

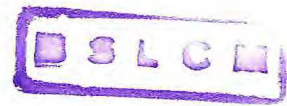
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

RAYZA LIMA ARAÚJO

*Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*)  
COMERCIALIZADAS EM FORTALEZA-CE, BRASIL



FORTALEZA  
2010



**RAYZA LIMA ARAÚJO**

***Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*)  
COMERCIALIZADAS EM FORTALEZA-CE, BRASIL**

Trabalho Supervisionado – Modalidade A –  
Monografia de Graduação submetida à  
Coordenação do Curso de Engenharia de  
Pesca, da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Engenheiro de Pesca.

Área de Concentração: Microbiologia do  
Pescado.

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

**FORTALEZA**  
**2010**

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)

---

A691v Araújo, Rayza Lima.  
Vibrio parahaemolyticus isolados de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas em Fortaleza-CE, Brasil / Rayza Lima Araújo. – 2010.  
33 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.  
Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Ostra. 2. *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Virulência. I. Título.

CDD 639.2

---



**RAYZA LIMA ARAÚJO**

***Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*)  
COMERCIALIZADAS EM FORTALEZA-CE, BRASIL**

Monografia de Graduação submetida à Coordenação do Curso de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro de Pesca. Área de Concentração de Microbiologia do Pescado.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profª. Dra. Oscarina Viana de Sousa  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Bióloga Renata Albuquerque Costa, M. Sc.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção.

Ao meu amado pai pelo exemplo diário de força, perseverança e humildade e por acreditar no meu potencial.

À minha querida mãe pela atenção, carinho, apoio e amizade dedicados durante minha graduação e pelas visitas adoráveis e valiosas.

À minha tia Olindina e meu primo Andrew, minha família em Fortaleza, pela presença e companhia nas horas alegres e difíceis e por me proporcionar um lar longe de casa.

À minha irmã pelas conversas alegres e intermináveis, apoio e amizade.

Ao Jesse pelo carinho e amor dedicados, pela ajuda valiosa nas minhas coletas e em tantos outros momentos e por ser meu porto seguro sempre que precisei.

À Renata que me ajudou e acompanhou durante todo o meu projeto e por quem tenho uma enorme admiração e carinho.

À Camilla Brandão pela valiosa amizade conquistada durante o período que me ajudou nas análises laboratoriais do meu projeto, tornando-se uma amiga muito especial.

Aos amigos que conheci no laboratório Alberto, Izabel, Rafael e Lorena pelas inúmeras conversas e momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado.

Aos amigos de faculdade e companheiros de idas e vindas do Labomar Lidiane, Tarciana e Germano pelas conversas, viagens, trabalhos e convivência durante esses cinco anos.

À minha orientadora Regine Vieira por despertar em mim o interesse pela microbiologia, por ser um grande exemplo de profissional e por ter me recebido no seu laboratório.

A todos do CEDECAM na pessoa da professora Tereza Cristina Gesteira; e do GEMB, em especial à Rachel, por me proporcionar o primeiro contato com a pesquisa e com as ostras.

## RESUMO

Bactérias do gênero *Vibrio* são associadas com surtos epidemiológicos devido ao consumo de ostras cruas. O presente estudo objetivou quantificar *Vibrio* total, sacarose positivo e negativo, isolar e identificar *V. parahaemolyticus* de ostras *in natura* e congeladas, comercializadas na Praia do Futuro em Fortaleza, além de determinar o perfil de virulência dessas cepas, através dos testes de Kanagawa e produção de urease. Foram analisadas 300 ostras: 150 comercializadas *in natura* e 150 congeladas. A quantificação foi feita através da Contagem Padrão em Placas e as cepas identificadas bioquimicamente. No teste de Kanagawa, utilizou-se Ágar Wagatsuma e a detecção de urease foi feita em caldo uréia contendo 1% de NaCl. As contagens de *Vibrio* para as ostras *in natura* variaram de 475 est a 36.000 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) g<sup>-1</sup> e nas congeladas houve variação de 400 est a 26.250 UFC g<sup>-1</sup>. Foram isoladas 39 cepas (48,8%) de *V. parahaemolyticus* das amostras de ostra *in natura*, sendo que 10,2% apresentaram-se como Kanagawa positivas e uma amostra (2,6%) foi positiva, concomitantemente, para os dois testes. Das ostras congeladas, isolou-se 49 cepas (69%) de *V. parahaemolyticus*, sendo 16,3% positivas para o teste de Kanagawa e apenas uma (2%) positiva para o teste de urease. Conclui-se que as ostras *in natura* possuíam uma microbiota de vibrio superior às ostras congeladas, entretanto as congeladas apresentaram um maior isolamento de *V. parahaemolyticus*. Ambas apresentaram cepas dessa bactéria Kanagawa e urease positivos. Os moluscos podem representar risco de doenças se consumidos sem cocção prévia.

Palavras-chave: Ostra. *Vibrio parahaemolyticus*. Virulência.

## ABSTRACT

*Vibrio* bacteria are associated with epidemiological outbreaks due to consumption of raw oysters. This study aimed to quantify total, sucrose positive and negative *Vibrio*, isolate and identify *V. parahaemolyticus* in fresh and frozen oysters, marketed in Praia do Futuro in Fortaleza, and to determine the virulence profile of these strains using Kanagawa and urease tests. It was analyzed 300 oysters: 150 marketed fresh and 150 frozen. Quantification was done by Standard Plates Counts and the strains were biochemically identified. In Kanagawa test was used Wagatsuma Agar and detection of urease was performed in urea broth containing 1% of NaCl. *Vibrio* counts for fresh oysters varied from 475 est to 36,000 CFU (Colonies Forming Units) g<sup>-1</sup> and for frozen oysters varied from 400 est to 26,250 CFU g<sup>-1</sup>. It was isolated 39 strains (48.8%) of *V. parahaemolyticus* of fresh oysters samples, and 10.2% were Kanagawa positive and a sample (2.6%) was positive, concomitantly, to the two tests. For frozen oysters it was isolated 49 strains (69%) of *V. parahaemolyticus*, 16.3% were positive for Kanagawa test and only one (2%) was positive for urease test. We conclude that fresh oysters had a *Vibrio* microbiota higher than the frozen, but frozen had the further isolation of *V. parahaemolyticus*. Both strains of these bacteria were urease and Kanagawa positive. So, mollusks can be a risk of illness if consumed without prior cooking.

