

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

“Contaminação do Molusco *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), por *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, na Região Norte da Baía de Todos os Santos – Bahia”.

Aláise Gil Guimarães
Bióloga – Msc. Microbiologia

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Aláise Gil Guimarães**, aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de Setembro de 2002.

Campinas, 17 de Setembro de 2002


Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, SP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
G947c
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 51349
PROC 16.837/02
C _____ X _____
PREÇO R\$11,00
DATA 25/10/02
INSCRIÇÃO _____

CM00175730-B

BIB ID 265406

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

G947c Guimarães, Aláise Gil
Contaminação do molusco *Anomalocardia brasiliiana*
(Gmelin, 1791), por *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*,
na Região Norte da Baía de Todos os Santos – Bahia / Aláise Gil
Guimarães. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

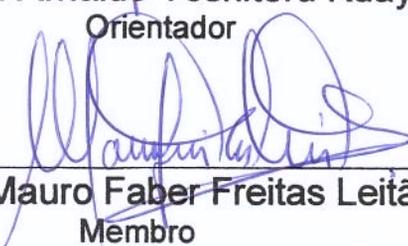
Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Vibrio parahaemolyticus*. 2. Molusco. 3. Bivalve. 4. Ácidos
orgânicos. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

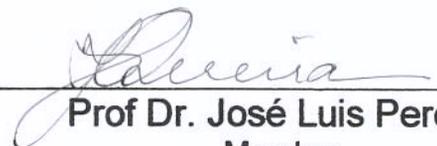
BANCA EXAMINADORA



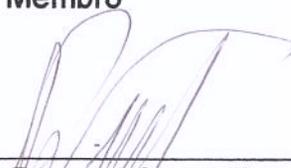
Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador



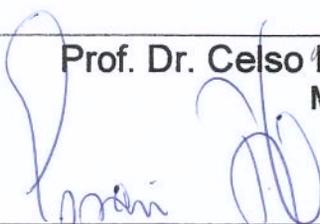
Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão
Membro



Prof. Dr. José Luis Pereira
Membro



Prof. Dr. Celso Duarte Carvalho Filho
Membro



Prof. Dr. Ernani Porto
Membro

Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria
Membro

Prof^a Dr^a Emiko Shinozaki Mendes
Membro

200250161

Aos meus pais

Zacarias e Adelina, as sementes

e razão pela qual cheguei até aqui.

*Ao André Guilherme e Livia elos de amor dos quais me orgulho.
Cujo amor, carinho, compreensão e incentivo, permitiram o meu
desenvolvimento profissional,
apesar das horas roubadas do convívio familiar.*

*Ao Eugênio por sempre em nossas vidas termos unido
Amor, amizade e cumplicidade,
e assim crescemos juntos
tanto pessoal quanto profissionalmente.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de fé e força para completar mais este desafio.

Ao Prof. Arnaldo, pela orientação, disponibilidade, confiança em mim depositada, pelo apoio e pela amizade.

À Dona Tite, pela acolhida, apoio e convívio durante nossa estada em Campinas e Morungaba.

Ao Adilson e Martine, pelo auxílio incondicional, especialmente nas horas mais difíceis.

À Bahia Pesca S/A, na pessoa do Dr. Marcos Rocha pelo apoio e obtenção dos meios de cultura e reagentes.

A todas as Mariscadeiras de Salinas da Margarida - BA, em especial a Dna. Maria pela receptividade e pelo auxílio durante as colheitas.

À Irmã Raquel de Oliveira Leal e Jussara Oliveira pelo apoio, carinho e amizade durante todo nosso período de colheita e pelo valioso material fornecido sobre Salinas da Margarida.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia – UFBA, principalmente através de sua coordenadora a Profª Clícia, pela possibilidade de conduzir este trabalho com toda a infraestrutura e pelo agradável convívio.

À Emília, pela colaboração interessada e de maneira responsável com que ajudou na elaboração dos meios de cultura e nas “incansáveis” séries bioquímicas e os bons momentos compartilhados.

Ao Bruno, pela colaboração na execução do tratamento estatístico dos dados.

Ao André Guilherme e a Mônica pelo auxílio na parte de informática e a Livia pelo suporte na tradução.

Aos amigos da FEA, Dirce, Raquel, Dna. Jacinta, Renata, Maria Helena, Cida, Edmar, Valéria, Ana Paola, Pedro e Graziela pelo companheirismo, e agradável convivência. Sem deixar de mencionar o grande auxílio que muitos de vocês prestaram à distância.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FFAR-UFBA, Patrícia, Matilde, Marinalva, Dona Raimunda, Manoel, Tatiana, Fernanda, e todas as estagiárias pela ajuda durante a realização deste trabalho, pelo carinho e pela amizade.

A todos do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia – UFBA, em especial à Prof.^a Mara e Prof.^a Rose pela colaboração e gentileza na execução das análises físico - químicas.

A todos os amigos e Professores da Faculdade de Farmácia – UFBA em especial aqueles do Departamento de Análises Bromatológicas, pelo apoio, incentivo e saudável convívio.

À banca examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas.

À Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro pela doação das cepas de *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante os anos de 1994 e 1995.

À CAPES, através do Plano Institucional de Capacitação de Docentes (PICD), pela bolsa durante o ano de 2000.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. O Material de Estudo	05
2.1.1. <i>Anomalocardia brasiliiana</i> (Gmelin, 1791).	05
2.2. O Ambiente de Estudo	08
2.2.1. Salinas da Margarida	08
2.2.2. O Meio Físico.	19
2.3. O Gênero <i>Vibrio</i>	19
2.3.1. <i>V. cholerae</i>	20
2.3.2. <i>V. mimicus</i>	20
2.3.3. <i>V. hollisae</i>	21
2.3.4. <i>V. furnissi</i>	21
2.3.5. <i>V. vulnificus</i>	21
2.3.5.1. Histórico	21
2.3.5.2. Infecções Humanas	22
2.3.5.3. Fatores de Virulência	24
2.3.5.4. Aspectos Ecológicos	27
2.3.5.5. <i>V. vulnificus</i> no Brasil	30
2.3.5.6. Isolamento e Identificação	31
2.3.5.7. Controle de <i>V. vulnificus</i> em Alimentos	35
2.3.6. <i>V. parahaemolyticus</i>	37
2.3.6.1. Considerações Gerais	37
2.3.6.2. Características Morfofisiológicas e Bioquímicas	37
2.3.6.3. A Doença no Homem	38
2.3.6.4. Aspectos Epidemiológicos e Ecológicos	39

2.3.6.5.	<i>V.parahaemolyticus</i> no Brasil	43
2.3.6.6.	Aspectos Relacionados à Patogenicidade	46
2.3.6.7.	Isolamento e Identificação	48
2.3.6.8.	Controle de <i>V. parahaemolyticus</i> em Alimentos	49
3.	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1.	Avaliação Microbiológica	53
3.1.1.	Amostragem dos Moluscos	53
3.1.2.	Amostragem da Água do Mar	53
3.1.3.	Amostragem do Sedimento.	57
3.2.	Preparo das Amostras	57
3.3.	Isolamento e Identificação de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V.vulnificus</i>	57
3.3.1.	Enriquecimento	57
3.3.2.	Plaqueamento diferencial	57
3.3.3.	Confirmação preliminar	58
3.3.4.	Confirmação definitiva	59
3.4.	Teste de Kanagawa	64
3.5.	Caracterização Bromatológica do Molusco	64
3.5.1.	Preparo das Amostras do Molusco	64
3.5.2.	Análises Físico – Químicas	64
3.6.	Análise Estatística	65
3.7.	Utilização de Ácidos Orgânicos no Controle de <i>V. parahaemolyticus</i>	65
3.7.1.	Preparo do Inóculo	65
3.7.2.	Preparo das Amostras e Inoculação	66
3.7.3.	Tratamento com Vinagre e Suco de Limão	66
3.7.4.	Determinação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	66
3.7.5.	Análises Físico-Químicas	67

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1. Características Bromatológicas de <i>Anomalocardia brasiliiana</i>	68
4.2. Análises Microbiológicas	70
4.2.1. NMP de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> em <i>A. brasiliiana</i>	70
4.2.2. NMP de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> no sedimento.	72
4.2.3. MP de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> na água do mar	73
4.2.4. Frequência de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> em chumbinho, sedimento e na água do mar.	76
4.2.5. Relação entre os Parâmetros do Ambiente e o Isolamento de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i>	80
4.3. Teste de Kanagawa	87
4.4. Avaliação dos Tratamentos com os Ácidos Orgânicos Utilizados.	87
5. CONCLUSÕES	97
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 Características físico-químicas e valor calórico do bivalve comestível <i>Anomalocardia brasiliiana</i> , cru, obtido na cidade de Salinas da Margarida –BA, 2001.	68
TABELA 2 Número Mais Provável (NMP/g) de <i>V.parahaemolyticus</i> e <i>V.vulnificus</i> isolados de amostras de chumbinho (<i>Anomalocardia brasiliiana</i>) obtidos nas praias de Salinas da Margarida-BA, frente a dois diferentes meios de isolamento,2001.	71
TABELA 3 Número Mais Provável(NMP/g) de <i>V.parahaemolyticus</i> e <i>V.vulnificus</i> isolados de amostras de sedimento obtidos nas praias de Salinas da Margarida-BA, frente a dois diferentes meios de isolamento, 2001.	74
TABELA 4 Número Mais Provável (NMP/mL) de <i>V.parahaemolyticus</i> e <i>V.vulnificus</i> isolados de amostras de água do mar obtidos nas praias de Salinas da Margarida-BA, frente a dois diferentes meios de isolamento, 2001.	75
TABELA 5 Frequência de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V.vulnificus</i> em chumbinho, sedimento e água do mar colhidas em Salinas da Margarida-BA,2001.	76
TABELA 6 Valores individuais por colheita, média, mediana e desvio padrão das variáveis do ambiente: salinidade, temperatura e pH analisados de amostras de água do mar obtidas nas praias de Salinas da Margarida –BA, 2001.	82
TABELA 7 Coeficiente de correlação entre os diferentes parâmetros obtidos nas colheitas em praias do Município de Salinas da Margarida-BA, 2001.	83
TABELA 8 Contagem inicial e NMP final de <i>V.parahaemolyticus</i> em chumbinho inoculados artificialmente, após tratamento com dois tipos de vinagre e suco de limão. Salvador-BA, 2001.	88

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURAS 1 e 2 Aspectos do mangue arbóreo na região das praias de Salinas da Margarida-BA.	09
FIGURA 3 Local de amostragem, Município de Salinas da Margarida-BA.	13
FIGURA 4 Mulheres “mariscando” em banco natural de <i>Anomalocardia brasiliiana</i> das praias do Município de Salinas da Margarida – BA.	17
FIGURA 5 Acúmulo de cascas de <i>Anomalocardia brasiliiana</i> em frente as residências no Município de Salinas da Margarida – BA.	17
FIGURA 6 Aspecto externo do molusco bivalve <i>Anomalocardia brasiliiana</i> .	55
FIGURA 7 Aspecto interno do molusco bivalve <i>Anomalocardia brasiliiana</i>	55
FIGURA 8 Esquema da metodologia utilizada para o isolamento de <i>V.parahaemolyticus</i> e <i>V.vulnificus</i> em chumbinho e sedimento.	61
FIGURA 9 Porcentagem da ocorrência mensal de <i>V.parahaemolyticus</i> em amostras de chumbinho, sedimento e água do mar.	78
FIGURA 10 Porcentagem da ocorrência de <i>V.parahaemolyticus</i> , valores de temperatura e salinidade em amostras de <i>Anomalocardia brasiliiana</i> colhidas durante o período de abril de 2000 a março de 2001, nas praias de Salinas da Margarida-BA.	84
FIGURA 11 Porcentagem da ocorrência de <i>V.parahaemolyticus</i> , valores de temperatura e salinidade em amostras de sedimento, colhidas durante o período de abril de 2000 a março de 2001, nas praias de Salinas da Margarida-BA.	85

