



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

**SOBREVIVÊNCIA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EM
CAMARÃO SETE-BARBAS, *Xiphopenaeus kroyeri*,
ESTOCADO EM TEMPERATURAS DE
RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO**

DANNIELLE BATISTA ROLIM SOUSA

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

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
JANEIRO/2004**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S696s Sousa, Daninielle Batista Rolim.
Sobrevivência de vibrio parahaemolyticus em camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus Kroyeri*, estocado em temperaturas de resfriamento e congelamento / Daninielle Batista Rolim Sousa. – 2004.
32 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2004.
Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Orientador

Prof^a SILVANA SAKER SAMPAIO, Ph.D.

Membro

Prof^a ARTAMÍZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA, M. Sc.

Membro

VISTO:

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

Prof^a ARTAMÍZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA, M. Sc.
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

Vibrio parahaemolyticus

Gosto do bem quentinho,
sou bonito e sou malvado,
ataco da Ásia ao Brasil,
adoro ambiente salgado.

Sou dono de uma toxina,
de quem é preciso cuidado,
se ataco dou dor de barriga,
causando um suor arretado.

Encontrando a alma gêmea
dou-lhe um beijo e fico calma
transmito-lhe minha toxina
multiplicando minha alma.

Regine Limaverde

AGRADECIMENTOS

- Aos meus amados pais Luiz e Darticléa, que com amor me conduziram para este ideal, a minha mais profunda gratidão e agradecimento.
- Às minhas colegas de laboratório Anahy, Luana, Janisi, Karla, Gleire, André, D. Zuíla e Renata.
- Às companheiras indispensáveis do laboratório Leyla, Cristiane, Hilda, Susy, Isabel e Waleska, sem as quais a realização deste trabalho seria impossível.
- Aos amigos do Departamento de Engenharia de Pesca em especial a Ticiane, Cristiane, Sheila, Lucina Q., Jeffresson, David, Gabriel, aos amigos do "Full Dogs" e, em especial a minha amiga, que sabe que eu sei, Elenice.
- Ao LABOMAR pelo uso de suas instalações.
- Aos professores e funcionários do Curso de Engenharia de Pesca.
- A todos os formandos do semestre 2003.2.
- A Oscarina, que mesmo longe, me ajudou.
- À Norma por me mostrar à rotina do trabalho e despertar meu interesse pela Microbiologia.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho

SUMÁRIO	Páginas
RESUMO	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Gênero <i>Vibrio</i>	3
1.2 <i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	4
1.3 Camarão	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Camarão	8
2.2 Cepa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> usada na infecção dos camarões	8
2.3 Tratamento da cepa	8
2.4 Experimento piloto	9
2.5 Tratamento do camarão	9
2.6 Contaminação do camarão	10
2.7 Preparação do homogenato e inoculação das placas de TCBS e PCA	10
3. RESULTADOS	12
4. DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÕES	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a sobrevivência de *Vibrio parahaemolyticus*, inoculado em homogenato do camarão sete barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* estéril, incubado a diferentes temperaturas de refrigeração (geladeira, freezer e gelo) por sete dias, bem como observar qual dessas temperaturas é mais favorável à recuperação da bactéria. Foram realizadas três coletas, no período de setembro a outubro de 2003. O camarão foi adquirido na Feira de Pescado da Praia do Mucuripe, Fortaleza-Ceará. Em laboratório, 600g de camarão eram lavados com água destilada e imersos em água fervente por dez minutos para eliminar qualquer *Vibrio* que estivesse na amostra. A contaminação do camarão foi feita mediante o contacto dos animais com 10^7 de cultura de *Vibrio parahaemolyticus*, por cinco minutos. A amostra era dividida em 22 frações, de 25g sendo uma delas usada para contagem no tempo zero e as restantes divididas em três lotes sendo estocadas em três temperaturas: geladeira (12°C), gelo (0°C) e freezer (<-10°C). Por sete dias seguidos, os *Vibrio parahaemolyticus* eram quantificados nos camarões, através do Método de Contagem Padrão em Placas, em meios ágar TCBS e PCA. Mesmo sendo sensível a baixas temperaturas, foi possível a recuperação de células da bactéria por até sete dias de incubação.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Placa de Ágar Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose (TCBS) inoculada com homogenato de camarão antes do contato com a água fervente. 13
- Figura 2 - Placa de Ágar Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose (TCBS) inoculada com homogenato de camarão após o contato com água fervente por 10 minutos. 13
- Figura 3- Curvas das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose Ágar cada 24 horas, durante sete dias, a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, incubado em temperatura de geladeira, gelo e freezer. 15
- Figura 4 - Curvas das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Plate Count Ágar cada 24 horas, durante sete dias, a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, incubado em temperatura de geladeira, gelo e freezer. 17

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resultados absolutos e logaritimizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose (TCBS) a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* e estocados em diferentes temperaturas (12°, 0°C e <-10°C) por um período de sete dias. 14
- Tabela 2 – Resultados absolutos e logaritimizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Plate Count Ágar (PCA) a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* e estocados em diferentes temperaturas (12°C, 0°C e < -10°C), por um período de sete dias. 16

SOBREVIVÊNCIA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EM CAMARÃO SETE- BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*) ESTOCADO EM TEMPERATURAS DE RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

Danielle Batista Rolim Sousa

1. INTRODUÇÃO

As regiões Norte e Nordeste do Brasil contribuem com 40% da produção pesqueira marinha, sendo apenas 5% provenientes de produção industrial. A produção de pesca artesanal, não tem registros estatísticos confiáveis, mas possivelmente emprega em torno de 30.000 pescadores e contribui com mais da metade da captura marinha brasileira (CASTELLO, 2003).