Keywords: Oyster. *Vibrio parahaemolyticus*. Virulence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Amostra constituída por dez ostras comercializadas congeladas em Fortaleza-CE.	14
<b>Figura 2 -</b>	Fluxograma da quantificação de <i>Vibrio</i> total, <i>Vibrio</i> sacarose positivo e negativo em ostras “in natura” e congeladas.	16
<b>Figura 3 -</b>	Fluxograma do isolamento e identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de ostras “in natura” e congeladas.	18
<b>Figura 4 -</b>	Comparação da quantificação de <i>Vibrio</i> total (Vt), <i>Vibrio</i> sacarose positivo (Sac+) e <i>Vibrio</i> sacarose negativo (Sac-) em UFC g <sup>-1</sup> para amostras de ostras comercializadas “in natura” e congeladas em Fortaleza-CE.	25
<b>Figura 5 -</b>	Cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Kanagawa positivas isoladas de amostras de ostras comercializadas “in natura” em Fortaleza-CE.	28
<b>Figura 6 -</b>	Cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Kanagawa positivas isoladas de amostras de ostras comercializadas congeladas em Fortaleza-CE.	29
<b>Figura 7 -</b>	Cepa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Kanagawa e urease positiva isolada de ostras “in natura” (A); cepa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> urease positiva isolada de ostras congeladas (B).	29



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Quantificação de <i>Vibrio</i> total, <i>Vibrio</i> sacarose positivo (Sac+) e <i>Vibrio</i> sacarose negativo (Sac-) em UFC g <sup>-1</sup> e log <sub>10</sub> para amostras de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) comercializadas “in natura” em Fortaleza – CE.	23
<b>Tabela 2 -</b>	Quantificação de <i>Vibrio</i> total, <i>Vibrio</i> sacarose positivo (Sac+) e <i>Vibrio</i> sacarose negativo (Sac-) em UFC g <sup>-1</sup> e log <sub>10</sub> para amostras de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) comercializadas congeladas em Fortaleza – CE.	24
<b>Tabela 3 -</b>	Parâmetro ambiental (pH) e morfométrico (tamanho e peso total: líquido intervalval e parte mole) em amostras de ostras ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) comercializadas “in natura” e congeladas em Fortaleza – CE.	26
<b>Tabela 4 -</b>	Variáveis do teste estatístico entre a CPP de <i>Vibrio</i> total e <i>Vibrio</i> sacarose negativo em log <sub>10</sub> UFC g <sup>-1</sup> e o pH, altura (cm) e peso total (g) de ostras comercializadas “in natura” em Fortaleza-CE.	27
<b>Tabela 5 -</b>	Variáveis do teste estatístico entre a CPP de <i>Vibrio</i> total e <i>Vibrio</i> sacarose negativo em log <sub>10</sub> UFC g <sup>-1</sup> e o pH, altura (cm) e peso total (g) de ostras comercializadas congeladas em Fortaleza-CE.	27
<b>Tabela 6 -</b>	Número de cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isoladas de ostras comercializadas “in natura” e congeladas em Fortaleza-CE com fatores de virulência.	28

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	14
<b>2.1. Amostragem</b> .....	14
<b>2.2. Determinação do pH e parâmetros morfométricos</b> .....	14
<b>2.3. Preparação das amostras</b> .....	15
<b>2.4. Análises bacteriológicas</b> .....	15
2.4.1. Quantificação de <i>Vibrio</i> total e <i>Vibrio</i> sacarose positivo e negativo .....	15
2.4.2. Isolamento e identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	17
2.4.2.1. Hidrólise da arginina e descarboxilação da lisina e ornitina .....	19
2.4.2.2. Produção de Indol e de H <sub>2</sub> S .....	19
2.4.2.3. ONPG (o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo) .....	19
2.4.2.4. Manitol .....	20
2.4.2.5. Voges-Proskauer (VP) .....	20
2.4.2.6. D-glucosamina .....	20
2.4.2.7. Crescimento a 0 e 8% de NaCl .....	21
2.4.3. Determinação de fatores de virulência .....	21
2.4.3.1. Teste de Kanagawa .....	21
2.4.3.2. Teste de hidrólise da uréia.....	21
<b>2.5. Análises estatísticas</b> .....	22
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	23
<b>4. CONCLUSÃO</b>	31
<b>REFERÊNCIAS</b>	32

*Vibrio parahaemolyticus* ISOLADOS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*)  
COMERCIALIZADAS EM FORTALEZA-CE, BRASIL

RAYZA LIMA ARAÚJO

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de moluscos bivalves ocorre de maneira crescente em todas as regiões litorâneas do Brasil devido às riquezas dos recursos naturais do ecossistema aquático (PEREIRA; RODRIGUES; VIANA, 2007). A produção de ostras no Brasil tem demonstrado um crescimento bastante significativo, verificando-se um incremento de 22% da produção no país em 2004 (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008). No Brasil, principalmente no Nordeste, a maior parte da produção de moluscos bivalves é obtida de forma extrativa, a exemplo do estado do Ceará, onde os cultivos ainda são incipientes e não representam atividade econômica expressiva (PEREIRA et al., 1991).

De acordo com Mendes et al. (2004), as ostras extraídas do ambiente natural não são submetidas a um processo de sanitização adequado, além de serem consumidas cruas ou parcialmente cozidas. Soma-se a isso a característica biológica dos bivalves serem filtradores e reterem, conseqüentemente, vários organismos, patogênicos ou não, provenientes da água de captura dos moluscos. Dessa forma, há possibilidade de uma possível veiculação de microrganismos capazes de provocar doenças no consumidor desse tipo de pescado.

Dentre os microrganismos que ocorrem no pescado destacam-se as bactérias do gênero *Vibrio*, tendo sido isoladas do *habitat* marinho em várias zonas de clima temperado e tropical de todo o mundo (THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004). As bactérias do gênero *Vibrio* caracterizam-se como bacilos Gram negativos curvos, aeróbicos ou anaeróbios facultativos, geralmente halofílicos, e a maioria é capaz de fermentar glicose sem produção de gás. Os víbrios fazem parte da microbiota das ostras e sofrem influência sazonal, aumentando nos meses de verão (VIEIRA, 2004). Dentro desse gênero, a espécie de *Vibrio parahaemolyticus* destaca-se como enteropatógeno, estando associada a surtos epidêmicos após o consumo de moluscos bivalves crus ou mal cozidos (LIMA, 1997). Essa espécie vem sendo isolada de alimentos marinhos, na maioria das vezes, em níveis razoavelmente

elevados, cerca de  $10^3$  g<sup>-1</sup>; entretanto, nem todo *V. parahaemolyticus* é patogênico (PARVATHI et al., 2006).

Um dos principais fatores de virulência associados a essa espécie é a produção da Thermostable Direct Hemolysin (TDH), que pode ser detectada através da hemólise total dos eritrócitos humanos – teste de Kanagawa (WONG et al., 2000). Outro importante fator de patogenicidade relacionado à espécie é a produção da hemolisina TDH-related, conhecida como TRH (OKUDA et al., 1997), identificada devido à ocorrência de casos de gastroenterite causados por cepas de *V. parahaemolyticus* Kanagawa e TDH negativas (CABRERA-GARCIA; VASQUEZ-SALINAS; QUILONES-RAMIREZ, 2004). Essas hemolisinas (TDH e TRH) são codificadas pelos genes *tdh* e *trh* que têm aproximadamente 70% de sequências nucleotídicas similares (NISHIBUCHI et al., 1989). A ocorrência de cepas de *V. parahaemolyticus* TDH e TRH positivas oriundas de ambiente é muita baixa, menos de 1%, se comparada aos isolados clínicos, que podem apresentar até 95% de positividade para esses fatores de virulência (DEPAOLA et al., 2000).

A espécie de *Vibrio parahaemolyticus* constitui a principal causa de gastroenterite bacteriana associada ao consumo de frutos do mar nos Estados Unidos (MEAD et al., 1999) e, desde então, órgãos governamentais têm desenvolvido uma série de estratégias para evitar doenças causadas por moluscos contaminados. Essas medidas incluem o monitoramento da qualidade da água e de bactérias específicas, além da adoção de níveis máximos permitidos de *V. parahaemolyticus* em moluscos bivalves (DANIELS et al., 2000).

Outro importante fator de virulência associado ao *Vibrio parahaemolyticus* é a capacidade de hidrolisar uréia, que pode ser utilizada para determinar cepas potencialmente patogênicas (KAYSNER et al., 1994). Segundo Cai; Ni (1996) existe uma forte relação entre a presença do gene *trh* e o fenótipo urease positivo, reiterando a assertiva de que a presença da enzima pode ser utilizada como fator de virulência.