		Pág.
FIGURA 12	Porcentagem da ocorrência de <i>V.parahaemolyticus</i> , valores de temperatura e salinidade em amostras de água do mar colhidas no período de abril de 2000 a março de 2001, nas praias de Salinas da Margarida-BA.	86
FIGURA 13	Colheita de <i>Anomalocardia brasiliiana</i> nas praias de Salinas da Margarida-BA.	91
FIGURA 14	Chumbinho (<i>Anomalocardia brasiliiana</i>) colhido nas praias de Salinas da Margarida –BA.	91
FIGURA 15	Marisqueira voltando do trabalho.	93

LISTA DE QUADRO

	Pág.
QUADRO 1 Principais características bioquímicas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i> .	63

RESUMO

A costa do litoral baiano é considerada uma das mais férteis da costa brasileira, levando-se em consideração a extensa faixa de litoral, pois ela é capaz de gerar a maior proliferação de vida marinha com uma grande quantidade de peixes, crustáceos e moluscos. Por essa razão, a população costeira tem sua subsistência alimentar e econômica vinculada ao extrativismo de frutos do mar, destacando-se entre eles o molusco bivalve comestível *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin 1791), popularmente conhecido na região como “chumbinho”, que é extremamente apreciado pela culinária baiana. Com o objetivo de pesquisar a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, 31 amostras de *A. brasiliiana*, de água do mar e de sedimento foram coletados de abril de 2000 a março de 2001, nas praias do município de Salinas da Margarida, região norte da Baía de Todos os Santos-BA. As amostras foram avaliadas quanto ao Número Mais Provável (NMP) de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* sendo as colônias sugestivas identificadas presuntivamente em meio de Tríplice Açúcar e Ferro (TSI), e a confirmação realizada através dos testes bioquímicos complementares. O Número Mais Provável (NMP/g) de *V. parahaemolyticus* nas amostras de “chumbinho”, sedimento e água do mar variou de <3 a $1,1 \times 10^3$, <3 a 93 e $<0,3$ a 4,3 respectivamente. O Número Mais Provável de *V. vulnificus* para as amostras de “chumbinho”, foram de <3 a 3 e de $<0,3$ a 0,4 para a água do mar e abaixo do limite de detecção do método para as amostras de sedimento. A frequência de amostras de “chumbinho”, sedimento e água do mar positivas para *V. parahaemolyticus* foi de 64,5%, 77,4% e 64,5%, respectivamente, enquanto que para o *V. vulnificus* foi de 3,2% para “chumbinho” e de 6,4% para a água do mar. Não se observou correlação entre as variáveis do ambiente (salinidade, temperatura e pH), com o isolamento dos microrganismos estudados constatou-se a ausência da influência da sazonalidade sobre a frequência de *V. parahaemolyticus*. Todas as cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas submetidas ao teste de Kanagawa apresentaram resultados negativos. A utilização de vinagre e de suco de limão mostrou-se eficiente na redução do número inicial de *V. parahaemolyticus* em *A. brasiliiana* artificialmente contaminado. Em virtude da

cidade de Salinas da Margarida ser uma das maiores fornecedoras de “chumbinho” e conhecendo a maneira com que os mesmos são comercializados, é importante e necessária a implantação de Boas Práticas de Produção, tendo como objetivo a qualidade desse molusco e a garantia da saúde dos consumidores.

Summary

The Bahia State – Brazil coastline is considered one of the most fertile of the Brazilian coast, taking consideration the extensive seaboard, therefore it is capable to generate the most proliferation of sea life with a great amount of fishes, crustaceans and clams. For this the coastal population has its alimentary and economic subsistence associated to the extractives of seafood. Among the mussels the *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) is popularly known as “chumbinho”, can be detected between the bivalve mollusks and is particularly appreciated by the bahian cuisine to investigate the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*, thirty one samples of the *Anomalocardia brasiliiana*, seawater and sediment were collected from April of 2000 to March of 2001, in the beaches of the city of Salinas da Margarida, north region of the Baía de Todos os Santos – Bahia. The Most Probable Number (MPN) were used to quantify *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in samples and the suggestive colonies were presumptively identified in Triple Sugar and Iron Medium (TSI), and the confirmation was carried through the biochemical tests. The determination of the Most Probable Number (1/g or 1/mL) of *V. parahaemolyticus* varied from <3 to $1,1 \times 10^3$ for “chumbinho”, <3 to 93 for sediment and between <0,3 to 4,3 for seawater samples, while the MPN (1/g or 1/mL) of *V. vulnificus* were between <3 to 3 for “chumbinho” and <0,3 to 0,4 for seawater; in the sediment samples this bacteria wasn't quantified. The frequency of *V. parahaemolyticus* in “chumbinho”, sediment and seawater was 64,5%, 77,4% and 64,5% respectively, while for *V. vulnificus* it was 3,2% in “chumbinho” and 6,4% in seawater. Statistically were not found correlations between the environmental variable (salinity, temperature and pH) and the presence of the microorganisms, as well as the seasonal variation. The efficiency of vinegar and lemon juice in the reduction of *V. parahaemolyticus* in artificially contaminated was shown. Due to the fact that the town of Salinas da Margarida be one of the major provider of “chumbinho” and knowing the way that they are commercialized, it is important and necessary the implementation of good manufacture practices, aiming the quality of the mollusks and guarantee of the consumers health.

1- INTRODUÇÃO

O Brasil possui aproximadamente nove mil quilômetros de costa com um mar tipicamente tropical, mas pouco se conhece sobre a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* neste ambiente marinho, sendo que a interação ecológica existente entre a população microbiana presente neste meio e os seus animais representa as condições que influenciam a qualidade sanitária dos alimentos originários deste ambiente.

Algumas bactérias são próprias das coleções naturais de água, outras são organismos transitórios que podem ser oriundos de processos industriais e domésticos. As águas normalmente não apresentam microrganismos patogênicos ao homem, contudo alguns são autóctones de ambientes marinhos e dentre estes se destacam alguns microrganismos do gênero *Vibrio*.

Nas últimas três décadas vários estudos epidemiológicos e ecológicos demonstraram que microrganismos do gênero *Vibrio*, isolados do ambiente marinho, são os agentes etiológicos de inúmeros surtos de enfermidade de origem alimentar como gastroenterites e septicemias, sendo às vezes fatais em indivíduos susceptíveis.

O molusco bivalve, como é o caso do *Anomalocardia brasiliiana*, é conhecido popularmente como chumbinho, vôngole, berbigão dentre outras denominações, a depender da região geográfica. São utilizados como “organismos sentinelas do ambiente” devido ao seu mecanismo de alimentação que é feito através de filtração onde acumulam bactérias, vírus, resíduos, metais pesados e hidrocarbonetos em seu interior, fornecendo assim informações relacionadas ao ambiente.

Se considerarmos a longa faixa do litoral baiano que expõe um elevado contingente de nossa população ao contato com o ambiente marinho e favorecendo o consumo de frutos do mar como peixes, crustáceos e os moluscos bivalves, pode-se calcular um risco maior de se contrair infecções causadas por

Vibrio parahaemolyticus e *Vibrio vulnificus* e portanto, obter informações sobre a ocorrência destes no ambiente marinho é de fundamental importância.

Os frutos do mar do litoral do Estado da Bahia exercem uma grande influência nos hábitos da população, principalmente através da culinária peculiar como moquecas, bobós, ensopados e frigideiras, todos estes pratos utilizando os produtos do mar como os moluscos bivalves, crustáceos, dentre outros, além de propiciar um contato direto com as águas marinhas e estuarinas.

Levando-se em consideração toda a literatura consultada, evidencia-se a importância da água do mar, dos sedimentos, moluscos e crustáceos, como veículos de transmissão de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* e da carência, no Estado da Bahia, de investigações sobre a ocorrência destes microrganismos no ecossistema marinho, visto que, apesar da falta de levantamento epidemiológico, observa-se com relativa frequência, relatos de casos de gastroenterite após a ingestão de frutos do mar o que eleva a importância do controle de *Vibrios* spp em alimentos de origem marinha. A verdadeira incidência de doença transmitida por alimento marinho não é conhecida, principalmente devido a ausência de exames de diagnóstico de rotina para estes agentes nos serviços de saúde.

No local de coleta, pode-se observar que os moluscos são processados para a comercialização domiciliarmente, de maneira artesanal, sem as condições mínimas de higiene necessárias. Segundo pesquisa realizada em 1997 pela Associação das Mariscadeiras de Salinas da Margarida, somente 47% das residências possuía refrigerador, 25% não possuía água encanada e 96% não desfrutava de uma rede de esgoto.

Portanto, torna-se necessária uma avaliação das condições de comercialização desses alimentos, bem como de medidas que procurem esclarecer aos consumidores sobre os possíveis riscos a que estão expostos se ingerirem esses alimentos crus ou mal cozidos e a adoção de práticas adequadas para a manipulação e estocagem destes, possibilitando assim, a redução de contaminação cruzada do alimento.

Sente-se, portanto, a necessidade da aplicação de algum tratamento que minimize a microbiota contaminante, pois todo este processo em cadeia tende a aumentar o risco das doenças transmitidas por alimentos.

Sendo assim, um processo alternativo, barato, facilmente acessível, principalmente, por parte das marisqueiras, seria a utilização de ácidos orgânicos como o vinagre e o suco de limão para diminuir ou eliminar a carga microbiana dos mariscos.

Frente ao exposto realizou-se o presente estudo, com os seguintes objetivos:

- * Pesquisar a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em amostras de “chumbinho”, procedentes de banco natural das praias do município de Salinas da Margarida, região Norte da Baía de Todos os Santos, Estado da Bahia;
- * Avaliar a influência de fatores ambientais como: salinidade, pH e temperatura da água do mar, sobre a possível presença desses microrganismos no local de estudo;
- * Pesquisar a distribuição de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em amostras da água do mar e do sedimento nessa mesma localidade;
- * Avaliar o efeito do suco de limão e de diferentes tipos de vinagre em amostras de “chumbinho”, inoculadas artificialmente com *V. parahaemolyticus*.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos últimos 30 anos estudos epidemiológicos e ecológicos têm demonstrado que muitas espécies do gênero *Vibrio*, isoladas do ambiente marinho, são agentes etiológicos de doenças que incluem desde gastroenterites autolimitadas até septicemia letal em pacientes debilitados (Morris Jr. & Black, 1985; West, 1989).

Membros do gênero *Vibrio* estão distribuídos em muitos ambientes aquáticos naturais, freqüentemente formando o maior componente das populações microbianas associadas com reciclagem de compostos orgânicos (Baumann & Schubert, 1984).