No Brasil, o consumo de pescado e produtos derivados tem aumentado significativamente nos últimos anos, o que é salutar não só do ponto de vista de mudança de hábitos alimentares, como também pelo fato do pescado ser muito importante sob o aspecto nutricional (HOFFMAN, et al 1999). É considerado uma excelente fonte de proteínas, possuindo todos os aminoácidos essenciais ao crescimento e manutenção do organismo humano.

Ao mesmo tempo em que se tem uma expansão do mercado consumidor de camarão, cada vez mais alimentos de origem marinha têm sido implicados como causadores de surtos de intoxicações e infecções intestinais. Segundo LIPP; ROSE (1997), pelo menos dez gêneros bacterianos são implicados em doenças adquiridas pela ingestão de alimentos marinhos.

Por ser um alimento rico em nutrientes, principalmente proteínas, o pescado é bastante susceptível ao ataque e/ou desenvolvimento microbiano, além de poder sofrer alterações de natureza física ou química, que irão refletir geralmente em sua cor, consistência, odor e sabor podendo além de acarretar perdas do produto, ocasionar riscos à saúde dos consumidores.

Dentre as bactérias que atuam desfavoravelmente sobre o pescado e outros animais típicos do ambiente aquático estão os pertencentes aos gêneros

Salmonella, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Vibrio*, além daquelas pertencentes ao grupo coliforme.

As pesquisas, normalmente, restringem-se à presença de bactérias patogênicas clássicas, tais como: *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Nos últimos 20 anos, porém, têm acontecido alguns surtos de infecções ligados a alimentos, relacionados a bactérias que anteriormente não eram conhecidas. Dentre essas, classificadas no rol das possíveis causadoras de infecções alimentares, figuram algumas espécies do gênero *Vibrio* (THEOPHILO, 1992).

Os estudos epidemiológicos têm mostrado que dentre as espécies do gênero *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* é um enteropatógeno em potencial, de distribuição universal (SAKAZAKI, 1983) sendo isolado de alimentos de origem marinha, tais como peixes, moluscos e crustáceos, e também de águas estuarinas e sedimentos (HOFER; SILVA, 1984).

A maioria dos alimentos *in natura* apresenta uma considerável variedade de microrganismos. A carga microbiana pode facilmente aumentar ou diminuir, dependendo das condições de manuseio e tratamento, tais como resfriamento, congelamento, cozimento, etc (RIEDEL, 1987).

A carne de crustáceo, não deve sofrer tratamento térmico prolongado, uma vez que essa prática pode alterar a textura de seu músculo (VIEIRA, 1990). A redução no tempo de cozimento poderia ser um fator determinante como forma da não eliminação de bactérias patogênicas do alimento.

Em alguns países, principalmente nos orientais, onde existe uma infinidade de pratos exóticos, essa prática vai contra os costumes os quais afirmam que "o cozimento" destrói as características sensoriais naturais dos alimentos, assim como o seu valor nutritivo (NOVAK, 1996).

A sensibilidade de *V. parahaemolyticus* com relação ao frio desperta muitas controvérsias entre os pesquisadores, alguns autores citam que a bactéria resiste ao frio, enquanto outros afirmam que ela deixa de ser viável em ambientes frios. Assim, ainda é discutida qual seria a melhor temperatura para a estocagem do pescado no sentido de preveni-lo, ou mesmo, minimizar a contaminação com a bactéria.

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

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

O primeiro surto de doenças transmitidas pelos alimentos (DTA) ao homem (VIEIRA, 2004), reconhecidamente causado por *V. parahaemolyticus*, data de 1950, quando o microrganismo foi isolado de um alimento japonês *shirasu* constituído por sardinha fervida em salmoura e, concomitantemente, das fezes de pacientes na cidade de Osaka, Japão.

Na Croácia, foram estudadas 117 amostras de animais marinhos, peixe, camarão e moluscos bivalves, coletadas em mercados e hotéis na costa marinha e foram pesquisados *Vibrio* spp. Os isolados mais freqüentes foram de *Vibrio parahaemolyticus* (9,40%), seguidos de *V. vulnificus* (6.84%) e *V. alginolyticus* (3.42%) (SLAVICA, 2002).

1.1 O gênero *Vibrio*

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

O *V. parahaemolyticus* pertence à família Vibrionaceae, cujos membros são caracterizados como bacilos Gram-negativos, retos ou curvos, móveis devido à presença de um único flagelo polar, produzindo oxidase e catalase e fermentando glicose sem produção de gás. Das 38 espécies que fazem parte do gênero, dez são consideradas patogênicas ao homem (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

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

V. parahaemolyticus, uma das espécies mais importantes da família, tem sido isolado de águas estuarinas e marinhas em todos os continentes (CDC, 1999).

A distribuição dessa bactéria tem marcado diferenças estacionais nos reservatórios naturais. Durante os meses de frio, ela pode ser encontrada nos sedimentos marinhos, enquanto nos meses de calor nas águas litorâneas, em peixes e mariscos (ASSP, 1992). Existem relatos sobre o isolamento de *V. parahaemolyticus* em águas continentais e peixes de rios e lagos, onde a concentração de cloreto de sódio apresenta-se alta, permitindo assim a sobrevivência da bactéria (TWEDT, 1989).

1.2. *Vibrio parahaemolyticus*

O *V. parahaemolyticus* é uma bactéria que possui a forma de bastonetes curtos, retos ou levemente curvados, mas seu pleomorfismo freqüentemente lhe dá formas curvas e cocóides. É uma bactéria móvel, que apresenta flagelo polar. Quando em meio sólido, apresenta flagelos laterais ou peritríquios. Estudos epidemiológicos apontam o ambiente marinho como a origem mais provável do *V. parahaemolyticus* com o maior número de células em águas costeiras e estuarinas temperadas (LIMA, 1997).

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

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

positivas, diferença essa que pode servir de marcador epidemiológico (ASSP, 1992).