O consumo de ostra é responsável por incontáveis surtos epidêmicos, e um deles foi registrado no Alasca tendo como agente causador *V. parahaemolyticus* sorotipo O6:K18. Nesse evento, 62 pessoas foram hospitalizadas e, em dez, a bactéria foi confirmada em cultura (MC LAUGHLIN et al., 2005).

Outro estudo realizado no Rio de Janeiro avaliou a presença de *V. parahaemolyticus* em cinquenta amostras de moluscos bivalves marinhos compostas por quarenta ostras coletadas em quinze restaurantes da cidade e dez mexilhões capturados de banco natural em Ponta de Itaipu - Niterói. Os resultados apontaram elevada incidência da



bactéria em ostras comercializadas em restaurantes (PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2004).

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, 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 da área de origem (NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM, 1997). Quando provenientes de áreas aprovadas, os bivalves podem ser enviados diretamente para comercialização, mas quando oriundos de áreas restritas, a depuração é obrigatória, sendo vedada sua extração em áreas proibidas ou não classificadas.

Segundo Jacobi (2000), apesar desses procedimentos serem adotados internacionalmente, ainda não são observados no Brasil. Assim, a baixa qualidade da água dos estuários brasileiros, a falta da prática de depuração dos moluscos antes da comercialização e a estocagem indevida do produto concorrem para o aumento da sua carga microbiana que, aliada à forma de consumo *in natura* das ostras, são responsáveis pelos incontáveis surtos epidêmicos causados pela sua ingestão.

Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo quantificar *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo e *Vibrio* sacarose negativo de amostras de ostras comercializadas *in natura* e congeladas na Praia do Futuro em Fortaleza, isolar e identificar cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, além de determinar o perfil de virulência dessas cepas, através dos testes de Kanagawa e produção de urease.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostragem

Foram analisadas trinta amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, comercializadas nas formas *in natura* (n=15) e congeladas (n=15) obtidas em duas barracas da Praia do Futuro, região litorânea de Fortaleza-CE. As amostragens foram feitas no período de agosto de 2009 a agosto de 2010. Cada amostra foi constituída por dez ostras (Figura 1), perfazendo um total de 300 animais analisados, sendo as ostras *in natura* oriundas da Barraca A e as congeladas da Barraca B. Os exemplares de ostras com as valvas fechadas foram embalados em sacos plásticos, acondicionados em bolsa térmica e transportados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR/UFC), onde foram realizadas as análises microbiológicas. As ostras congeladas foram transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo. O período entre a coleta e a análise bacteriológica não excedeu duas horas.



Figura 1 – Amostra constituída por dez ostras comercializadas congeladas na Praia do Futuro em Fortaleza-CE.

### 2.2. Determinação do pH e parâmetros morfométricos

De cada amostra, foram determinados os parâmetros morfométricos: tamanho de cada ostra e seu peso total. O tamanho foi mensurado com emprego de um paquímetro digital

(Digimess) considerando a distância entre o umbo e a parte ventral da ostra. O peso total da amostra foi determinado em balança eletrônica semi-analítica (Quimis BG 2000), a partir da obtenção da massa visceral e do líquido intervalvar das dez ostras que constituíram cada amostra. A determinação do pH do homogenato, formado pela massa visceral e líquido intervalvar, foi feita com utilização de um pHmetro (Hanna instruments pH211).

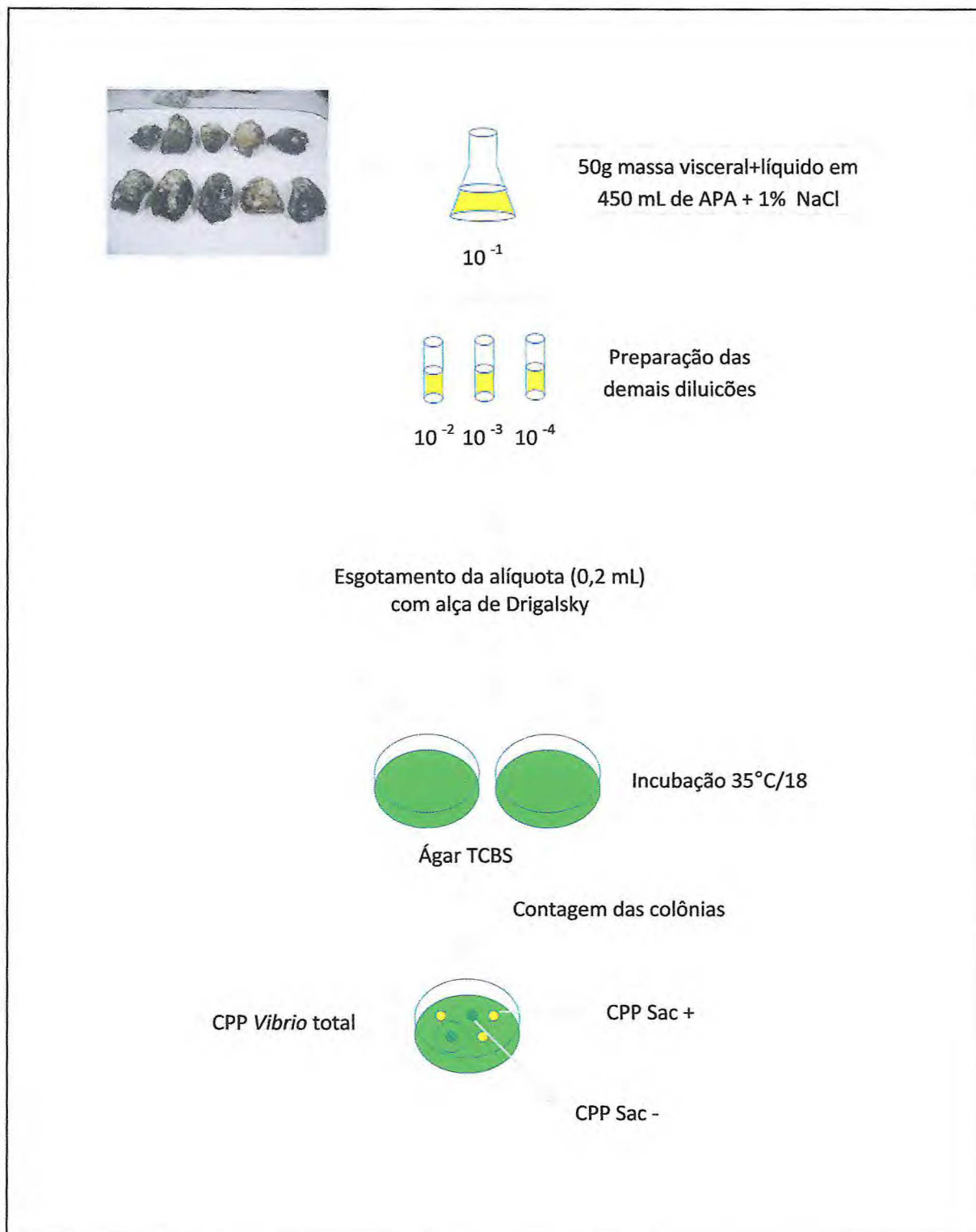
### 2.3. Preparação das amostras

As dez ostras de cada amostra foram lavadas vigorosamente em água corrente e abertas assepticamente para retirada da massa visceral e do líquido intervalvar, que foram macerados em gral previamente esterilizado. Em seguida, foram homogeneizados, em agitador magnético (Coler Parmer) por 15 minutos, 50 g do material macerado e 450 mL de água peptonada alcalina (APA pH 7,5) (Difco) contendo 1% de NaCl. Esse homogenato constituiu a diluição decimal seriada de  $10^{-1}$  a partir da qual foram preparadas as demais diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ , utilizando-se a proporção de 1:9.