Os vibrios são habitantes autóctones do ambiente aquático, principalmente o marinho e são também clinicamente significantes para o homem. Transmitem-se, na maioria das vezes, através da ingestão de pescado cru ou mal cozido, pelo contato com o ambiente aquático ou através de moluscos bivalves como é o caso das ostras, que comumente são ingeridas cruas e desempenham um papel importante na transmissão desses agentes, pelo fato de serem concentradores biológicos (Blake et al., 1980; Morris Jr. & Black, 1985; West, 1989).

Até o momento, onze espécies de microrganismos do gênero *Vibrio* são reconhecidas como patogênicas para o homem e somente seis associadas com alimento: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. hollisae* e *V. furnisi* (Landgraf et al., 1996). Eles podem causar gastroenterite, infecção de feridas e de ouvido, septicemia primária e secundária (Morris Jr. & Black, 1985).

2.1. O MATERIAL DE ESTUDO

2.1.1. *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791).

Os moluscos bivalves, devido a seu mecanismo de alimentação realizado através de filtração da água, são capazes de concentrar do ambiente aquático, bactérias, vírus, pesticidas, produtos químicos tóxicos, metais pesados e hidrocarbonetos, por isso estes organismos têm sido utilizados como sentinelas do ambiente (Carrozzo, 1994).

Bioindicadores ou organismos sentinelas são espécies que possuem susceptibilidade para indicar ou tolerar condições ambientais particulares ou produzem respostas que sirvam para monitorar mudanças ambientais em intervalos de tempo específicos (Peso, 1980).

Dentre vários organismos que são utilizados em programas de monitoramento ambiental (fitoplâncton, macroalgas, moluscos, ascídias, anelídios, equinodermas, crustáceos, peixes e mamíferos), os moluscos têm sido certamente os mais freqüentemente empregados (Carrozzo, 1994).

Existem vários componentes que contribuem para que os bivalves marinhos sejam vulneráveis a uma alta concentração de bactérias em seu interior, como: a maioria das espécies é geralmente estuarina, com distribuição vizinha às atividades humanas; são predominantemente filtradores, concentrando os microrganismos; são geralmente sedentários, suportando poluição intermitente apenas pelo fechamento das valvas e possuem um ciclo de vida normalmente confinado a áreas restritas, maximizando a sua exposição aos microrganismos do local (Idler, 1972).

A maioria dos moluscos se alimenta por filtração, absorvendo as algas em suspensão na corrente de água que passa no interior da concha. Os moluscos filtram grandes quantidades de água marinha, sendo que uma ostra pode filtrar até quatro litros em uma hora (Wood, 1979).

Um dos bivalves mais predados pela população costeira da Baía de Todos os Santos é o *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), que é conhecido na região

como “chumbinho”, “papa-fumo”, “bebe-fumo”, sarnambitinga”, “sarnambi-pequeno” (Peso,1980) e em outras regiões do Brasil por “vôngole”, “berbigão”, “sarro de pito”, “marisco pedra” e “marisco-branco” (Grotta & Lunetta, 1980).

Segundo Mello (1974), Gmelin em 1791 fez a primeira descrição de *A. brasiliiana* com material obtido no Brasil e a denominou de *Vênus brasiliiana*.

De acordo com a classificação sistemática utilizada por Rios (1994), a *A. brasiliiana* está incluída na Ordem *Veneroidea*, Super-família *Veneroidea*, Família *Veneridae* e Sub-família *Chioninae*. Possui uma ampla distribuição geográfica, e sua ocorrência já foi registrada desde as Índias Ocidentais, Suriname, Brasil e Uruguai, tendo como habitat natural baías e enseadas arenosas e areno-lodosas.

Este molusco bivalve vive enterrado até 5 cm de profundidade, na zona interdital, formando banco de indivíduos de tamanhos variados (Narchi, 1969). Reproduz-se praticamente durante o ano todo, com períodos mais intensos durante o outono e primavera (Narchi, 1976) e o verão (Grotta & Lunetta, 1980).

A. brasiliiana possui concha triangular, grossa, com uma coloração variando desde o amarelo esbranquiçado, até totalmente escuro, com linhas concêntricas bem acentuadas. Possuem dois sífões muito sensíveis, curtos e fundidos, com tentáculos simples e desenvolvidos, típicos de espécies que vivem em águas calmas e alimenta-se por filtração de partículas em suspensão (Narchi, 1974).

Estudos realizados por Bahia (1995), com moluscos da Baía de Todos os Santos, demonstraram que o comprimento das conchas de *A. brasiliiana* apresentava uma amplitude de variação entre 9,20 mm a 27,50 mm.

O dimorfismo sexual de *A. brasiliiana* foi estudado por Almeida (1990), que observou não ser possível a identificação macroscópica dos sexos desta espécie.

As várias características de *A. brasiliiana*, principalmente sua ampla distribuição geográfica, abundância em número de indivíduos nos locais de ocorrência e o preenchimento dos pré-requisitos necessários aos organismos bioindicadores, têm levado pesquisadores a utilizá-lo como material de estudo em diferentes pesquisas (Peso, 1980 ; Almeida, 1990).

A *A. brasiliiana*, assim como outros mariscos são alimentos consumidos freqüentemente nas regiões litorâneas, possuindo grande importância nutricional pois são fontes protéicas e de minerais. Assim, o conhecimento da composição centesimal do marisco torna-se bastante importante, além do que, na literatura poucas são as informações a esse respeito.

Em amostras de “chumbinho” previamente cozidas adquiridas em feiras livres da cidade de Salvador-BA, durante os meses de verão, Miranda et al.(1999) obtiveram os seguintes valores na composição centesimal: umidade 63,21%; proteínas 17,62%; lipídeos 3,37%; cinzas 2,31% e glicídios 11,52%. Já nos meses de inverno os valores encontrados foram: 72,89%, 17,57%, 2,27%, 3,56% e 4,52%, respectivamente.

Pedrosa & Cozzolino (2001), também analisaram a composição centesimal de cinco diferentes tipos de mariscos crus, dentre eles o *Anomalocardia brasiliiana*, provenientes da cidade de Natal – RN e encontraram os seguintes valores para o molusco cru: umidade 81,58%, proteínas 12,67%, lipídeos 1,10%, cinzas 2,12%, fração Nifext 2,53% e caloria 70,70 Kcal.

Na tabela nacional de composição química dos alimentos proposta por Franco (1996), os valores protéicos e de calorias para carne de marisco são de 7,6% e 50,0 Kcal, respectivamente, enquanto que de glicídios é 1,6% e de lipídios 1,20%.

Sendo assim, os “chumbinhos” constituem um alimento rico e de grande importância nas regiões onde o poder aquisitivo é baixo e as fontes nutritivas em geral são escassas. Além de serem bastante apreciados na culinária local, sua alta produtividade é uma contribuição para o sustento alimentar e econômico dos moradores.

2.2. O AMBIENTE DE ESTUDO.

2.2.1. Salinas da Margarida

A Bahia possui o maior litoral individual do País, 14% da costa brasileira, banhada por um mar tipicamente tropical e influenciada por correntes oceânicas, que se aproximam da costa. O seu contorno litorâneo propicia um mar de 430.000 Km², em cuja superfície as águas marinhas se misturam com águas fluviais (Bahia Pesca).

De toda costa brasileira, a Baía de Todos os Santos constitui o maior acidente geográfico, abrangendo uma área aproximada de 1100 Km². Tem um aspecto bastante recortado e em seu interior encontram-se diversas ilhas de superfícies variadas, sendo que a de Itaparica é a maior delas com 37 Km de extensão, situada na entrada da baía, formando uma barra natural, delimitando dois canais: a oeste o Canal de Itaparica, estreito, com uma profundidade ao redor de 2 a 10 metros, sendo que o fluxo de água entre a baía e o oceano é pequeno; e a leste o Canal de Itaparica – Salvador, largo, com profundidade variando de 30 a 60 m na parte central, onde ocorre intercâmbio de águas com predominância oceânica (Peso, 1980).

Na baía desembocam diversos rios, a maioria de pequeno porte, como o Subaé, o Jaguaripe e o Rio Paraguaçu, dentre outros, sendo este último um dos principais do Estado. Estes dão origem a várias regiões estuarinas de grande importância biológica (Peso, 1980; Almeida, 1990).

Na Baía de Todos os Santos, assim como na costa baiana, são encontradas grandes formações de mangues arbóreos, (Figuras 1 e 2) ricos em diversas espécies de peixes, crustáceos e moluscos, os quais servem de sustento econômico e alimentar de grande parcela da população do Recôncavo Baiano (Bahia Pesca, Peso, 1980).



FIGURAS 1 e 2. Aspectos do mangue arbóreo na região das praias do Município de Salinas da Margarida – BA.

A cidade de Salvador, capital do Estado da Bahia, está localizada à leste, limitando a entrada da baía com a Ilha de Itaparica e Salinas da Margarida, na ponta oposta a Salvador (Toledo, 2001).

Salinas da Margarida é uma cidade de pequeno porte e faz parte do conjunto de municípios que contornam a Baía de Todos os Santos, localizando-se no estuário boca do Rio Paraguaçu, região do Recôncavo Baiano (Figura 3). Limita-se com o Município de Maragogipe iniciando na nascente do Riacho Forno, seguindo pelo divisor de águas da Serra Covoada até a nascente do Riacho Cairú e daí seguindo em direção norte à barra do Rio Paraguaçu, descendo por este até a Baía de Todos os Santos (EMBASA, 1999).

De acordo com as coordenadas geográficas, o município se apresenta com latitude Sul de 12° 52', Longitude Oeste 38 °46' e Altitude de 5m. A área do município é de 252 km², distando 229 km da capital, considerada a distância em percurso rodoviário e 56 km em marítimo (EMBASA, 1999).

O município de Salinas da Margarida possui uma população total de 9.817 habitantes (4.843 homens e 4.794 mulheres), distribuídos numa pequena área de 148,9 km², levando a uma densidade demográfica de 65,93 hab/km² – muito superior à média estadual (22,11 hab/km²)(EMBASA, 1999).

A economia do município é baseada na pesca e na mariscagem artesanais e os produtos são consumidos pela própria comunidade ou comercializados por “atravessadores” e “ganhadeiras”, para serem vendidos em Salvador, ocasionando uma baixa lucratividade que garante apenas a sobrevivência da família, não oferecendo condições de prosperidade para a comunidade (ASMASAM, 1997).

Devido a difícil situação econômica, a mulher se vê obrigada, desde cedo, a trabalhar “mariscando” para auxiliar o sustento da família. Segundo pesquisas realizadas em janeiro de 1997, pela Associação das Mariscadeiras de Salinas da Margarida - ASMASAM, 64% destas estão na faixa etária entre 19 e 39 anos, obtendo renda mensal que varia de R\$ 50,00 a R\$ 100,00 durante o verão, caindo um pouco nos outros meses, com o final da temporada de veraneio.