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

A literatura descreve muitos meios seletivos para o isolamento da bactéria. O Ágar Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose (TCBS) é provavelmente o mais amplamente usado para o isolamento de vibrios. O ágar TCBS disponível comercialmente, tanto é utilizado para amostras clínicas, como para análise de alimentos e água. A fermentação da sacarose é o aspecto diferencial desse meio de cultura. A produção de ácido faz com que a cor do indicador mude de verde para amarelo.

As infecções alimentares causadas por *V. parahaemolyticus* ocorrem de forma esporádica e de uma fonte comum. Os países mais afetados pelos surtos, principalmente devido a seus hábitos alimentares, são Japão, Taiwan e outras regiões litorâneas da Ásia. Casos de surtos são descritos também em muitos países e continentes (ASSP, 1992).

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

Freqüentemente, a doença causada pelo microrganismo se manifesta como casos esporádicos de uma gastroenterite relativamente leve, com sintomas tais como diarreia, vômito e cólicas abdominais. Raramente o microrganismo pode produzir septicemia grave, com perigo para a vida do paciente. Isto ocorre, especialmente, em pessoas enfermas por doenças hepáticas ou com deficiências imunológicas (INFORMATIVO INSPETOR DE PESCADO, 2000). O período de incubação da doença varia de 12 a 24 horas, podendo ainda variar de seis a mais de 96 horas. Os sintomas mais comuns são uma disenteria aquosa com duração de dois a três dias, que em alguns

casos envolve fezes mucóides e sanguinolentas, podendo haver então nos casos mais graves, necessidade de hospitalização. Os outros sintomas mais comuns são diarreia, dores abdominais, náuseas, vômito, dor de cabeça, febre baixa e calafrios (TWEDT, 1989). Essa infecção pode ainda causar problemas sérios em pessoas com doenças já existentes, como por exemplo, alcoólatras, diabéticos, portadores de doenças renais, sistema imunológico comprometido e problemas gastrintestinais (CDC, 1998).

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

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

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

1.3 Camarão

Os camarões pertencem ao mais numeroso filo existente no reino animal, o artrópoda. Eles são classificados no sub-filo Crustacea, que conta com mais de 38.000 representantes. A ordem Decapoda, maior ordem dos crustáceos, abriga também os familiares lagostins, lagostas e caranguejos. A maioria dos decápodos é marinha, mas os lagostins e alguns camarões e caranguejos invadiram a água doce.

Os camarões marinhos são organismos pecilotérmicos. Isto significa que são incapazes de controlar sua temperatura corporal, a qual é ajustada em

resposta às temperaturas do meio em que vivem. Todos os processos metabólicos e fisiológicos entram em declínio sob baixas temperaturas.

Segundo NOLAN et al. (1984), o *Vibrio parahaemolyticus* em animais marinhos, aumenta à medida que esses alimentos são comercializados em condições sanitárias inadequadas e/ou quando há descaso dos comerciantes em relação à preservação dos mesmos, em baixas temperaturas.

Um dos pontos de comercialização de camarão marinho em Fortaleza é a Feira de Pescado da praia do Mucuripe, onde a conservação e a manipulação, geralmente impróprias. Tais condições podem favorecer a proliferação de microrganismos, incluindo aqueles pertencentes a microbiota normal do camarão, podendo provocar, conseqüentemente, distúrbios gastrintestinais nos consumidores desse pescado (VIEIRA, 1990).

O objetivo da presente pesquisa foi testar a recuperação de cepas de *V. parahaemolyticus* inoculadas em um homogenato estéril de camarão sete-barbas, estocado em diferentes temperaturas de refrigeração: geladeira (12°C), gelo (0 °C) e freezer (< -10 °C).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Camarão

A espécie utilizada como substrato para inoculação de cepa de *V. parahaemolyticus* foi o camarão sete barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, obtido na Feira de Pescado da Praia do Mucuripe, Fortaleza-Ceará. O material era transportado até o laboratório de microbiologia do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR).

No período de setembro a outubro de 2003 foram realizadas três coletas do camarão marinho com carapaça e cabeça pesando aproximadamente 600 g cada uma.

2.2 Cepa de *Vibrio parahaemolyticus* usada na infecção dos camarões

Cepa pura de *V. parahaemolyticus*, devidamente sorotipada, foi doada pela Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro. A cepa era conservada em Ágar-Triptocase-Soja (TSA) contendo 3% de NaCl e estocada em estufa B.O.D.

2.3 Tratamento da cepa

Com o intuito de se inocular um grande número de células, a cepa de *V. parahaemolyticus*, mantida em TSA contendo 3% de NaCl, era repicada em 10mL de Caldo Triptona-Soja(TSB) contendo 3% e incubada por 24 horas a 37°C. Decorrido esse tempo o meio era transferido para erlenmeyer contendo 90mL de TSB contendo 3% de NaCl e novamente incubada a 37°C por aproximadamente 20 horas.

2.4 Experimento piloto

Foi feito um experimento piloto para se testar tempo ideal para se eliminar qualquer vibrio que estivesse presente na amostra de camarão, uma vez que no experimento seriam inoculados camarões livres de vibrios. Para tanto, foi usado caldo TSB contendo 3% de NaCl inoculado com cepas puras de *V. parahaemolyticus*.

A cultura de *V. parahaemolyticus* (em TSB contendo 3%) era diluída em um balão de 1.000mL contendo 900mL de TSB contendo 3%. O camarão (600g), previamente limpo, ficava em contato por cinco minutos com a diluição de TSB contendo 3%. Depois de se retirar uma alíquota de 25g, era colocado em contato com água fervente sendo recolhidos 25g do camarão a cada cinco minutos, até os 20 minutos, para serem homogeneizados em salina 3% estéril e diluídos até 10^{-6} . Depois eram então plaqueados em ágar TCBS e essa operação foi repetida até que se soubesse qual o tempo ideal para que não fosse recuperada mais nenhuma célula de *Vibrio parahaemolyticus*. Só assim poder-se-ia novamente infectar o camarão tendo-se a certeza de que nenhum *V. parahaemolyticus* (natural da microbiota do camarão) interferisse nos resultados. Foram estriadas placas de ágar TCBS antes e depois da eliminação dos vibrios pelo calor.