### 2.4. Análises Bacteriológicas

#### 2.4.1. Quantificação de *Vibrio* total e *Vibrio* sacarose positivo e negativo

A quantificação de *Vibrio* total e *Vibrio* sacarose positivo e negativo foi feita pelo método de Contagem Padrão em Placas (CPP) conforme as recomendações de Downes; Ito (2001) (Fluxograma 1). De cada diluição foi retirada uma alíquota de 0,2 mL e semeada, em duplicata, pela técnica de espalhamento (*spread plate*) com utilização da alça de Drigalsky em placas contendo Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) (Difco), com incubação a 35°C/18 h. Para realização da contagem, foram escolhidas as placas das diluições que possuíam crescimento, no intervalo entre 25 e 250, de colônias sacarose positivas e negativas.



**Figura 2** – Fluxograma da quantificação de *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo e negativo em ostras *in natura* e congeladas.

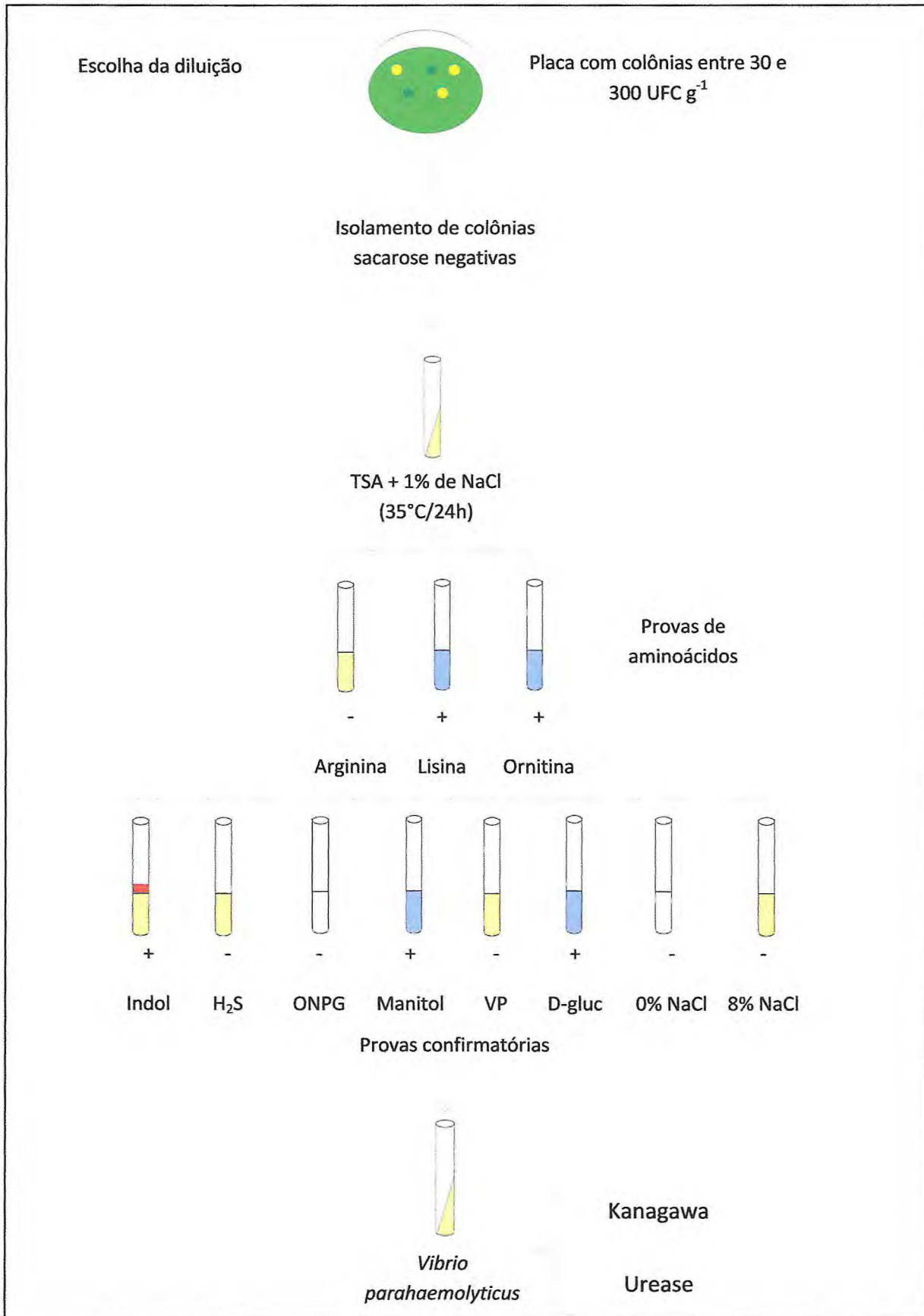


A determinação da CPP de *Vibrio* total foi feita pela multiplicação do número de colônias viáveis (UFC), pelo inverso do valor da diluição da placa selecionada e pelo fator de correção (cinco), sendo expresso em UFC g<sup>-1</sup>. Para a contagem de *Vibrio* sacarose positivo e negativo, foi utilizada a mesma fórmula da contagem de *Vibrio* total, com substituição da variável “número de colônias viáveis” pelo número de colônias sacarose positivas (CPP de *Vibrio* sac +) e sacarose negativas (CPP de *Vibrio* sac -).

#### 2.4.2. Isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

De cada coleta, foram isoladas, da diluição escolhida para a contagem, seis colônias sacarose negativas as quais foram inoculadas, separadamente, em tubos de Ágar Triptona Soja (TSA) (Difco) contendo 1% de NaCl. Posteriormente, esses tubos foram incubados a 35°C por 24 horas.

Do crescimento ocorrido no meio TSA foi realizada a identificação fenotípica de *V. parahaemolyticus* de acordo com esquema de Noguera; Blanch (2008), que recomenda as provas bioquímicas de hidrólise da arginina (A) e descarboxilação da lisina (L) e ornitina (O). As cepas que seguiram a chave A-/L+/O+ foram submetidas às provas de indol, produção de H<sub>2</sub>S, ONPG (o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo), manitol, Voges-Proskauer (VP), D-glucosamina e crescimento a 0% e 8% de NaCl (Figura 3).



**Figura 3** – Fluxograma do isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de ostras *in natura* e congeladas. ONPG: o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo. VP: Voges Proskauer. D-gluc: D-glucosamina.

#### 2.4.2.1. Hidrólise da arginina e descarboxilação da lisina e ornitina

As cepas foram inoculadas em tubos contendo meio Base Descarboxilase (Difco) acrescido de 1% de NaCl e 0,5% dos aminoácidos a serem testados (arginina, lisina e ornitina). O meio base, sem aminoácido, foi utilizado como controle. Os tubos foram incubados a 35°C por cinco dias, sendo examinados diariamente. A coloração púrpura do meio indicou a positividade do teste. Em caso negativo, a coloração do meio apresentou-se amarela, resultante da produção de produtos ácidos provenientes da fermentação da glicose presente no meio. Os tubos controle apresentaram coloração amarela.