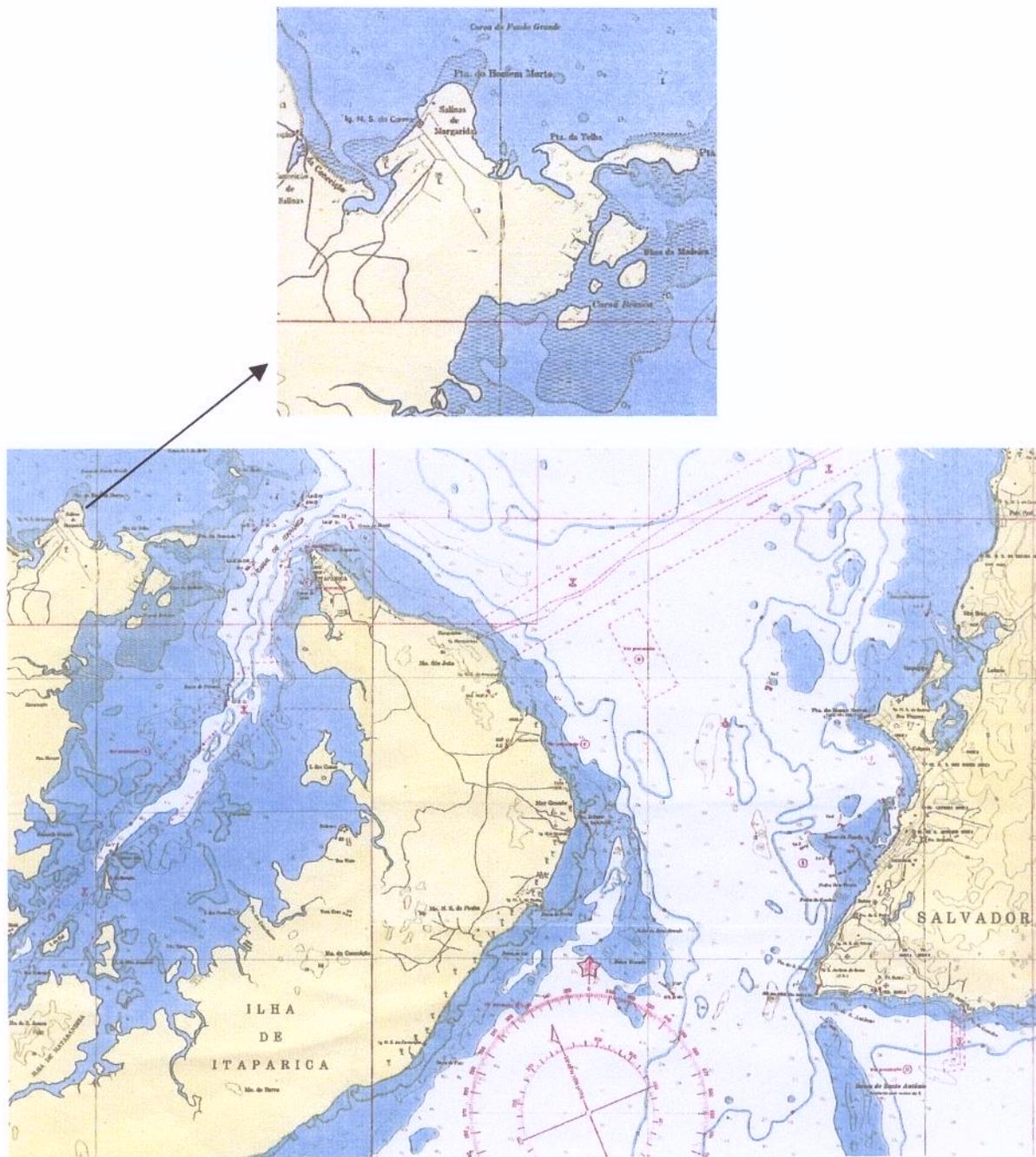


FIGURA 3. Local de amostragem, Município de Salinas da Margarida – BA.

Fonte: Carta Náutica nº1.110 – Brasil Costa Leste – Baía de Todos os Santos.



FIGURA 3. Local de amostragem Municipal de Santa Margarida de Oca
 Ponte Camé N.º 1000 - Barragem de Santa Margarida de Oca - Rio de Santa Margarida de Oca

Cada mariscadeira possui em média cinco filhos, dos quais 61% estão na faixa etária de zero a 15 anos. O índice de escolaridade das mariscadeiras é de 72% com 1º grau incompleto e 19% de analfabetas. As condições de moradia são péssimas, onde 35% não possuem instalações sanitárias e 96% não dispõem de rede de esgoto. São obrigadas a levar para a “maré”, desde cedo, os filhos, que também ajudam-nas nesta atividade o que causa, conseqüentemente, um baixo rendimento escolar, baixa freqüência e alto índice de evasão. Vivem em estado de carência absoluta pois lhes falta moradia, alimentação, documentação, remédios dentre outros. Os filhos de pescadores e mariscadeiras possuem uma baixa autoestima, envergonham-se da profissão de seus pais e sonham em morar na capital, não valorizando o ambiente e as espécies naturais que os cercam (ASMASAM,1997).

Com relação à população economicamente ativa, 56% estão no grupo “agropecuária, extração vegetal e pesca”, sendo que as atividades agropastoris têm pouca importância na região, assim, a ocupação concentra-se, principalmente, nas atividades pesqueiras. A extração vegetal é basicamente sustentada pelo dendê e pela piaçava, tendo esta última, pequena importância na economia local (EMBASA, 1999).

Na pesca, há um grande número de mulheres ocupadas na mariscagem do “chumbinho” (Figura 4). Segundo pesquisa de campo, da própria ASMASAM (1997), são produzidas em torno de 4,0 toneladas/dia desse marisco, peso líquido ou seja, o marisco livre de suas conchas; de cada 14 quilos do molusco “em casca”, obtém se um quilo de carne (Toledo, 2001). Por este motivo existe um grande acúmulo de cascas em frente as residências nesse município (Figura 5) e estas são utilizadas na construção civil, em substituição a brita na confecção do concreto.





FIGURA 4 Mulheres “mariscando” em banco natural de *Anomalocardia brasiliiana* das praias do Município de Salinas da Margarida – BA.



FIGURA 5. Acúmulo de cascas de *A. brasiliiana* em frente as residências no Município de Salinas da Margarida – BA.



2.2.2. MEIO FÍSICO

Segundo a classificação Köppen o clima local é do tipo tropical chuvoso, sem estação seca, com período chuvoso nos meses de abril a junho. A temperatura média anual é de 25,4°C, enquanto a mínima e a máxima apresentam valores de 21,9°C e 25,4°C, respectivamente. A pluviosidade média anual varia em torno de 1600 a 2000 mm, e o município não está inserido no polígono da seca, apresentando baixo risco de seca (EMBASA, 1999).

Os sedimentos fluvio-marinhos e praias possuem composição essencialmente argilo-siltosa, rica em matéria orgânica de cor cinza a preta (EMBASA, 1999).

2.3. GÊNERO *Vibrio*

O gênero *Vibrio*, segundo o “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (1994), pertence a família *Vibrionaceae*, é composto por bacilos Gram negativos, retos ou curvos com 0,5 – 0,8 µm de diâmetro e 1,4 – 2,6 µm de comprimento. São móveis por um ou mais flagelos polares, não formam esporos ou microcistos, são anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo. Os íons sódio estimulam o crescimento de todas as espécies e são de exigência absoluta para outras que necessitam de 2 a 3% de cloreto de sódio ou água marinha para o seu crescimento. A temperatura ótima para o seu desenvolvimento varia consideravelmente, sendo que todas crescem a 20°C e muitas a 30°C. São bastante comuns em ambiente marinho e em estuários, na superfície e no conteúdo intestinal dos animais marinhos e algumas espécies são também encontradas em água doce. Várias espécies são patogênicas para o homem e muitas o são para vertebrados e invertebrados marinhos.

2.3.1. *Vibrio cholerae*

A espécie de *Vibrio* patogênica de maior interesse para a saúde pública é o *V. cholerae* O1, devido às diversas pandemias que tem causado. Esta bactéria é a responsável pela cólera, que tem como característica principal diarreia profusa e aquosa, com perda de mais de um litro de fluido por hora, podendo levar à desidratação e morte, se o paciente não for tratado prontamente. A contaminação se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Dentre os fatores de virulência responsáveis pelos sintomas estão a mucinase, protease, neuramidase, presença de adesinas e a produção de uma potente enterotoxina, que provoca desequilíbrio iônico, tendo como consequência o aparecimento de diarreia (Levine et al., 1984).

O *Vibrio cholerae* não O1 é bioquimicamente distinguível do *V. cholerae* O1 e tem sido responsabilizado por surtos e casos esporádicos de doenças gastrintestinais (Kobayashi & Ohnaka, 1989). Vários estudos indicam que o *V. cholerae* não O1 pode ocorrer normalmente em águas de estuários e sua presença não está associada a esgotos domésticos (Tison et al., 1986).

2.3.2. *Vibrio mimicus*

O *Vibrio mimicus* foi inicialmente relatado como cepas atípicas de *V. cholerae* por Davis et al. (1981). Estudos sorológicos e de homologia de DNA demonstraram diferenças em relação ao *V. cholerae* sendo portanto, proposta uma nova espécie o *V. mimicus*, cujo nome refere-se ao fato da doença provocada por este microrganismo ter sintomas muito semelhantes aqueles causados pelo *V. cholerae* (Morris Jr & Black, 1985).

Na Bahia, o *V. mimicus* foi isolado de pescado envolvido em surto de toxinfecção alimentar na cidade de Salvador (Mascarenhas et al., 1999).

2.3.3. *Vibrio hollisae*

O *V. hollisae* é uma espécie halofílica, que foi descrita em 1982 por Hickman et al. e foi isolada de fezes de pacientes com diarreia.

Existe uma relação entre infecções por esse microrganismo e o consumo de alimentos de origem marinha como peixe cru salgado e caso de bacteremia (Rank et al., 1988).

2.3.4. *Vibrio furnissi*

O *V. furnissi* foi primeiramente classificado como *V. fluvialis* biótipo II e isolado de fezes diarreicas de pacientes na Indonésia, tendo sido também isolado do ambiente aquático. (Brenner et al., 1983).

No Brasil, o *V. furnissi* foi isolado de fezes de crianças com diarreia, sendo que em uma delas o único microrganismo patogênico encontrado foi essa bactéria (Magalhães et al., 1990).

Matté et al. (1994b), estudando a distribuição de vibrios patogênicos em mexilhões em Ubatuba, litoral paulista, observaram uma frequência de 17% de *V. furnissi*.

2.3.5. *Vibrio vulnificus*

2.3.5.1. Histórico

O primeiro caso relatado de infecção por *V. vulnificus* foi descrito por Roland em 1970, como uma espécie de *Vibrio* não entérica, com desenvolvimento de pápula hemorrágica generalizada e febre em um homem após banho em águas em New England. O paciente desenvolveu subseqüentemente gangrena e choque por endotoxina. O microrganismo incriminado foi o *V. parahaemolyticus* e foi assim

que o autor se referiu a infecção por *V. vulnificus* (Roland (citado por Kumamoto et al., 1998).

Hollis et al. (1976), descreveram um grupo de vibrios halofílicos isolados de cultivos de agar sangue, sendo que a maioria deles possuía a enzima β -galactosidase e fermentava a lactose, sendo designado como vibrio marinho halofílico "lactose-positivo". Posteriormente, foram identificados como uma nova espécie que Farmer III em 1979 propôs que fosse denominada de *Vibrio vulnificus*.