2.5 Tratamento do camarão

As amostras constavam de 600g de camarão marinho, as quais eram separadas de contaminantes macroscópicos, sendo posteriormente lavadas por duas vezes com água destilada para a remoção de sujidades. Objetivando eliminar as bactérias da sua microbiota de origem, o camarão era imerso em água fervente por dez minutos.

Para se confirmar a eliminação da microbiota, uma alíquota de 25g era homogeneizada em 225mL de solução aquosa de NaCl estéril e feitas diluições até 10^{-6} . Procedia-se o plaqueamento em ágar TCBS usando-se técnicas de *spread plate* para se testar a presença de bactérias sacarose negativa em paralelo ao experimento. As placas eram então incubadas por 48 horas, a 35°C

em estufa. Após esse tempo era observado se havia crescimento de alguma colônia nas placas.

2.6 Contaminação do camarão

A cultura de *V. parahaemolyticus* em TSB contendo 3% era diluída em balão de 1.000mL contendo 900mL de TSB contendo 3%.

O camarão, já livre de microrganismos, era artificialmente contaminado por contacto durante cinco minutos com essa cultura. Após esse tempo eram feitas diluições do caldo TSB contendo 3% contaminado e tomados 0,1mL que era então inoculado em placas de TCBS para quantificação das UFC de *V. parahaemolyticus* usadas na contaminação do camarão. Esta era a contagem do inóculo e, sua quantificação, 10^7 , era feita através do método de Contagem Padrão em Placas(CPP).

Ao final da contaminação, a amostra de camarão era dividida em vinte e duas frações de 25g cada, sendo uma fração do camarão à imitação da contagem do inóculo também homogeneizada e contada através do método de CPP. Esta era a contagem do tempo zero, sendo as outras vinte e uma frações acondicionadas em recipientes plásticos devidamente lavados e desinfetados, divididos em três lotes. Cada lote foi estocado em três diferentes temperaturas: sete em geladeira a 12°C, sete em gelo a 0°C, renovável a cada 24 horas, e sete em freezer a <-10°C.

2.1.7.1 Preparação do homogenato e inoculação das Placas em Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose e Plate Count Ágar.

Diariamente uma amostra de cada lote era retirada para ser analisada. As amostras eram homogeneizadas em 225mL de solução aquosa de NaCl por 1 minuto. Diluições sucessivas até 10^{-6} eram feitas e alíquotas eram plaqueadas em duplicata pelo método *spread plate* (0,1mL) em ágar TCBS e plaqueadas em duplicata pelo método *pour plate* (1,0mL) em ágar PCA. As placas eram incubadas por 18 a 24 horas a 35°C quando então eram lidos os

resultados. As placas a serem contadas eram sempre aquelas que apresentavam número de colônias entre 25 e 250. Todas as contagens eram acompanhadas por uma placa-controle plaqueada com *V. parahaemolyticus*.

No final do experimento os resultados foram logaritimizados e deles usadas na construção de tabelas e gráficos para expressar a resistência das cepas da bactéria às diferentes temperaturas de geladeira, gelo e freezer.

3. RESULTADOS

De acordo com a metodologia apresentada, a resistência do *V. parahaemolyticus* em 12°C, 0°C e <-10°C por sete dias, e os seguintes resultados foram obtidos.

A Figura 1 mostra uma placa de ágar TCBS com colônias de *Vibrio* spp. antes do contato do camarão com água fervente, enquanto que, a Figura 2 mostra uma placa já sem colônias de *Vibrio* spp, demonstrando a eficiência do tratamento em água fervente por 10 minutos.

Na Tabela 1 estão expressos os resultados absolutos e logaritimizadas das contagens de *V. parahaemolyticus* em ágar TCBS a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, estocado em diferentes temperaturas (12°C, 0°C e <-10°C) por um período de sete dias.

A Figura 3 apresenta as curvas das contagens de *V. parahaemolyticus* incubado em temperaturas de geladeira, gelo e freezer, a cada 24 horas, durante sete dias, em ágar TCBS.

Na Tabela 2 estão expressos os resultados absolutos e logaritimizadas das contagens de *V. parahaemolyticus* em ágar PCA a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, estocado em diferentes temperaturas (12°C, 0°C e <-10°C) por um período de sete dias.

A Figura 4 apresenta as curvas das contagens de *V. parahaemolyticus* incubado em temperaturas de geladeira, gelo e freezer a cada 24 horas, durante sete dias, em ágar PCA.



Figura 1 – Placa de Ágar Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose (TCBS) inoculada com homogenato de camarão antes do contato com a água fervente.



Figura 2 – Placa de Ágar Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose (TCBS) inoculada com homogenato de camarão após o contato com água fervente por 10 minutos.

Tabela 1 - Resultados absolutos e logaritimizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Ágar Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, estocados em diferentes temperaturas (12°C, 0°C e <-10°C) por um período de sete dias.