#### 2.4.2.2. Produção de Indol e de H<sub>2</sub>S

Todas as cepas foram inoculadas com agulha de platina em tubos contendo Ágar Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) (Difco) e incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação foram adicionadas ao meio cinco gotas do reagente de Kovacs. A positividade do teste foi evidenciada pela formação de um halo vermelho. O resultado negativo foi caracterizado pela formação de um halo amarelo. Ainda no meio de cultivo SIM foi determinada a prova de produção de H<sub>2</sub>S com positividade evidenciada pelo escurecimento do meio.

#### 2.4.2.3. ONPG (o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo)

Todas as cepas em identificação foram inoculadas em tubos contendo 0,25 mL de salina estéril a 0,85% de NaCl, adicionou-se então uma gota de tolueno em cada tubo com posterior agitação. Os tubos foram incubados a 35°C por cinco minutos e, em seguida, adicionou-se 0,25 mL de solução tamponada de ONPG 13,3 mM. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C/24h. A mudança de coloração do meio de incolor para amarelo indicou a positividade do teste.

#### 2.4.2.4. Manitol

Uma alçada de cada cepa foi inoculada em tubos contendo caldo púrpura de bromocresol (meio basal) acrescido de 1% de NaCl e 0,5% de manitol, com incubação a 35°C por até sete dias. A positividade do teste foi indicada pela mudança de coloração do meio de púrpura para amarelo, devido à liberação de produtos ácidos derivados da fermentação do carboidrato.

#### 2.4.2.5. Voges-Proskauer (VP)

Todas as cepas em identificação foram inoculadas em tubos contendo caldo MR-VP (Difco) acrescido de 1% de NaCl, com incubação a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram adicionados, para cada mililitro do meio, 0,6 mL do reativo Barrit I ( $\alpha$ -naftol a 30%) e 0,2 mL do reativo Barrit II (KOH a 40%). Após agitação vigorosa, os tubos foram deixados em repouso por 15 a 30 minutos. A coloração rósea na superfície do meio indica positividade da prova.

#### 2.4.2.6. D-glucosamina

As cepas foram inoculadas em tubos contendo Caldo Púrpura de Bromocresol (meio basal) acrescido de 1% de NaCl e 0,5% de D-glucosamina, com incubação a 35°C por até sete dias. A positividade do teste foi indicada pela mudança de coloração do meio de púrpura para amarelo.

#### 2.4.2.7. Crescimento a 0 e 8% de NaCl

Uma alçada de cada cepa foi inoculada em tubos contendo Caldo Triptona a 1% e Caldo Triptona a 1% com adição de 8% de NaCl, com incubação a 35°C por 24 horas. A positividade dos testes foi indicada pela turvação do meio.

#### 2.4.3. Determinação de fatores de virulência

As cepas confirmadas como *V. parahaemolyticus* foram testadas quanto à presença de fatores de virulência através de dois testes fenotípicos:  $\beta$ -hemólise em Ágar Wagatsuma (Teste de Kanagawa) e produção de urease.

##### 2.4.3.1. Teste de Kanagawa

As cepas de *V. parahaemolyticus* foram inoculadas em placas contendo Ágar Wagatsuma enriquecido com 100 mL L<sup>-1</sup> de solução a 20% de hemácias desfibriladas de ovelhas, com incubação a 35°C/24h. A formação de um halo transparente indicou a positividade do teste.

##### 2.4.3.2. Teste de hidrólise da uréia

As cepas de *V. parahaemolyticus* foram inoculadas em Caldo Uréia (Difco) contendo 1% de NaCl. A incubação foi feita em estufa a 35°C por 24 horas. A positividade do teste foi caracterizada pela mudança de coloração do meio de amarelo para róseo.

## 2.5. Análises estatísticas

Realizou-se análise estatística para verificar a existência ou não de correlação entre as contagens de *Vibrio* total e *Vibrio* sacarose negativo e os respectivos valores de pH da ostra, tamanho da ostra (cm) e peso do homogenato (g) para as amostras de ostras comercializadas *in natura* e congeladas. Os dados foram submetidos à análise de variância a nível de significância ( $\alpha$ ) de 5%, tendo sido utilizado o programa estatístico Bio Estat 5.0. Nos casos em que a distribuição normal e a homocedasticidade não foram verificadas, os dados foram logaritmizados antes das análises.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da Contagem Padrão em Placas (CPP) de *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo e *Vibrio* sacarose negativo nas amostras de ostra *in natura* variaram de 475 est a 36.000 UFC g<sup>-1</sup>, 175 est a 22.500 UFC g<sup>-1</sup> e 225 est a 15.250 UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1). Em algumas coletas, não foram observadas contagens entre 25 e 250 colônias até mesmo nas placas de menores diluições, sendo utilizado nos resultados o valor estimado (UFC g<sup>-1</sup> est).

**Tabela 1** – Quantificação de *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo (Sac+) e *Vibrio* sacarose negativo (Sac-) em UFC g<sup>-1</sup> e log<sub>10</sub> para amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas *in natura* em Fortaleza – CE.

Amostra	n	<i>Vibrio</i> total		Sac +		Sac -	
		UFC g <sup>-1</sup>	log <sub>10</sub>	UFC g <sup>-1</sup>	log <sub>10</sub>	UFC g <sup>-1</sup>	log <sub>10</sub>
1	10	4.175	3,62	2.475	3,39	1.700	3,23
2	10	7.775	3,89	3.475	3,54	4.300	3,63
3	10	22.250	4,35	7.000	3,85	15.250	4,18
4	10	1.625	3,21	725	2,86	900	2,95
5	10	475 est	2,68	175 est	2,24	300 est	2,48
6	10	19.500	4,29	9.750	3,99	9.750	3,99
7	10	36.000	4,56	22.500	4,35	13.500	4,13
8	10	1.950	3,29	825	2,92	1.125	3,05
9	10	27.250	4,44	17.500	4,24	9.750	3,99
10	10	23.750	4,38	13.750	4,14	10.000	4,00
11	10	2.025	3,31	450	2,65	1.575	3,20
12	10	1.475	3,17	425	2,63	1.050	3,02
13	10	600 est	2,78	375 est	2,57	225 est	2,35
14	10	2.025	3,31	1.175	3,07	850	2,93
15	10	2.700	3,43	1.550	3,19	1.150	3,06
<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>10.238</b>	<b>3,65</b>	<b>5.477</b>	<b>3,31</b>	<b>4.762</b>	<b>3,35</b>
<b>DP</b>	<b>0</b>	<b>11.976,65</b>	<b>0,62</b>	<b>7.168,69</b>	<b>0,68</b>	<b>5.305,39</b>	<b>0,60</b>

\*n: número de ostras. DP: desvio padrão.

Vieira et al. (2010), em pesquisa sobre *Vibrio* da microbiota de ostras *Crassostrea rhizophorae* cultivadas no Estuário do Rio Pacoti (Ceará), obtiveram contagens superiores às do presente estudo, verificando valores máximos de 7,77; 7,61 e 7,49 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> de *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo e sacarose negativo, respectivamente. Essa diferença entre os índices pode ser decorrente da origem das ostras. As amostras da presente pesquisa foram obtidas de restaurantes, enquanto àquelas estudadas por Vieira et al. (2010) foram coletadas diretamente do ambiente de cultivo. Nesse sentido, Lee; Younger (2002) destacam que a concentração de contaminantes, incluindo os vibrios, em moluscos filtradores cultivados está

relacionada às condições meteorológicas, bem como à influência da contaminação antrópica na qualidade da água durante o tempo de permanência dos organismos no cultivo.