A descrição de infecção por *V. vulnificus* tem sido descrita na literatura desde os tempos de Hipócrates. Este descreveu no século V a.C , que um homem, Criton, da ilha da nação de Thasos, apresentou fortes dores em seu pé, bem como febre, calafrios, náusea e confusão mental. O pé ficou inchado, eritematoso e desenvolveu pequenas feridas negras; apesar do tratamento médico, Criton morreu dois dias após o início da doença. Hoje, os médicos historiadores, levantam a hipótese de que Criton tenha sofrido uma infecção fatal por *V. vulnificus* (Baethge et al. (citados por Kumamoto et al., 1998).

2.3.5.2. Infecções humanas

A infecção por *V. vulnificus* é uma das mais severas, dentre as transmitidas por alimentos e a taxa de letalidade associada a septicemia excede 50% (Tacket et al., 1984). Este patógeno é responsável por 95% de todas as mortes por ingestão de alimentos marinhos contaminados nos Estados Unidos (Oliver, 1989). A ingestão de frutos do mar, principalmente ostras cruas contaminadas, está frequentemente associada com quadros de septicemia em indivíduos susceptíveis, como aqueles com doenças gástricas, cirrose, hepatite, hemocromatose, insuficiência renal ou condições de imunossupressão (Blake et al., 1980 e Oliver, 1989).

O *V. vulnificus* no hospedeiro humano, diferentemente do que acontece com outros microrganismos, tem a habilidade de produzir doença por duas diferentes vias de entrada: a oral e a epidérmica e os sinais clínicos relacionam-se a septicemia primária e infecções de feridas (Peterkin, 1994).

A septicemia primária ocorre quando o *V.vulnificus* é adquirido através do trato gastrointestinal, após o consumo do alimento contaminado. A progressão da doença é freqüentemente rápida e o paciente pode apresentar choque septicêmico intratável, sem uma fonte de infecção óbvia. Os sinais e sintomas mais comumente presentes são: febre (92% dos pacientes), calafrios (53%), prostração (95%), hipotensão (33%) e lesões características de pele (67%) segundo Oliver, (1989) e Kumamoto et al.,(1998).

Blake et al. (1979) relataram que a presença de doença hepática tem sido uma condição pré-existente em 75% dos casos, principalmente naqueles pacientes que fazem abuso do consumo de álcool. Normalmente, em 97% dos casos, a cultura de sangue dos pacientes é positiva para este microrganismo.

As lesões cutâneas clássicas associadas com *V.vulnificus* são bolhas grandes cheias de fluido hemorrágico e geralmente estão localizadas nos membros inferiores (Kumamoto et al.,1998). A letalidade em pacientes com septicemia primária é de 56% (Hlady et al., 1996) e quando ocorre choque séptico atinge, aproximadamente, 92% (Klontz et al., 1988).

As infecções de feridas ocorrem quando o *V.vulnificus* é introduzido através da pele por ferimento ou de lesões pré-existentes e, em um quarto dos pacientes, estas ocorrem nos membros superiores ou inferiores. Os portadores desta síndrome sempre relataram o contacto com o ambiente marinho, através da exposição direta de lesões com a água do mar ou através de injúrias ocorridas quando pescando, limpando pescados e camarões, abrindo ostras ou apenas caminhando pela praia (Tacket et al.,1984; Kumamoto et al., 1998).

Os pacientes apresentam febre (65%), lesões cutâneas envolvendo contacto com ambiente ou animais marinhos (100%) e celulites (88%) (Klontz et al.,1988), sinais estes que se desenvolvem após um período de incubação de quatro horas a quatro dias (Blake et al., 1979). Alguns sintomas também mostraram-se associados como edema e dor intensa na região da ferida. A infecção é caracterizada por um eritema intenso e edema que pode progredir para lesões bolhosas com vasculite levando, então, a uma necrose tecidual, (Kumamoto et al.,

1998). Muitas dessas feridas requerem intervenção cirúrgica, que podem ou não resultar em amputação do membro infectado, com baixa taxa de letalidade 25% (Oliver, 1989 ; Wright et al., 1996). Segundo Kumamoto et al. (1998) o consumo de alimentos marinhos não é um fator associado ao desenvolvimento de infecções de feridas.

De acordo com Kumamoto et al. (1998), o *V. vulnificus* pode estar associado com sintomas de gastroenterite como náusea, vômito, câimbras abdominais e diarreia aquosa, com cultura de fezes positiva. Esta última observação clínica tem demonstrado que outros patógenos entéricos também têm sido isolados desses indivíduos.

2.3.5.3. Fatores de virulência

Várias substâncias têm sido implicadas como responsáveis pela patogenicidade de *V. vulnificus*, porém seus fatores de virulência não estão ainda totalmente esclarecidos.

Estes fatores incluem a habilidade em adquirir ferro da transferrina, uma hemolisina extracelular, a protease e a presença dos polissacarídeos em sua cápsula (Wright & Morris Jr., 1991). A capacidade de invasão tecidual está associada a presença da cápsula. O microrganismo produz uma metaloprotease no espaço intersticial, resultando assim no aumento da permeabilidade vascular e desenvolvimento edematoso das lesões de pele segundo (Myoshi et al., (citados por Kumamoto et al., 1998)).

Citotoxina-hemolisina

A citolisina com peso molecular de 50 kDa tem atividade citolítica para eritrócitos de mamíferos e é citotóxica para células do ovário de hamster chinês (CHO) (Wright & Morris Jr., 1991). Foi demonstrado por Shinoda et al. (1985) que a hemolisina é termolábil, com seletiva atividade hemolítica maior a 37°C do que a 20°C e inibida a 4°C. Esta toxina também pode estar envolvida na produção de lesões cutâneas, característica das infecções por *V. vulnificus* podendo ser notada

na degradação de mastócitos e na indução da liberação de histamina (Yamanaka et al., 1990).

Massad et al. (1988) sugeriram que a hemolisina não é por si própria a responsável pela virulência de *V.vulnificus*, mas que a produção de várias substâncias extracelulares em conjunto podem ser as responsáveis pelo caráter invasor do microrganismo.

Cepas citolisina positivas e negativas revelam-se com os mesmos valores quanto a dose letal 50%, demonstrando que a citolisina tem um papel menos importante que os outros fatores na patogênese do *V.vulnificus* (Peterkin, 1994).

Efeito do ferro

O ferro é essencial para o crescimento bacteriano e a capacidade de obtenção pelo hospedeiro é essencial para a patogenicidade (Kumamoto et al., 1998).

Observações clínicas e experimentais demonstram que o microrganismo necessita de concentrações elevadas de ferro para competir com a transferrina e produzir a infecção, tais como em indivíduos com cirrose, hemocromatose, onde nestas condições há perto de 100% de saturação da transferrina no soro, liberando assim ferro livre para o sangue (Chart et al, citados por Peterkin, 1994).

Wright et al. (1981), estudando em camundongos o papel do ferro como fator de virulência, puderam observar que quando estes animais recebiam uma injeção de solução de ferro amoniacal (4µg/g) havia uma diminuição da DL₅₀ de 6x10⁶ células para 1, com redução no tempo de morte dos animais pós-infecção e a taxa de mortalidade era de 100% nos animais que recebiam a injeção de ferro.

Papel da cápsula

Simpson et al. (1987), estudaram a morfologia da colônia de *V.vulnificus* e sua correlação com a virulência, de 38 cepas provenientes de amostras clínicas e ambientais; as cepas avirulentas produziam colônias transparentes, quando cultivadas em ágar infusão de coração (HI) e as virulentas, ou seja, aquelas letais para camundongos adultos, apresentavam-se sob as duas formas opacas e

translúcidas, existindo uma dissociação de colônias opacas a transparentes na proporção de 1 a 7%, não observando a reversão de colônias transparentes para opacas.

O *V. vulnificus* produz polissacarídeos capsulares essenciais para a virulência. Os componentes da cápsula conferem ao microrganismo resistência à ação bactericida do soro e à atividade antifagocitária dos polimorfonucleares, aumentando a letalidade em camundongo, sendo considerada um fator importante de virulência (Yoshida et al., 1985).

Bush et al. (1997) estudando os carboidratos que compõe os polissacarídeos da cápsula, observaram que existe uma grande diversidade de tipos capsulares dentre as cepas de *V. vulnificus* e que os dados disponíveis de cepas clínicas ou do ambiente não indicam uma correlação clara do tipo de cápsula com seu potencial patogênico. Mas, seus estudos confirmaram a existência de uma grande variedade genotípica e fenotípica dentre as cepas de *V. vulnificus*.

Harris–Young et al. (1995), investigando a viabilidade das células de *Vibrio vulnificus* associada com o poder bactericida de hemócitos de ostras, observaram que níveis de fagocitose e degradação das cepas de colônias opacas eram menores do que aquelas das colônias translúcidas. Estes achados, indicaram que as cápsulas podem contribuir para a resistência da ingestão e degradação das bactérias pelos hemócitos das ostras, devido a um mecanismo ainda desconhecido. Os resultados demonstraram também que a ação dos hemócitos sobre as bactérias não se altera durante as diferentes épocas do ano.

Outros fatores relacionados à virulência.

Enzimas específicas que afetam a permeabilidade vascular e causam a destruição dos tecidos, bem como os fatores associados a células que a protegem e estão frente a resposta do hospedeiro, incluem um fator sérico de resistência que impede a lise mediada pelo complemento (Janda et al., 1988).

A produção de proteases, lipase, citolisina, hemolisina, hialuronidase, mucinase, Dnase, bradicinina, sulfatase, fator- α de necrose tumoral e seus efeitos na estrutura celular humana normal estão implicados na contribuição da virulência de *V.vulnificus* (Espat et al., 1996).

2.3.5.4. Aspectos ecológicos

O *V.vulnificus* é um bacilo Gram negativo, halofílico obrigatório, reconhecido como causador de septicemia primária e infecções de feridas. É uma bactéria que já foi isolada da água do mar, de animais filtradores como por exemplo ostras e mexilhões (Kumamoto, et al., 1998; Kaspar & Tamplin, 1993)

A ocorrência de *V. vulnificus*, está sempre relacionada com a temperatura da água do mar e a salinidade, principalmente, nos meses de verão (Kelly & Dinuzzo, 1985; Ruple & Cook, 1992; Peterkin 1994; Jones & Summer-Branson, 1998). Estudos realizados com a água do mar, têm demonstrado que o número de microrganismos aumenta quando a temperatura aumenta na faixa de 13-22°C e a salinidade se encontra entre 5 e 25‰ (Kaspar & Tamplin, 1993)

Kaysner et al. (1987), encontraram na Costa Oeste dos Estados Unidos, uma frequência de 5,9% de *V.vulnificus*. O microrganismo foi isolado em 31 das 529 amostras coletadas da água, sedimento e frutos do mar de estuários onde a temperatura variou entre 13 a 31°C e a salinidade de 0,8 a 34‰.

O comportamento de *V.vulnificus* foi estudado em ostras colocadas em água do mar tratada e em circulação, durante duas semanas, concluíram que se a bactéria fizer parte da microbiota normal, ela poderá ser detectada, mesmo que em números baixos, tanto no inverno quanto no verão. Sugerem, também, que a bactéria é um habitante transitório nas ostras, pois é eliminado pelo processo de depuração, assim como os microrganismos patógenos de origem terrestre (Kelly & Dinuzzo, 1985).