TCBS	Dias	1ª Coleta		2ª Coleta		3ª Coleta	
		UFC/g	log	UFC/g	log	UFC/g	log
Geladeira	0	64.500	4,81	220.000	5,34	5.000	3,70
	1	70.000	4,85	172.000	5,24	3.600.000	6,56
	2	22.700	4,36	150.000	5,18	1.680.000	6,23
	3	210.000	5,32	7.440.000	6,87	2.730.000	6,44
	4	190.000	5,28	9.600.000	6,98	10.160.000	7,01
	5	44.000	4,64	33.700	4,53	1.200	3,08
	6	21.800	4,34	5.900.000	6,77	300	2,48
	7	21.800	4,34	5.900.000	6,77	300	2,48
Gelo	0	64.500	4,81	220.000	5,34	5.000	3,70
	1	43.000	4,63	4.100	3,61	178.000	5,25
	2	6.900	3,84	10.000	4,00	114.000	5,06
	3	11.400	4,06	17.000	4,23	15.100	4,18
	4	2.000	3,30	400	2,60	42.600	4,63
	5	700	2,85	300	2,48	5.400	3,73
	6	3.000	3,48	100	2,00	800	2,90
	7	200	2,30	200	2,30	800	2,90
Freezer	0	64.500	4,81	220.000	5,34	5.000	3,70
	1	7.000	3,85	600	2,78	100	2,00
	2	9.700	3,99	1.000	3,00	100	2,00
	3	79.000	4,90	1.000	3,00	100	2,00
	4	35.000	4,54	100	2,00	100	2,00
	5	62.000	4,79	500	2,70	300	2,48
	6	18.200	4,26	700	2,85	300	2,48
	7	18.200	4,26	900	2,95	300	2,48

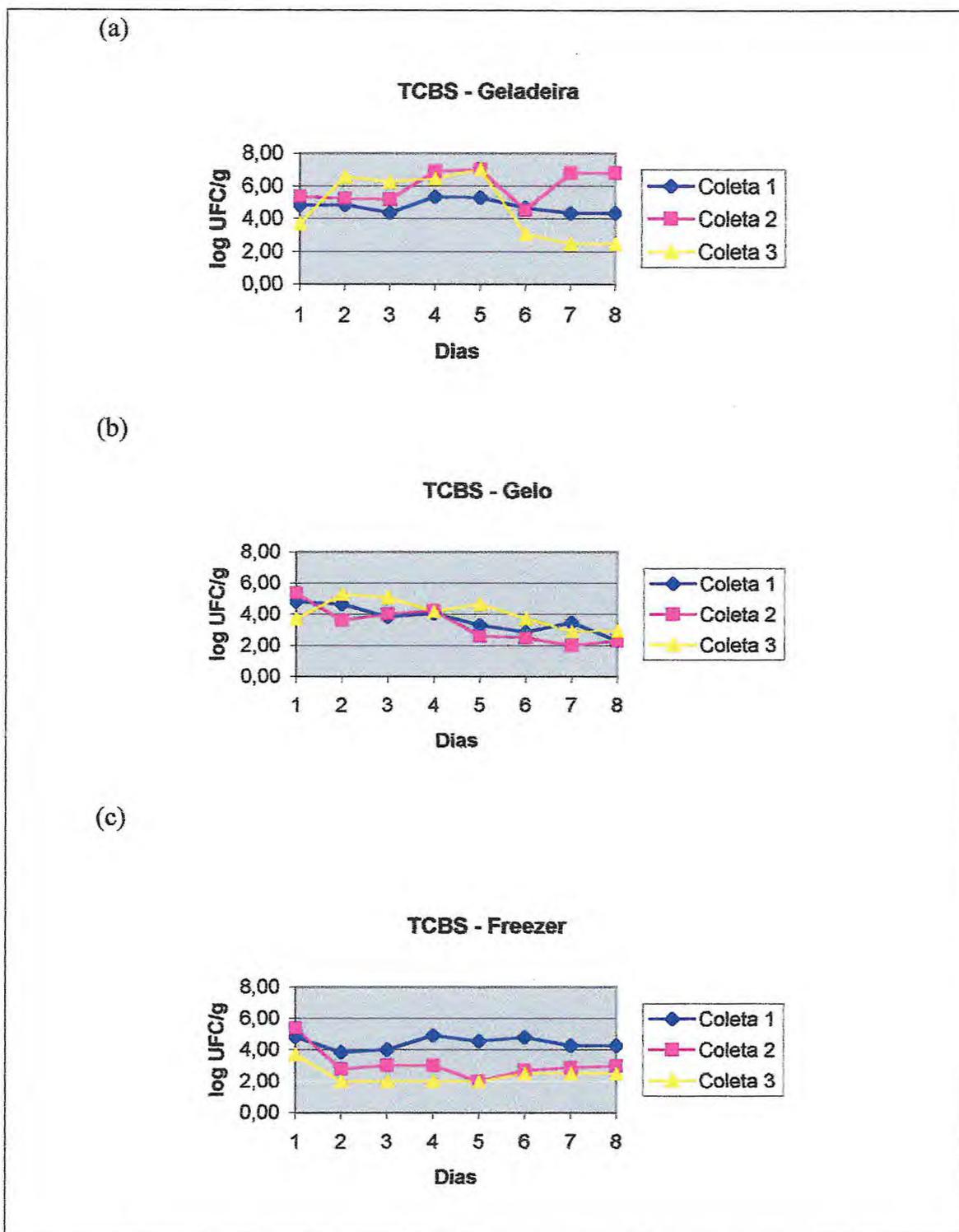


Figura 3- Curvas das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Tiosulfato Citrato-Bile Sacarose Ágar cada 24 horas, durante sete dias, a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, incubado em temperatura de geladeira (a), gelo (b) e freezer (c).

Tabela 2 - Resultados absolutos e logaritimizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Plate Count Ágar a partir do homogenato preparado com camarão, *Xiphopenaeus kroyeri*, estocado em diferentes temperaturas (12°C, 0°C e <-10°C) por um período de sete dias.