O órgão americano Food and Drug Administration (FDA) regula a extração de ostras e moluscos do ambiente dependendo da quantidade de *Vibrio parahaemolyticus* no músculo dos bivalves, sendo considerados impróprios para o consumo, ou seja, capazes de causar doenças no homem, àqueles animais que apresentam níveis do microrganismo maiores que 10.000 UFC g<sup>-1</sup> do músculo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1999). Segundo os autores, deve haver uma revisão quanto a esta orientação, já que amostras de ostras coletadas em áreas consideradas impróprias para a extração de moluscos, no Noroeste do Pacífico (1997), e em Oyster Bay (1998) apresentavam níveis de *V. parahaemolyticus* inferiores a 200 UFC g<sup>-1</sup>.

Os resultados referentes às contagens bacteriológicas das amostras de ostras congeladas encontram-se descritos na Tabela 2. Foi observada uma oscilação de 400 est a 26.250, 100 est a 10.000 e 175 est a 16.250 UFC g<sup>-1</sup> de *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo e *Vibrio* sacarose negativo, respectivamente.

**Tabela 2** – Quantificação de *Vibrio* total, *Vibrio* sacarose positivo (Sac+) e *Vibrio* sacarose negativo (Sac-) em UFC g<sup>-1</sup> e log<sub>10</sub> para amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas congeladas em Fortaleza – CE.

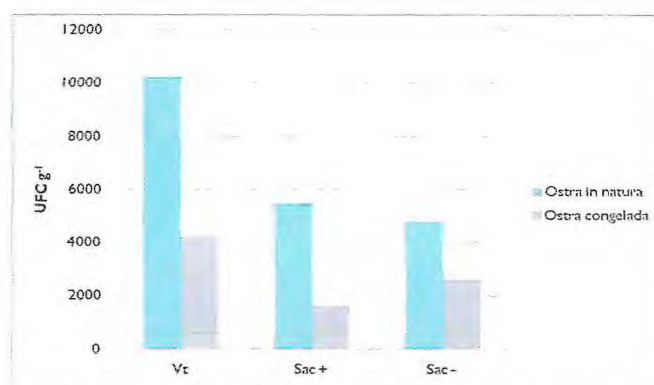
Amostra	n	<i>Vibrio</i> total		Sac +		Sac -	
		UFC g <sup>-1</sup>	log <sub>10</sub>	UFC g <sup>-1</sup>	log <sub>10</sub>	UFC g <sup>-1</sup>	log <sub>10</sub>
1	10	700 est	2,85	225 est	2,35	475 est	2,68
2	10	7.600	3,88	3.675	3,57	3.925	3,59
3	10	2.925	3,47	1.250	3,10	1.675	3,22
4	10	1.525	3,18	500	2,70	1.025	3,01
5	10	2.300	3,36	900	2,95	1.400	3,15
6	10	1.775	3,25	450	2,65	1.325	3,12
7	10	2.625	3,42	100	2,00	2.525	3,40
8	10	775 est	2,89	100 est	2,00	675 est	2,83
9	10	400 est	2,60	200 est	2,30	200 est	2,30
10	10	26.250	4,42	10.000	4,00	16.250	4,21
11	10	6.125	3,79	2.125	3,33	4.000	3,60
12	10	4.950	3,69	2.050	3,31	2.900	3,46
13	10	400 est	2,60	225 est	2,35	175 est	2,24
14	10	1.900	3,28	675	2,83	1.225	3,09
15	10	2.750	3,44	1.350	3,13	1.400	3,15
<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>4.200</b>	<b>3,34</b>	<b>1.588</b>	<b>2,84</b>	<b>2.612</b>	<b>3,14</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0</b>	<b>6.453,33</b>	<b>0,49</b>	<b>2.530,47</b>	<b>0,58</b>	<b>3.961,66</b>	<b>0,51</b>

\*n: número de ostras.



Os valores obtidos nas contagens das amostras de ostras congeladas foram inferiores aos da ostra *in natura* (Figura 4). Esse fato pode ser explicado pelo tipo de estocagem, uma vez que baixas temperaturas concorrem para diminuição de vibrios (SHEN et al., 2009). Lin; Roch-Chui; Cheng-Chun (2004) estudaram a susceptibilidade de *Vibrio parahaemolyticus* a baixas temperaturas (-5 e -18°C) e observaram que o decréscimo das células viáveis do microrganismo foi proporcional ao aumento do tempo de estocagem. Os autores sugerem que a diminuição na carga de vibrio está relacionada ao efeito prejudicial causado pela formação de cristais de gelo e pela concentração de solutos que ocorrem em temperatura de congelamento. Outrossim, Sousa (2007) observou um decaimento na carga de *V. parahaemolyticus* inoculados experimentalmente em camarão mantido em freezer a -21°C. O mesmo autor relatou a recuperação de *V. parahaemolyticus* até o oitavo dia de experimento, em contagens de 2,7 a 7,1 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>. Esses dados podem ser comparados aos do presente estudo, uma vez que mesmo havendo uma redução na carga bacteriana em relação às ostras *in natura*, ainda assim foi possível quantificar *Vibrio* em 100% das amostras dos moluscos congelados.

Outro fator que pode ter concorrido para diferença entre a quantificação de *Vibrio* em ostras *in natura* e congeladas foi a estocagem em meio ambiente. Pereira et al. (2007) alertam para o perigo da estocagem de ostras em temperatura ambiente posto que essa condição propicia uma multiplicação bacteriana no alimento e acelera sua decomposição, diminuindo seu prazo de validade.



**Figura 4** – Comparação da quantificação de *Vibrio* total (Vt), *Vibrio* sacarose positivo (Sac+) e *Vibrio* sacarose negativo (Sac-) em UFC g<sup>-1</sup> para amostras de ostras comercializadas *in natura* e congeladas em Fortaleza-CE.

A variação nas contagens de *Vibrio* entre as amostras de ostras congeladas pode estar relacionada com a diferença no período de estocagem uma vez que os moluscos foram

obtidos em diferentes intervalos de tempo. Segundo Russel (2002), as taxas metabólicas dos microrganismos infectantes de alimentos podem ser reduzidas quando estocados a baixas temperaturas, assim como a sua sobrevivência e habilidade de multiplicação. Assim, a aplicação de congelamento na estocagem de ostras para comercialização constitui um meio eficiente na redução de células viáveis de *Vibrio*.

Os valores relacionados aos parâmetros morfométricos e ao pH da massa visceral e líquido intervalvar encontram-se descritos na Tabela 3. Observou-se que os valores do pH das ostras *in natura* variaram de 6,35 a 6,86 e para as ostras congeladas houve uma oscilação de 6,51 a 6,79, com variação (desvio padrão) menor que 0,15 para os dois tipos de comercialização. Ostras *Crassostrea gigas* cultivadas em diferentes regiões da Baía Sul no Estado de Santa Catarina apresentaram pH médio de 6,1 (RAMOS, 2007), enquanto que monitorando a qualidade de ostras *C. gigas* cultivadas no Alaska, Estados Unidos, Oliveira et al. (2006) encontraram valores de pH para a carne do animal entre 6,6 e 6,9 com alteração menor que 0,4.

O tamanho das ostras analisadas variou de 7,15 a 8,74 cm para as amostras de ostras *in natura* e de 7,01 a 8,50 cm para as congeladas. Observou-se então, que os parâmetros morfométricos apresentaram maiores valores para as amostras de ostras comercializadas *in natura* (Tabela 3).

