importation of foods: Peru - a case study. *Microb. Digest*, p.42-44, 1992.

Wood, P.C. Manual de higiene de los mariscos. Ed. Acribia, 83 p., 1996.