PCA	Dias	1ª Coleta		2ª Coleta		3ª Coleta	
		UFC/g	log	UFC/g	log	UFC/g	log
Gelo	0	6.680.000	6,82	18.800.000	7,27	22.000.000	7,34
	1	2.000.000	6,30	260.000	5,41	540.000	5,73
	2	2.820.000	6,45	2.000.000	6,30	4.120.000	6,61
	3	6.600.000	6,82	580.000	5,76	384.000	5,58
	4	440.000	5,64	960.000	5,98	2.800.000	6,45
	5	390.000	5,59	32.000	4,51	440.000	5,64
	6	334.000	5,52	100	2,00	2.940.000	6,47
	7	136.000	5,13	100	2,00	2.940.000	6,47
Geladeira	0	6.680.000	6,82	18.800.000	7,27	22.000.000	7,34
	1	120.000.000	8,08	8.400.000	6,92	5.600.000	6,75
	2	108.000.000	8,03	1.200.000.000	9,08	56.000.000	7,75
	3	120.000.000	8,08	88.000.000	7,94	58.000.000	7,76
	4	1.100.000	6,04	120.000.000	8,08	182.000.000	8,26
	5	1.300.000	6,11	3.200.000	6,51	94.000	4,97
	6	1.500.000	6,18	158.000.000	8,20	20.000	4,30
	7	1.500.000	6,18	158.000.000	8,20	20.000	4,30
Freezer	0	6.680.000	6,82	18.800.000	7,27	22.000.000	7,34
	1	3.080.000	6,49	360.000	5,56	50.000	4,70
	2	5.400.000	6,73	22.000	4,34	9.000	3,95
	3	4.580.000	6,66	28.000	4,45	10.000	4,00
	4	2.400.000	6,38	8.000	3,90	100	2,00
	5	1.320.000	6,12	46.000	4,66	14.000	4,15
	6	240.000	5,38	80.000	4,90	34.000	4,53
	7	4.580.000	6,66	120.000	5,08	34.000	4,53

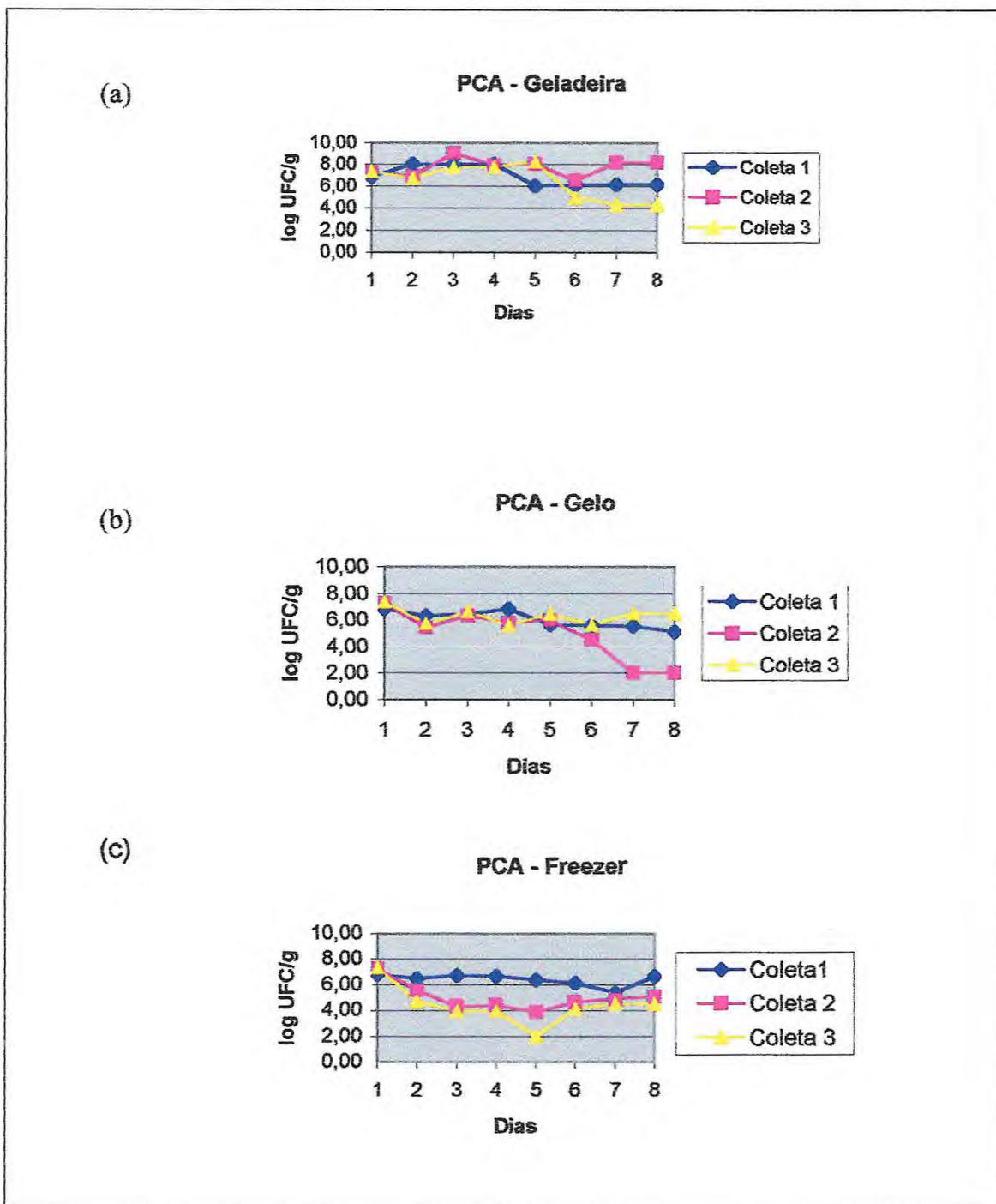


Figura 4 - Curvas das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em Plate Count Ágar cada 24 horas, durante sete dias, a partir do homogenato preparado com camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, incubado em temperatura de geladeira (a), gelo (b) e freezer (c).