Parâmetros como salinidade e temperatura associados à presença de *V. vulnificus* foram investigados no norte da Costa do Golfo e na Costa do Atlântico

por Motes et al, 1998. Observaram que na Black Bay (Los Angeles) e a Apalachicola Bay (Flórida), eram as fontes da maioria das ostras infectadas e que a distribuição era sazonal. Os pesquisadores concluíram que existe uma similaridade na concentração do microrganismo em ostras coletadas no norte da Costa do Golfo e que a quantidade era influenciada primeiramente pela temperatura da água. As amostras coletadas em estuários do Atlântico mostraram níveis baixos de *V. vulnificus* mesmo quando as temperaturas eram similares as do Golfo que poderia estar ocorrendo devido à alta salinidade desta área (Motes et al., 1998).

Jones & Summer-Brason (1998), estudando a incidência e detecção de vibrios patogênicos no norte do estuário de New England (Great Bay - EUA) durante um período de dois anos, observaram que *V. vulnificus* pode ser detectado de maio até novembro, com aumentos de junho, julho e agosto, quando também ocorreram aumento da temperatura local. Observaram também que as altas concentrações do microrganismo eram detectadas nos afluentes, que estão sujeitos a nutrientes orgânicos presentes tanto nos locais com e sem fontes de poluição ou como resultado de produtividade primária, enriquecida por elevados nutrientes inorgânicos. Por isso, notaram uma correlação positiva entre a concentração de carbono orgânico dissolvido (DOC) na água e a ocorrência de *V. vulnificus*, como no caso dos afluentes.

Utilizando oligonucleotídeo de DNA, Wright et al. (1996) demonstraram a presença de *V. vulnificus* em ostras, plâncton e sedimento na Baía de Chesapeake (EUA). O estudo demonstrou também que o *V. vulnificus* compõe de 8 a 10% da população de bactérias heterotróficas encontradas nas águas e ostras coletadas durante os meses quentes. Durante os meses de inverno, com temperaturas de 8°C na água e de 7,6°C nas ostras, também conseguiram isolar *V. vulnificus*. Os autores acreditam que isto tenha sido possível devido à sensibilidade do método empregado para o isolamento. O microrganismo foi também encontrado no plâncton em números superiores àqueles encontrados na água, talvez pelo fato do microrganismo se prender ao plâncton. Também constataram uma correlação entre a baixa salinidade e o aumento de *V. vulnificus*.

Um estudo sobre a distribuição de microrganismos da família *Vibrionaceae* nas águas das cinco principais enseadas de Taiwan, revelou 5,7% de amostras contaminadas pelo *V.vulnificus*. Foram determinadas a temperatura, pH e salinidade dos pontos amostrados foram determinados e observou-se uma variação de 15 a 34°C, 5,8 a 8.6 e 0,1 a 4,2%, respectivamente. Apesar da distribuição não significativa de *V.vulnificus* neste estudo, a presença da bactéria em Tawain revelou-se bastante importante (Wu et al., 1996).

De acordo com Chuang et al. (citados por Wu et al.,1996), de 1985 a 1990, 27 pacientes foram infectados com *V.vulnificus*, com 11 mortes em Tawain e em todos os casos os pacientes haviam ingerido frutos do mar ou sofrido lesões devido ao trabalho com eles ou feridas que foram expostas a água do mar.

Vanoy et al.(1992), coletaram amostras de ostras, substâncias particuladas suspensas (SPM), sedimento e água do mar da baía de West Galveston (Texas), durante 16 meses, para a enumeração e detecção de *V.vulnificus* através de anticorpos monoclonais - número mais provável – ensaio imunoenzimático (EIA) capaz de detectar 2000 organismos alvo. Durante os meses frios o microrganismo não foi detectado nas amostras de água do mar, ostras ou SPM, embora tenha sido detectado baixos níveis em várias amostras de sedimento. Após a temperatura da água ter atingido 20°C e a salinidade se encontrar abaixo de 16‰, os níveis de *V.vulnificus* aumentaram em todos os locais e esses níveis foram associados com SPM.

Oliver et al. (1983), isolaram *V.vulnificus* de amostras de água do mar, sedimento, plâncton, pescado e frutos do mar. Os resultados das amostras provenientes de 80 pontos de Miami (Flórida) a Portland (Maine) indicaram que a bactéria é um microrganismo ubiqüitário e que pode ser isolado de uma variedade de fontes ambientais, embora presentes em números relativamente baixos, números elevados da bactéria foram observados em frutos do mar, sendo que 84% das cepas foram isoladas a partir de mariscos.

Ruple & Cook (1992), estudaram a ocorrência de *V.vulnificus* em ostras da Costa do Golfo e relataram uma correlação com a sazonalidade, mostrando

contagens baixas durante o inverno e número excedendo a 110.000/g durante o verão. Observaram também uma correlação com os níveis de coliformes fecais e com a temperatura das áreas de colheita das amostras.

A correlação entre a sazonalidade e a incidência de *V. vulnificus* em ostras e na água do estuário de Great Bay (EUA) foi estudada por O'Neill et al. (1992), os quais verificaram que com temperatura média de $23,7 \pm 2,7^{\circ}\text{C}$ e salinidade de $23,5 \pm 2,7\text{‰}$ ocorria aumento da concentração do microrganismo, vindo a decrescer no outono com a diminuição dessas variáveis. Os autores não encontraram uma correlação entre o índice de coliformes fecais e os níveis de *V. vulnificus*. Constataram também que o microrganismo tem um maior concentração e frequência em ostras ($11.500 \pm 15\text{NMP}/100\text{g}$) do que em água ($190 \pm 38\text{NMP}/100\text{ml}$).

Oliver et al. (1991), observaram que *V. vulnificus* não é isolado quando a temperatura da água se encontra abaixo de 10°C , mas que a bactéria se encontra presente no estado viável porém não cultivável (VNC), não sendo capaz de se desenvolver em meios de cultura bacteriológicos, embora a sua detecção pode ser observada empregando-se métodos mais sensíveis.

De acordo com o Center of Disease Control - CDC (1993) de 1981 a 1992, na Flórida (EUA), 125 pessoas foram infectadas com *V. vulnificus*, das quais 44 (35%), morreram. Em Los Angeles (EUA), de abril de 1993 a maio de 1996, ocorreu um total de 16 casos de infecção por *V. vulnificus* com 3 mortes, sendo que 12 destes (75%) tinham doenças hepáticas por excesso de álcool ou hepatite viral e todos com septicemia e haviam ingerido ostras cruas 1 ou 2 dias antes do aparecimento dos primeiros sintomas (CDC, 1995).

2.3.5.5. *Vibrio vulnificus* no Brasil

No Rio de Janeiro, Rodrigues & Hofer (1986) avaliaram a presença de microrganismos do gênero *Vibrio* em amostras de ostra e água do mar coletadas durante um ano, em diferentes pontos da Baía de Sepetiba e evidenciaram a

presença de *V.vulnificus* em 0,51% das amostras de água do mar, não sendo isolado nas amostras de ostras.

Landgraf et al. (1996), estudaram a ocorrência de *Vibrio* spp, com ênfase ao *V.vulnificus*, em frutos do mar coletados no litoral do Estado de São Paulo e consumidos na cidade de São Paulo. Observaram que das 56 amostras de ostras coletadas, 51,8% estavam contaminadas com *V. vulnificus* e 50%, das 24 de camarão, 4,2% e das 20 amostras de mexilhões, sendo que o NMP/g da bactéria nas amostras variou de <3 a $3,6 \times 10^2$.

Garcia-Moreno & Landgraf (1997), estudando a ocorrência de *V.vulnificus* em camarões, ostras e mariscos provenientes do litoral do Estado de São Paulo, observaram que 55,5% das amostras analisadas estavam contaminadas com a bactéria, sendo que a maior concentração do microrganismo foi encontrada nas amostras de ostras (65,4%), sendo que o isolamento do microrganismo ocorreu durante todos os meses de amostragem.

Estudos realizados por Matté et al. (1994a) verificando a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos em mexilhões coletados em três diferentes locais da costa de Ubatuba, S.Paulo, durante um ano, observaram a presença de *V.vulnificus* numa taxa de 8 a 17% das amostras coletadas e estas se encontravam em concentrações iguais ou inferiores ao NMP de 3/100g. Em um outro estudo Matté et al. (1994b) isolaram o microrganismo em 12% das amostras de ostras coletadas na mesma região.

2.3.5.6. Isolamento e identificação

Segundo a sétima edição do BAM (Bacteriological Analytical Manual), do FDA (Food and Drug Administration), o isolamento de *V.vulnificus* envolve um enriquecimento prévio em água peptonada alcalina por 16 horas seguido de plaqueamento em ágar TCBS (tiosulfato-citrato- sais biliares-sacarose) ou ágar mCPC (Celobiose polimixinaB-colistina, modificado), para a obtenção de colônias isoladas.

O ágar TCBS é o meio mais amplamente utilizado para o isolamento de vibrios, incluindo o *V.vulnificus* (Oliver et al. 1983; Zébral,1985; Rodrigues & Hofer,1986; Matté et al.;1994a,b; Landgraf et al.,1996). Este meio não tem uma boa seletividade, pois permite o desenvolvimento de outras bactérias que não somente vibrios. Mesmo entre os microrganismos do gênero vibrio este meio não permite a diferenciação do *V.vulnificus* de outros que também não fermentam a sacarose. Portanto, outros meios foram desenvolvidos com a finalidade de permitir uma maior seletividade.

Bryant et al. (1987) utilizaram o meio Ágar Dodecil Sulfato de Polimixina B-Sacarose (SDS), originalmente descrito por Kitaura et al., para o isolamento e contagem direta de *V.vulnificus*. As colônias resistentes ao sulfato de polimixina B apresentaram um halo opaco ao seu redor, isto devido a atividade da enzima extracelular sulfatase alcalina, que hidrolisa o dodecil sulfato de sódio. Este halo pode ser formado após 4 horas de incubação, muito embora cepas de *V.cholerae*-O1 também tenham apresentado a formação de halo, reduzindo assim a seletividade.

Em 1987, Massad & Oliver propuseram a utilização de um novo meio, ágar celobiose-polimixinaB-colistina (ágar CPC), para um melhor isolamento de *V.vulnificus* e *V.cholerae*. Este meio tem vantagens em relação a outros, devido a resistência do *V.vulnificus* a colistina e a polimixina B e a temperatura de incubação de 40°C, elimina muitas das bactérias marinhas, além da fermentação da celobiose ser um elemento diferencial. Os autores estudaram 136 cepas de vibrios e isolados marinhos dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Photobacterium* neste meio. Somente *V.vulnificus* e *V.cholerae* se desenvolveram, sendo que a fermentação da celobiose permitiu facilmente a diferenciação entre as duas espécies, pois *V.vulnificus* fermenta a celobiose produzindo colônias amarelas circundadas por uma zona amarela, o que não aconteceu com *V.cholerae*, cujas colônias se apresentaram de coloração púrpura rodeadas por uma zona azul.

Oliver et al. (1992), realizaram um estudo comparando a seletividade dos meios CPC, TCBS e SDS, para o isolamento de *V.vulnificus* em amostras de ostras e mexilhões. Evidenciaram a superioridade do ágar CPC em relação aos outros meios utilizados.

Elliot et al. (1998), propuseram a redução da concentração de celobiose do meio originalmente desenvolvido, originando desta maneira o ágar mCPC (ágar CPC modificado), que é atualmente utilizado.