**Tabela 3** – Parâmetro ambiental (pH) e morfométrico (tamanho e peso total: líquido intervalvar e parte mole) em amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas *in natura* e congeladas em Fortaleza – CE.

Amostra	n	Ostras <i>in natura</i>			Ostras congeladas		
		pH	Tamanho (cm)	Peso total (g)	pH	Tamanho (cm)	Peso total (g)
1	10	--	7,15	80,00	6,67	7,36	90,88
2	10	6,86	7,36	95,58	6,63	7,59	113,86
3	10	6,86	7,69	96,21	6,79	8,25	99,32
4	10	6,59	8,19	97,89	6,51	8,10	101,72
5	10	6,50	7,98	100,7	6,69	7,84	89,60
6	10	6,35	7,58	103,34	--	7,62	97,14
7	10	6,36	7,67	118,48	6,66	8,50	103,13
8	10	6,71	8,74	118,21	6,73	7,56	80,00
9	10	6,63	8,7	146,02	--	7,01	66,91
10	10	6,56	8,18	116,53	6,67	7,38	81,49
11	10	6,56	7,93	149,95	--	7,25	55,35
12	10	6,54	8,05	114,10	6,56	7,21	85,80
13	10	6,44	8,11	106,18	6,67	7,36	90,88
14	10	6,62	7,75	97,14	6,63	7,59	113,86
15	10	6,54	7,44	109,00	6,79	8,25	99,32
<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>6,58</b>	<b>7,9</b>	<b>109,96</b>	<b>6,67</b>	<b>7,66</b>	<b>91,28</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0</b>	<b>0,154</b>	<b>0,453</b>	<b>18,610</b>	<b>0,082</b>	<b>0,439</b>	<b>15,98</b>

De acordo com a análise estatística realizada (Tabelas 4 e 5), não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as contagens de *Vibrio* total e *Vibrio* sacarose negativo e o pH, tamanho da ostra e peso do homogenato, já que não foram encontrados valores de  $p < 0,1$  e valores de  $r > 0,30$  tanto para as amostras de ostras *in natura* quanto para congeladas. De maneira geral, considera-se que não há relação entre as contagens de *Vibrio* e os parâmetros ambientais e morfométricos de ostras (VIEIRA et al., 2010).

**Tabela 4** – Variáveis do teste estatístico entre a CPP de *Vibrio* total e *Vibrio* sacarose negativo em  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  e o pH, tamanho (cm) e peso total (g) de ostras comercializadas *in natura* em Fortaleza-CE.

CPP	pH	Peso total (g)	Tamanho (cm)
<i>Vibrio</i> total	r = 0,0852 p = 0,7722	r = 0,1713 p = 0,5415	r = - 0,1155 p = 0,6818
<i>Vibrio</i> sacarose negativo	r = 0,1530 p = 0,6016	r = 0,1931 p = 0,4905	r = - 0,1136 p = 0,6869

**Tabela 5** – Variáveis do teste estatístico entre a CPP de *Vibrio* total e *Vibrio* sacarose negativo em  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  e o pH, tamanho (cm) e peso total (g) de ostras comercializadas congeladas em Fortaleza-CE.

CPP	pH	Peso total (g)	Tamanho (cm)
<i>Vibrio</i> total	r = - 0,0733 p = 0,8210	r = 0,0579 p = 0,8377	r = 0,1169 p = 0,6783
<i>Vibrio</i> sacarose negativo	r = - 0,0905 p = 0,7797	r = 0,0627 p = 0,8244	r = - 0,1736 p = 0,5360

A espécie de *Vibrio parahaemolyticus* foi isolada em aproximadamente 87% (n = 13) das amostras de ostras *in natura* e em 93% (n = 14) das amostras de ostras congeladas. DePaola et al. (2000) isolaram *V. parahaemolyticus* em 77% das amostras de ostras *in natura* obtidas de diferentes locais de comercialização no Estado de Washington, Estados Unidos. Fuenzalida et al. (2006) analisando ostras da costa sul do Chile em janeiro de 2004 e março de 2005, constataram que 53% dos exemplares apresentavam *V. parahaemolyticus*.

No presente estudo, das 83 cepas de *Vibrio* sacarose negativo isoladas das amostras de ostras *in natura*, 50,6% (39 cepas) foram confirmadas como *V. parahaemolyticus*. Das amostras de ostras congeladas foram isoladas 72 cepas de *Vibrio* sacarose negativo, sendo aproximadamente 68% (49 cepas) *V. parahaemolyticus*. Pereira et al. (2007) estudando a diversidade de víbrios em ostras comercializadas *in natura* no Rio de

Janeiro, isolaram 178 cepas de *Vibrio* sp., sendo que aproximadamente 45% destas correspondiam à espécie de *V. parahaemolyticus*.

Os resultados dos testes de virulência aplicados às cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de amostras de ostras comercializadas *in natura* e congeladas encontram-se na Tabela 6.

Entre as 39 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas das ostras *in natura*, aproximadamente 10% (quatro cepas) apresentaram-se Kanagawa positivas (Figura 5). Além dessas, uma amostra (2,6%) foi positiva, concomitantemente, para o teste de Kanagawa e urease (Figura 7A). Afora essa, nenhuma outra cepa apresentou positividade para o teste de urease.

Das 49 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de ostras congeladas, 16,3% foram positivas para o teste de Kanagawa (Figura 6) e apenas uma (2%) foi positiva para o teste de urease (Figura 7B). Não ocorreu nessas amostras, nenhuma cepa Kanagawa e urease positivas. Cook et al. (2002) sugerem que a capacidade de hidrolisar uréia é um indicativo da presença de TDH e, principalmente, de TRH. Sugere-se, então, que aproximadamente 2% das cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas no presente estudo são carreadoras de TRH, sendo uma minoria carreadora de TDH.

**Tabela 6** – Número de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de ostras comercializadas *in natura* e congeladas em Fortaleza-CE com fatores de virulência.

Fatores de virulência	Origem das cepas	
	Ostras <i>in natura</i> (n=39)	Ostras congeladas (n= 49)
Urease	0	1 (2%)
Kanagawa	4 (10,2%)	8 (16,3%)
Urease+Kanagawa	1 (2,6%)	0



**Figura 5** – Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivas isoladas de amostras de ostras comercializadas *in natura* em Fortaleza-CE.



**Figura 6** – Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivas isoladas de amostras de ostras comercializadas congeladas em Fortaleza-CE.



**Figura 7** – Cepa de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa e urease positiva isolada de ostras *in natura* (A); cepa de *Vibrio parahaemolyticus* urease positiva isolada de ostras congeladas (B).

No presente estudo, a quantidade de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* portadoras de fatores de virulência foi superior aos achados de Nishibuch; Kaper (1995) os quais detectaram o fenômeno Kanagawa em apenas 1 a 2% de cepas de *V. parahaemolyticus* oriundos de ambientes. DePaola et al. (2003) estudando exemplares de ostras coletados na costa do Alabama, Estados Unidos, detectaram a presença de aproximadamente 11,2% de cepas de *V. parahaemolyticus* tdh positivas. Kelly; Stroh (1989) analisando cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de amostras ambientais (ostra e água) e de pacientes com gastroenterite no noroeste do Pacífico, observaram que apenas 0,9% dos isolados de ostras eram Kanagawa positivas. O mesmo estudo ainda revelou que 8% dos isolados ambientais eram urease positivos e Kanagawa negativos, sugerindo-se que a expressão fenotípica do

fenômeno de Kanagawa não é obrigatória para a ocorrência de gastroenterite. Discordando, Sasaki (1983) ressalta que os níveis de *V. parahemolyticus* capazes de causar gastroenterite no homem é bastante variável, pois depende da quantidade de células do microrganismo e da presença de fatores de virulência e que mesmo em contagens consideradas pequenas esse microrganismo pode ser responsável por surto de gastroenterite.