4. DISCUSSÃO

No experimento piloto, após dez minutos de fervura do camarão, não foi possível a recuperação de nenhuma célula de *Vibrio parahaemolyticus* plaqueada em ágar TCBS, a partir do enriquecimento no meio de TSB. Assim, ficou estabelecido, que dez minutos é o tempo de eliminação da bactéria. A necessidade de se anular a microbiota de vibrio do camarão decorria da necessidade de se ter certeza de que a pesquisa da recuperabilidade das células da bactéria seria no caso da presente pesquisa a partir de um inóculo, conhecido.

Estudos realizados por FRANCO; LANDGRAF (1996) demonstraram que em amostras de homogeneizados de ostras aquecidos a 60°C e 80°C, poucos sobreviventes restaram após 15 minutos. Segundo os autores, quando a temperatura foi elevada para 100°C, nenhuma cepa foi recuperada .

Analisando-se a Tabela 1 e a Figura 3, pode-se comparar as contagens de *V. parahaemolyticus* nas diferentes temperaturas de estocagem. Constatase que o número de células do vibrio decresce nos primeiros dias, quando submetido a baixas temperaturas, tendendo a uma estabilidade a partir do sexto dia. Verifica-se também, que a recuperação de células viáveis foi mais eficiente nas temperaturas de geladeira (12°C), gelo (0°C) e freezer (<-10°C), em ordem decrescente.

É importante frisar que quando as placas foram incubadas em gelo, tanto nas inoculações em ágar TCBS quanto em ágar PCA, as reduções no número de células foram maiores que em qualquer outra temperatura de incubação. Isto significa dizer que o gelo é a mais deletéria das temperaturas para as células de *Vibrio parahaemolyticus*.

Segundo LEITÃO (1988), o crescimento de *V. parahaemolyticus* é bastante afetado pelas baixas temperaturas, sendo interrompido em temperaturas entre 5 e 8°C, embora possa sobreviver nestas condições; pode resistir tanto ao resfriamento como ao congelamento, sendo no entanto, bem mais sensível do que algumas enterobactérias, como por exemplo, *Escherichia coli*.

O experimento foi encerrado com sete dias e ainda havia células viáveis, o que está de acordo com a afirmação do autor, acima citado.

Os dados concordam com os encontrados por LISTON (1973), que isolou cepas de *V. parahaemolyticus* a partir de alimentos congelados. Este afirma que o *V. parahaemolyticus* é muito sensível a baixas temperaturas e que culturas morrem se forem conservadas em refrigerador. Esta sensibilidade parece ser maior à temperatura de 0°C. Em alimentos refrigerados e mantidos nestas temperaturas, a letalidade é maior que nos conservados sob congelamento.

Nenhuma das temperaturas utilizadas neste experimento foi efetiva na eliminação de *V. parahaemolyticus*.

Na Tabela 2 e Figura 4 pode-se observar o comportamento das curvas relacionadas com a recuperação das células de *V. parahaemolyticus*, em ágar PCA. As curvas apresentaram pontos mais elevados que aqueles obtidos quando o plaqueamento do homogenato foi feito em ágar TCBS. Levanta-se a hipótese de que o meio ágar PCA sendo não seletivo favoreceria o crescimento de algumas outras bactérias presentes no camarão e que teriam resistido à fervura. É importante frisar que o ágar TCBS é seletivo para vibrios, enquanto o ágar PCA é favorável ao crescimento de todas as bactérias sendo muito menos impediante que o TCBS, razão por que os números de UFC/g, em placas de PCA, são bem mais elevados do que aqueles encontrados em contagens em TCBS. Outra explicação para o fato é que o inóculo dos diferentes meios (TCBS e PCA) pode também ter interferido na elevação das curvas. O inóculo no meio de PCA foi maior do que no de TCBS. Entretanto as Tabelas 1 e 2 quando comparadas mostram que apesar desse fato, a falta de padronização do inóculo, é possível se verificar que a redução, no caso das incubações das placas de TCBS em gelo, em geral, é muito maior (dois ciclos logarítmicos) até o término do experimento, enquanto que, no caso da incubação em placas de ágar PCA foi de apenas um ciclo logarítmico.

LAMPRECHT (1980) trabalhando com caudas de lagostas inoculadas com *V. parahaemolyticus* e estocadas em -18°C, constatou que dependendo do inóculo, se leve ou pesado, a bactéria resistiria de uma semana a três meses.

A maior redução do número de bactérias ocorreu quando as placas de TCBS foram incubadas em temperatura de gelo (0°C) (Figura 3a, primeira semana) igualmente para PCA (Figura 4a, segunda semana).

Os resultados da presente pesquisa são comparáveis aos obtidos por VANDERZANT; NICKELSON (1972), que inocularam culturas de *V. parahaemolyticus* em camarões inteiros e estocaram a -18°C, de dois a dez dias. Células da bactéria foram detectadas após o oitavo dia.

É possível se verificar nas Tabelas 1 e 2 e nas Figuras 3 e 4 que houve, no geral, um aumento nas contagens de UFC/g de *V. parahaemolyticus* tanto em ágar TCBS como em ágar PCA nos dois primeiros dias, nas temperaturas de incubação em gelo e em refrigerador, o mesmo não acontecendo nas temperaturas de freezer. A tendência nesta temperatura foi, no primeiro instante, de redução, embora tenha sido a temperatura na qual as células de vibrios permaneceram, no final do experimento, em maior número quando comparado ao inóculo inicial.

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

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

Segundo SINGH et al (1989), a contagem de células viáveis é a medida do número de células capazes de se dividir e formar colônias. Por essa razão, a técnica de contagem em placa tem sido usada para determinação de viabilidade baseada no fato de que, quando uma suspensão é espalhada na superfície do meio, cada bactéria crescerá e produzirá uma colônia isolada (SINGH et. al. 1989). No entanto o resultado dessa contagem pode ser

subestimado devido a alguns problemas que podem estar associados com este método: longo tempo de incubação, estresse da célula impedindo-a de formar colônias, inóculo pequeno ou grande, etc.