Com o mesmo objetivo dos autores dos parágrafos anteriores porém utilizando cinco diferentes caldos de enriquecimento seguido de isolamento em ágar CPC e SDS, Sloan et al. (1992), demonstraram que o enriquecimento em água peptonada alcalina e plaqueamento em ágar CPC foi a combinação mais efetiva para a recuperação de *V.vulnificus* em amostras de ostras artificialmente contaminadas.

Tentando solucionar a problemática da identificação completa de *V.vulnificus*, que é um processo laborioso e que requer vários dias de trabalho, métodos rápidos têm sido propostos, alguns aplicados após o isolamento da bactéria e outros ainda no alimento.

A especificidade sorológica do soro antiflagelar de *V.vulnificus* foi testada por Simonson & Sieberling (1986) por meio de teste de aglutinação em lâminas. Eles utilizaram células de *Staphylococcus aureus* recobertas com anticorpo anti-H (antiflagelar) de *V.vulnificus* e obtiveram resultados de até 98,3% de aglutinação com as cepas testadas, comprovando que o teste de coaglutinação é rápido, sorologicamente específico e um procedimento barato para identificação do microrganismo depois de ter sido realizado o isolamento primário.

O isolamento do fragmento de DNA produtor de citotoxina–hemolisina e sua utilização em prova de DNA, para identificação de *V.vulnificus* em ostras foi conseguido por Morris et al. (1987). Observaram também que a utilização da citotoxina-hemolisina é um método rápido, sensível e específico para a identificação rápida em amostras do meio ambiente, ostras ou da água do mar.

Wright et al. (1993) avaliaram o método de detecção de *V.vulnificus*, utilizando uma sonda oligonucleotídica de DNA contendo o gene que codifica a produção de citotoxina-hemolisina. Este método, permitiu um isolamento e enumeração rápida, econômica e sensível da bactéria sem o uso de meios de enriquecimento ou seletivos em amostras de frutos do mar e do meio ambiente.

Utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o gene proposto a citotoxina-hemolisina como “primer”, Hill et al. (1991), identificaram em 24 horas, *V.vulnificus* em homogeneizado de ostras que haviam sido previamente contaminadas com 10^2 UFC/g da bactéria.

Em situações de “stress”, como o frio, naturalmente como acontece nos meses de inverno intenso, o *V.vulnificus* se encontra no estado viável mas não cultivável (VNC). Contudo, mesmo neste estado a bactéria continua sendo um problema de saúde pública, pois é de difícil detecção (Nilsson et al. 1991). Por outro lado, Brauns et al. (1991) utilizando-se da técnica de PCR para pesquisa de células viáveis mas não cultiváveis detectaram 31 nanograma (ng) de DNA de células neste estado, permitindo assim romper com a barreira da não detecção da bactéria nesta condição.

Lee et al. (1998), realizaram o primeiro diagnóstico clínico de *V.vulnificus* utilizando a técnica de “nested” PCR que é mais sensível e específica se comparado com o PCR original. Neste mesmo experimento cepas da bactéria foram misturadas com outros microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e, mesmo assim, o *V.vulnificus* foi detectado. O método “nested” PCR pode detectar menos que um femtograma (fg) do DNA cromossomal e uma única unidade formadora de colônia (UFC) do microrganismo.

Parker & Lewis (1995) produziram soro anti-hemolisina de *V.vulnificus* (VvH), no intuito de utilizá-lo como agente de captura desta bactéria em ensaio imunoenzimático (ELISA “sanduíche”), utilizando este para detecção da bactéria em ostras e no ambiente, concluindo através dos resultados ser a técnica bastante útil, com a eliminação dos testes bioquímicos convencionais para identificação de *V.vulnificus* que são bastante longos e laboriosos.

Um método imunoenzimático (EIA) utilizando anticorpos monoclonais foi utilizado por Tamplin et al.(1991), para identificar números reduzidos de *V.vulnificus* em caldo de enriquecimento e nos meios de cultura TCBS e CPC, com a finalidade de substituir os testes bioquímicos convencionais conseguindo, assim redução do tempo e aumento da especificidade.

2.3.5.7. Controle de *Vibrio vulnificus* em alimentos.

Os frutos do mar em todos os seus estágios de colheita, transporte e estocagem podem estar expostos a diferentes temperaturas. Sabe-se que, especialmente durante a exposição a temperaturas elevadas, o *V. vulnificus* pode aumentar em número dentro de moluscos, principalmente em ostras, constituindo alto risco àqueles que as consomem cruas.

Estudo realizado por Murphy & Oliver (1992), comprovou que a estocagem à temperatura de 17 e 22°C não era a causa da multiplicação de *V. vulnificus* em ostras, assim como notaram também que, quando estas foram estocadas em temperaturas apropriadas, os seus níveis podiam permanecer e se manter o suficientemente altos e produzir infecção em hospedeiros susceptíveis, sugerindo ainda que o número de microrganismos somente começou a decrescer após o décimo dia de estocagem, em todas as temperaturas pré-estabelecidas (0,5 a 22°C).

Trabalho realizado por Parker et al. (1994) demonstrou que após a contaminação experimental de ostras com níveis de 10^6 UFC/g de *V. vulnificus*, o empacotamento, o congelamento e a estocagem a -20°C por 70 dias, ainda continham de células viáveis do microrganismo, mesmo em baixos níveis. Sendo assim, os pesquisadores recomendaram a utilização de frutos do mar, mesmo após congelamento, devidamente cozidos.

Cook (1997) realizou um estudo para estimar o tempo que ostras podiam ficar estocadas sem refrigeração e observou que o período de 6 horas podia reduzir o número de *V. vulnificus* neste molusco na ordem de 85%, se comparado

com um período de ≥ 14 horas. Comenta que o ideal é a imediata refrigeração após a colheita, reduzindo assim o desenvolvimento da bactéria.

Em um outro trabalho, Cook (1994) observou que a multiplicação de *V. vulnificus* mantidos à temperatura ambiente durante o verão, o seu pico de crescimento surgia antes de 12 horas.

Cook & Ruple (1992) propuseram um aquecimento de ostras em água a 50°C por 10 minutos para a redução de *V. vulnificus* a números não detectáveis. Este tratamento não dá à ostra uma aparência de cozida ou apreciável mas deve ser empregada como uma estratégia para se ter um alimento seguro.

A desinfecção da água do mar para a depuração de ostras através de luz ultravioleta (U.V) é um tratamento bem aceito para a redução de bactérias contidas em seu interior. Porém, em um estudo conduzido por Tamplin & Carpers (1992) foi observado que células de *V. vulnificus* permaneceram nas ostras após exposição à desinfecção pela radiação U.V. Outros investigadores também observaram que microrganismos do gênero *Vibrio* permanecem nas ostras que são submetidas ao protocolo de depuração.

Um estudo utilizando dez compostos “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS), para o controle de *V. vulnificus*, o diacetil, o ácido láctico e butilato de hidroxil anisol (BHA) mostrou seus efeitos letais contra o microrganismo, nas seguintes concentrações e tempo : 50 ppm por 24 h, 300ppm por 3 h e 400 ppm por 3 h respectivamente (Sun & Oliver, 1994a).

Em um outro trabalho Sun & Oliver (1994b) observaram os efeitos dos GRAS em ostras naturalmente contaminadas, onde somente o diacetil a uma concentração de 0,05% pode diminuir significativamente o número de *V. vulnificus* sendo possível a utilização deste agente na redução dos seus níveis.

2.3.6. *Vibrio parahaemolyticus*

2.3.6.1. Considerações gerais

O *Vibrio parahaemolyticus* foi identificado pela primeira vez em 1950 em Osaka no Japão, por Fujino et al. (citados por Twedt, 1989), quando isolaram o microrganismo das fezes de pacientes e de “shirasu” (sardinhas pequenas, aferventadas e parcialmente desidratadas), alimento suspeito, envolvido em surto de gastroenterite, classificando a bactéria isolada, inicialmente como *Pasteurella parahaemolytica*.

Tal fato também foi constatado por Takikawa (1958), que isolou de fezes de pacientes com gastroenterite, uma bactéria que mostrava propriedades análogas às descritas como *P. parahaemolytica*, evidenciando o caráter halofílico e identificando o organismo como sendo do gênero *Pseudomonas* Miyamoto et al. (1961), propuseram a criação de um novo gênero, o *Oceanomonas*.

A propriedade química, cultural e morfofisiológica da bactéria foi estudada intensamente obtendo-se uma similaridade muito grande com o gênero *Vibrio*, sendo proposta a denominação de *Vibrio parahaemolyticus* por Sakazaki et al. (1963),

Desde o seu primeiro isolamento o microrganismo tem sido implicado no Japão em 1000 surtos/ano, sendo responsável por 45-70% dos casos de doenças transmitidas por alimentos neste país, segundo Fujino et al. (citados por Hackney & Dicharry, 1988).

O *V. parahaemolyticus* tem uma larga distribuição no ambiente costeiro e de estuário sendo isolado de muitas espécies de peixes, mariscos e crustáceos (Bryan, 1980; Elliot et al., 1998).

2.3.6.2. Características Morfofisiológicas e Bioquímicas

O *V. parahaemolyticus* é uma bactéria anaeróbia facultativa com metabolismo respiratório e fermentativo, morfológicamente é um bastonete curvo,

Gram negativo, mostrando pleomorfismo, sendo móvel por meio de flagelo polar. Multiplica-se em substrato com salinidade não inferior a 1% e não superior a 8% de NaCl, é diferenciado do *V. vulnificus*, por crescer em meios contendo NaCl a 8%, pela sua capacidade de fermentar arabinose e não a celobiose, lactose e salicina. *V. parahaemolyticus* não se desenvolve em 10% de NaCl, não produz acetoina e não fermenta a sacarose, enquanto o *V. alginolyticus* é positivo nesses três testes (Twedt, 1989).

A temperatura ótima de crescimento de *V. parahaemolyticus* em laboratório é de 37°C, podendo se desenvolver na faixa de 22 a 14°C, mas não a 2°C, o pH de desenvolvimento é de 5 a 11, sendo o ótimo de 7,5 a 8.5 (Nickelson & Vanderzant, 1971; Beuchat, 1973;).

2.3.6.3. A Doença no Homem

O *V. parahaemolyticus* é conhecido como causador de gastroenterite no homem desde 1950. Tipicamente, a doença ocorre em pessoas que ingerem alimentos do mar, crus ou cozidos indevidamente, contaminados pela bactéria (Twedt, 1989; West, 1989).

Clinicamente, os sintomas da doença produzidos pelo microrganismo incluem: diarreia, dor abdominal, náusea, vômito, dor de cabeça, febre baixa e calafrios, com um período de incubação entre 4 a 96 horas (Morris Jr & Black, 1985; Twedt, 1989).

A duração da doença é usualmente curta, autolimitante, podendo ocorrer hospitalização. Na maioria dos casos ela é normalmente tratada com terapia de reidratação podendo, contudo, ser fatal em pequena porcentagem dos casos, principalmente, em pacientes imunocomprometidos (Blake et al., 1980).

As infecções extraintestinais causadas por *V. parahaemolyticus* têm sido pouco freqüentes, muito embora tenham sido relatadas e estão sempre associadas à exposição ao ambiente marinho ou com a manipulação de alimentos

contaminados provenientes do mar (Fishbein & Wentz, 1973; Blake et al.,1980; Sautter et al.,1988).