#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a etapa de congelamento das ostras pode ter um efeito redutor sobre a densidade total da população de *Vibrio*, entretanto as ostras congeladas apresentaram um maior isolamento de *Vibrio parahaemolyticus*. As ostras comercializadas tanto *in natura* quanto congeladas apresentaram cepas dessa bactéria Kanagawa e urease positivas. Dessa forma, os moluscos podem representar risco de doenças se consumidos sem cocção prévia.

## REFERÊNCIAS

- CABRERA-GARCIA, M. E.; VASQUEZ-SALINAS, C.; QUILONES-RAMIREZ, E. I. Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of Gulf México. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 11, p. 6401-6406, nov. 2004.
- CAI, Y. L.; NI, X. Y. Purification, characterization and pathogenicity of urease produced by *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 10, n. 2, p. 70-73. 1996.
- COOK, D. W.; O'LEARY, P.; HUNSUCKER, J. C.; SLOAN, E. M.; BOWERS, J. C.; BLODGETT, R. J.; DEPAOLA, A. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U. S. retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999. **Journal of Food Protection**, New York, v. 65, n. 1, p. 79-87, jan. 2002.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound – Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 48, n. 3, p. 48-51, jan. 1999.
- DANIELS, N. A.; RAY, B.; EASTON, A.; MARANO, N.; KAHN, E.; MCSHAN, A. L.; ROSARIO, L.; BALDWIN, T.; KINGSLEY, M. A.; PUHR, N. D.; WELLS, J. G.; ÂNGULO, F. J. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. **Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 12, p. 1541-1545, sep. 2000.
- DEPAOLA, A.; KAYSNER, C. A.; BOWERS, J.; COOK, D. W. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). **Applied and environmental microbiology**, Washington, n. 66, v. 11, p. 4649-4654, nov. 2000.
- DEPAOLA, A.; NORDSTROM, J. L.; BOWERS, J. C.; WELLS, J. G.; COOK, D. W. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1521-1526, mar. 2003.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association. APHA, 4 ed. Washington, 2001.
- FUENZALIDA, L.; HERNÁNDEZ, C.; TORO, J.; RIOSECO, M. L.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 8, n. 4, p. 675-683, apr. 2006.
- JACOBI, P. R. **Ciência Ambiental: Os desafios da interdisciplinaridade**. São Paulo: Annablume-Fapesp, 2000. 388p.



KAYSNER, C. A.; ABEYTA, C.; TROST, P. A.; WETHERINGTON, J. H.; JINNEMAN, K. C.; HILL, W. E.; WEKELL, M. M. Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in the Pacific Northwest. **Applied and Environmental microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 3020-3022, aug. 1994.

KELLY, M. T.; STROH, E. M. D. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 12, p. 2820-2822, dec. 1989.

LEE, R. J.; YOUNGER, A. D. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 3-4, p. 177-183, oct. 2002.

LIMA, F.C. Vibrios marinhos: 1. *Vibrio parahaemolyticus*. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 47, p. 14-20, 1997.

LIN, C.; ROCH-CHUI, Y.; CHENG-CHUN, C. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 207-215, 2004.

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). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.83, p.44-48, 2001.

MC LAUGHLIN, J. B.; DePAOLA, A.; BOOP, C. A.; MARTINEK, K. A.; NAPOLILLI, N. P.; ALISSON, C. G.; MURRAY, S. L.; THOMPSON, E. C.; BIRD, M. M.; MIDDAUGH, J. P. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. **The New England Journal of Medicine**. Waltham, v. 353, n.14, p.1463-1470, oct. 2005.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCGAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRILFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emergency Infection Diseases**, v. 5, p. 607-625. 1999.

MENDES, E. S.; MENDES, P. P.; LOPES, C. A. M.; COELHO, M. I. S.; SOUZA, J. C. R.; CRUZ, M. C. S.; ASSIS, A. S. Sazonalidade dos microorganismos em ostras consumidas na Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116, p. 79-87, jan/fev. 2004.

NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. **Manual of operations: sanitation of the harvesting, processing and distribution of shellfish**. Washington, 1997. Part II.

NISHIBUCHI, M.; KAPER, J. B. Minireview – Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 6, p. 2093-2099, jun. 1995.

NISHIBUCHI, M.; TANIGUCHI, T.; MISAWA, T.; KHAEOMANEE-IAM, V.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Cloning and nucleotide sequence of the gene trh encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 2691-2697. 1989.

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio spp.* with a set of dichotomous keys. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n.1 p. 175-185, jan. 2008.

OKUDA, J; ISHIBASHI, M.; ABBOTT, S. L.; JANDA, J. M.; NISHIBUCHI, M. Analysis of the Thermostable Direct Hemolysin (tdh) gene and the tdh-Related Hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 1965-1971, aug. 1997.

OLIVEIRA, A. C. M.; HIMELBLOOM, B.; CRAPO, C. A.; VORHOLT, C.; FONG, Q.; RALONDE, R. Quality of alaskan maricultures oysters (*Crassostrea gigas*): a one-year survey. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. 532-543, 2006.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, 2008. 276p.

PARVATHI, A.; KUMAR, H.S.; BHANUMATHI, A.; ISHIBASHI, M.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Molecular characterization of thermostable direct hemolysin-related haemolysin (TRH)-positive *Vibrio parahaemolyticus* from oysters in Mangalore, India. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 8, n. 6, p. 997-1004, 2006.

PEREIRA, C. S.; RODRIGUES, D. P.; VIANA, C. M. Isolamento de *Vibrio spp.* em mexilhões (*Perna perna*) coletados na região de Ponta de Itaipu, Niterói, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 157, p. 94-97, dez. 2007.

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

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrios* patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 300-303, mai-jun, 2007.

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, 1991. 194p.

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

RUSSEL, N. J. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 27-34, 2002.

SAZAKI, R. *Vibrio parahaemolyticus* as a foodspoilage organism. In: ROSE, A. H. (Ed.) **Food microbiology**. New York: Academic Press, p. 225-241, 1983.

SHEN, X; CAI, Y.; LIU, C.; LIU, W.; HUI, Y.; SU, Y. Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea plicatula*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 129-132. 2009.

SOUSA, D. B. R. **Recuperação de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* inoculadas em camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, submetidas às temperaturas de resfriamento e congelamento**. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

THOMPSON, F. L; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of *Vibrios*. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 68, n. 3, p. 403-431, sept. 2004.

VIEIRA, R. H. S. F. Microbiota natural do pescado fresco. In: VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado**. São Paulo: Varela, p. 45-57, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F.; SOUSA, O. V.; COSTA, R. A.; THEOPHILO, G. N. D.; MACRAE, A.; FONTELES-FILHO, A. A.; RODRIGUES, D. P. Raw oysters can be a risk for infections. **Brazilian Journal Infection Disease**, v. 14, n. 1, p. 66-70, 2010.

WONG, H. C.; LIU, S. H.; WANG, T. K.; LEE, C. L.; CHIOU, C. S.; LIU, D. P. Characteristics of *Vibrio paraharmolyticus* O3:K6 from Asia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3981-3986, sept. 2000.