Os resultados apresentados na presente pesquisa reforçam as informações contidas na literatura, de que a bactéria tanto resiste ao resfriamento quanto ao congelamento. No entanto, há uma tendência, observada durante todo o experimento de decréscimo no número de células, com o passar do tempo. Sendo *Vibrio parahaemolyticus* uma bactéria mesófila, e Fortaleza uma cidade onde a média de temperatura está em torno de 26 a 27°C, recomenda-se o resfriamento imediato do camarão e seu congelamento o mais rápido possível. Assim, se não forem eliminados, os problemas de contaminação do camarão sete-barbas por *V. parahaemolyticus*, serão pelo menos minimizados.

5. CONCLUSÕES

Mesmo sendo o *V. parahaemolyticus* sensível a baixas temperaturas foi constatada a viabilidade de células dessa bactéria por até sete dias de incubação nas temperaturas de geladeira (12°C), gelo (0°C) e freezer (<-10°C).

A RDC 12 (BRASIL, 2001) não exige limite para nenhum *Vibrio* em carne de crustáceo *in natura* que não são consumidos crus. Sabe-se que este gênero bacteriano é normal em pescado marinho e são conhecidas algumas espécies, inclusive *V. parahaemolyticus*, que causam gastroenterite, recomenda-se, pois, que a cocção dos animais seja bem feita, já que é o único método eficaz na eliminação dessa bactéria, e que não haja contato dos camarões cozidos, com nenhum recipiente que tenha entrado em contato com os crus, mesmo se este camarão tenha sido submetido a baixas temperaturas.

6. BIBLIOGRAFÍA

ASSOCIACIÓN Americana de Salud Pública (ASSP). **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre**. 15 ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 1992. (Publicación Científica n°538).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução – RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10/ janeiro/2001.

CASTELLO, J.P. Reflexões sobre a pesca no Brasil em 2002. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC)**, Recife, v. 5, n.1, p. 74, 2003.

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

CENTERS FOR INFECTIOUS DISEASES (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw and clams harvested from Long Island Sound – Connecticut, New Jersey, and New York, **MMWR**, v.48, n.43, p.48-51, 1999.

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

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

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSZM), 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M., **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo, Atheneu, p.68, 1996.

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

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

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

HOFFMAN, F. L. et al. Levantamento da qualidade higiênico-sanitária de pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto (SP). **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo; v. 13, p.45-48, Set. 1999.

HOFER, E.; SILVA, C. H. D. An evaluation of the efficiency of enrichment media in the isolation process for *Vibrio parahaemolyticus*. **Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. 1 ABT Orig. A.**, v.256, p.456-465, 1984.

Informativo Inspetor de Pescado. FAO/OMS: solicitação de informações sobre vibrios., Rio de Janeiro v.49, dez., 2000. Disponível em: <http://www.infopesca.org/inspetor/nump-49.htm>, Acesso em: 1, fev., 2003.

LAMPRECHT, E. C. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* during freezing. **J. Sci. Food Agric.** V.31, p.1309-1312, 1980.

LEITÃO, M. F. F. 1969/1970. Resistência térmica e caracterização de *Vibrio parahaemolyticus* por eletroforese em gel de sobrenadantes de culturas. **Tratado de Microbiologia. Colônia do ITAL, Campinas**, v.3, p.369-423, 1969/1970.

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

LIPP, E. K., ROSE, J. B. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. **Revue Scientifique et Technique de l'office International des Epizooties**, v. 16, n.2, p.620-640, 1997.

LISTON, J. V. P. In: CHICHESTER, C. O., GRAHAN, H. D. **Microbiol safety of fishery products**. New York, Academic Press, p.203, 1973.

MATTÊ, G. R. et al. Distribution of potencially pathogenic, Vibrios in oysters from a tropical region. **Journal of Food Protection, Des Moines**, v.57, n.10, p.870-873, 1994.

MUNTADA-GARRIGA, J. M., et al. Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. **Letters in applied microbial.** V.20, n.4, p.225-227, 1995.

NOLAN, C. H., et al. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis an outbreak associated with raw oysters in the Pacific northwest. **Diagn. Microbiol. Infect.** New York, v.2, n.2, p. 119-128, 1984.

NOVAK, S. M. Parasites associated with exotic food. **Clinical Microbial. Newsletter**, v. 18, n. 17, p.129-133, 1996.

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

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. São Paulo: Loyola, p.445, 1987.

SAKAZAKI, R. *Vibrio parahaemolyticus* as a food-spoilage organism. *Food Microbiology*, p.225-241, 1983.

SINGH, A., PYLE, B. H., Mc FETERS, G. A. Rapid enumeration of viable bacteria image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, v.10, p.91-101, Sep. 1989.

SLAVICA, J. et al. Occurrence of *Vibrio* spp. In sea shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/foodcont> Acesso em: 20, Nov, 2003.

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

THEOPHILO, G. N. D. **Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em caranguejos comercializados em Fortaleza – Ceará**. 1992. 122f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 1992.

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

VANDERZANT, C.; NICKELSON, R. Survival *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Applied. Microbiology*, v.23, p.37-43, 1972. VIEIRA, R. H. S. F. ***Vibrio parahaemolyticus* em amostras de caudas de lagostas *Panulirus laevicauda* (Latreille) obtidas na feira de pescados do Mucuripe e em uma indústria de pesca de Fortaleza, Ceará: determinação dos sorogrupos K e prova de Kanagawa a partir das cepas isoladas**. São Paulo: Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, 101f. (Tese de Doutorado).

VIEIRA, R. H. S. F. (Ed.), **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado: teoria e prática**. São Paulo. Ed Varela (2004).