2.3.6.4. Aspectos Epidemiológicos e Ecológicos

O *V. parahaemolyticus* é evidentemente um microrganismo de vida livre encontrado em muitos oceanos, onde indiscutivelmente goza de um tipo de nutrição saprofítica, juntamente com outros microrganismos marinhos similares. É encontrado em águas marinhas e sedimentos, na superfície de guelras, nadadeiras e vísceras de peixes saudáveis, moluscos e crustáceos. Do mesmo modo tem sido responsável por doenças em moluscos e camarões; a presença de *V. parahaemolyticus* nestes e em, provavelmente, muitos outros alimentos marinhos nos dá o suporte para aceitá-lo como uma realidade ecológica (Fishbein & Wentz, 1973).

Segundo Yam et al.(1999) o *V. parahaemolyticus* é um microrganismo inerente do ambiente marinho e por esta razão, o monitoramento dessa bactéria no ambiente é um atributo mais importante do que a quantidade do patógeno.

Levantamento realizado por Bryan (1980), demonstrou que nos Estados Unidos durante os anos de 1970 a 1978, ocorreram 11 surtos confirmados de gastroenterite por *V. parahaemolyticus* tendo sempre como veículo o alimento de origem marinha e como fatores contribuintes, a contaminação cruzada e/ou a refrigeração inadequada.

Wong et al. (1992), isolaram vibrios de alimentos marinhos, sendo que alguns deles foram obtidos de aquicultura. Observaram que *V. parahaemolyticus* estava presente em todos os alimentos pesquisados.

Pan et al. (1997) realizaram em Taiwan de 1986 a 1995 um levantamento dos surtos de doenças transmitidas por alimentos e observaram que de 852 surtos relatados e confirmados, 555 foram causados por bactérias e que a mais comumente implicada foi o *V. parahaemolyticus* (35,5%). Os pesquisadores

constatarem também que este número de episódios causados por este microrganismo tem aumentado desde 1990.

Na África, Schandevyl et al. (1984), isolaram vibrios halofílicos de peixes capturados em Dakar, durante os meses de Julho a Outubro onde a espécie mais comumente isolada foi *V. parahaemolyticus*.

Amostras de sedimento, água, frutos do mar de Grays Harbor, o maior estuário produtor de ostras do estado de Washington, foram analisados por Kaysner et al. (1990b) para a pesquisa de *Vibrios* spp. O *V. parahaemolyticus* foi observado em todas as amostras, embora em contagens baixas, e a sua presença em todas as amostras não foi surpresa para os pesquisadores, os quais haviam encontrado em pesquisas anteriores alta incidência do microrganismo em estuários a noroeste do Pacífico.

Klontz et al. (1993), estudaram a relação entre os níveis de vibrios detectados em ostras cruas coletadas na baía de Apalachicola (Flórida) e as infecções causadas por vibrios entre os residentes das áreas próximas a área de coleta. Cinco das seis espécies de *Vibrio* implicadas em ostras associadas com a doença foram recuperadas de ostras cruas compradas no mercado onde *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* não O1 e *V. fluvialis* mostraram presentes em 60% nas ostras associadas a infecções.

Uma pesquisa com possíveis vibrios em águas do rio Ohta e da costa de Hiroshima (Japão), foi realizada por Venkateswaran et al. (1989), onde observaram que 18% dos vibrios isolados eram *V. parahaemolyticus* e que destes, três representavam um local com somente água doce e o restante das cepas eram de água do estuário. O mecanismo pelo qual *V. parahaemolyticus* foi encontrado em somente água doce mostrou-se desconhecido.

Bhaskar et al. (1998) estudaram a prevalência de bactérias patogênicas em fazendas de cultivo de camarões na Índia. Analisaram amostras de camarões, água, sedimentos e do alimento oferecido a estes crustáceos. O *V. parahaemolyticus* ocorreu em todas as amostras durante o cultivo e também após a colheita. Análise de coliformes fecais e coliformes totais também foi realizada e

os autores não encontraram uma correlação entre os índices de coliformes e a presença de vibrios.

Na cidade do México, 389 amostras de pescado obtidas no comércio, foram estudadas por Rendón et al. (1998), para verificar a presença de *V. parahaemolyticus*). Os autores não obtiveram resultados positivos em seus isolamentos, e acreditam que a microflora associada ao *V. parahaemolyticus* influenciou notadamente nos resultados obtidos, assim como a tomada de somente 10 gramas do pescado para a realização dos ensaios, deve ter diminuído a probabilidade de isolamento da bactéria.

Chan et al. (1989), pesquisaram a prevalência de *V. parahaemolyticus* e outros vibrios halofílicos em 295 amostras de alimentos de origem marinha, coletados em mercados de Hong-Kong (China). Observaram que *V. alginolyticus* foi a espécie constantemente isolada, seguida por *V. parahaemolyticus*, *V. harvey*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. pelagius*, *V. campebelli*, *V. splendidus* e *V. marinus*. Os autores enfatizam que a ubiquidade e as concentrações relativamente altas de *V. parahaemolyticus* constituíram-se em fator de risco potencial de saúde pública em Hong-Kong e outros países subtropicais da Ásia.

A distribuição de *V. parahaemolyticus* na baía de Chesapeake (EUA) foi estudada por Colwell et al. (1973), concluindo que a presença da bactéria estava associada com o plâncton, pois sua ocorrência na coluna de água é paralela com o surgimento do plâncton. Relatam também, que a distribuição do microrganismo estava restrita a regiões de estuário e costa das zonas temperadas.

Na Indonésia, Molitoris et al. (1985), isolaram *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* de amostras de água da baía e de alimentos marinhos do mercado de Jacarta. Os pesquisadores observaram que a incidência de *V. parahaemolyticus* aumentava durante as estações de seca, concluindo que os microrganismos são autóctones na água do mar e que podem ser, freqüentemente, isolados de alimentos marinhos na naquele país.

Com o objetivo de estudar a prevalência de patógenos entéricos, incluindo o *V. parahaemolyticus*, Yam et al. (1999), coletaram amostras de fezes de

pacientes com diarreia, água do mar e de alimentos marinhos. Foram analisados e comparados seus sorotipos com os do ambiente para observar se havia características patogênicas particulares, onde o vibrio mais comumente isolado, tanto das amostras clínicas quanto das do ambiente, foi o *V. parahaemolyticus*. Os autores não detectaram características significantes entre os isolados clínicos com aqueles do meio ambiente.

Chiou et al. (2000), observaram que *V. parahaemolyticus* foi o agente causal de 61 a 71% do total de doenças transmitidas por alimentos em Tawain no período de 1996 a 1999. Baseando-se em técnicas de levantamento de surtos tendo como parâmetros análises de grupos etiológicos, demonstraram que *V. parahaemolyticus* sorovar O3:K6, foi o responsável pela alta incidência de toxinfecção durante estes quatro anos. Os autores concluem que devido a sua frequência extremamente alta e a capacidade de se espalhar globalmente, este organismo precisa ser intensa e internacionalmente monitorado.

Com o propósito de descobrir qual o fator bacteriano da nova cepa de *V. parahaemolyticus* que estava relacionada com os casos de epidemia causada por este microrganismo, Nasu et al. (2000) compararam cepas de *V. parahaemolyticus* O3:K6 com *V. parahaemolyticus* não O3:K6, utilizando marcadores genéticos. Os resultados demonstraram a existência de um fago filamentosso associado à nova cepa do *V. parahaemolyticus* O3:K6, cuja função precisa ser esclarecida, podendo ser um novo fator de virulência para a bactéria.

No nordeste da Sicília, Maugeri et al. (2000), objetivando verificar a presença de *Vibrio* spp em lagoas de água salgada, que são utilizadas como fazenda de marisco, coletaram amostras de suas águas e dos mariscos. Foram detectados *V. fluvialis* (55 cepas), *V. alginolyticus* (40), *V. parahaemolyticus* (11), *V. vulnificus* (10) e *V. mimicus* (9). Concluíram que o isolamento de *Vibrio* potencialmente patogênico a partir de mariscos cultivados, torna-se um risco para a saúde do consumidor, e que um programa de monitoramento de microrganismos desse gênero deve ser observado.

Flores & Abuxapqui (1996), estudando a prevalência de bactérias mesófilas em alimentos marinhos comercializados em restaurantes da cidade de Mérida (México), isolaram *V. parahaemolyticus* de 2,1% das 284 amostras analisadas.

No Peru, Guevara Ducan et al. (1989), pesquisaram a presença de *V. parahaemolyticus* em ceviches vendidos por ambulantes na cidade de Lima durante os meses de dezembro a fevereiro e, das 74 amostras analisadas, 27,03% foram positivas para o microrganismo pesquisado.

Este fato também foi observado por Garcia Cortés & Antillon (1990), que avaliaram a presença de vibrios patogênicos em moluscos bivalves e no lodo do golfo de Nicoya (Costa Rica), identificando 224 cepas de *V. parahaemolyticus* provenientes de 15 amostras de moluscos e 22 do lodo.

2.3.6.5. *V. parahaemolyticus* no Brasil

Considerando que o Brasil é banhado por um litoral tipicamente tropical e influenciado por correntes oceânicas, que se aproximam bastante da costa gerando uma grande diversidade de vida marinha bastante importante como fonte de alimento para a população e tendo em vista a importância em relação à saúde pública que o *V. parahaemolyticus* representa, poucas são as investigações sobre a ocorrência deste microrganismo nos alimentos e no nosso ambiente marinho.

No Brasil, Leitão (1969/1970) estudou a resistência térmica e caracterização de culturas de *V. parahaemolyticus* por eletroforese em gel, relacionando as variações de formas de enzimas proteolíticas com a diferenciação entre as culturas estudadas.

Leitão & Arima (1975), estudaram a ocorrência e avaliaram alguns métodos de isolamento de *V. parahaemolyticus* em amostras de água e sedimento do litoral de São Paulo. Obtiveram uma incidência média do microrganismo de 38,3% do total das amostras coletadas, sendo maior durante os meses de verão e constataram que o caldo GSTB proporcionou o melhor isolamento quando comparado com TSBS + 7%NaCl.

Leitão et al. (1976), avaliaram a incidência de *V. parahaemolyticus* em amostras de moluscos, peixes e crustáceos coletados no litoral do Estado de São Paulo e constataram que 100% das amostras de ostras estavam contaminadas, sendo que nos peixes a contaminação foi de 3,3% enquanto que nos crustáceos foi de 6,6%.

Barros & Vianni (1980), pesquisaram a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em águas da Baía da Guanabara (RJ), constatando que 61,6% das amostras coletadas estavam contaminadas pelo microrganismo.

Hofer & Silva (1986), analisaram amostras de peixes capturados na faixa de litoral desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, encontrando uma incidência de 54,8% de *V. parahaemolyticus*.

Com o propósito de investigar a incidência de *Vibrio* spp em água e ostras da baía de Sepetiba (RJ), 30 amostras de ostras e água foram coletadas durante um ano. Foram isoladas 576 cepas de *Vibrio* spp sendo identificadas 7 espécies de vibrio: *V.cholerae* não O1, *V.alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V.fluvialis*, *V.harvey*, *V.damsela* e *V.vulnificus*. Foi constatado uma grande similaridade entre as espécies isoladas dos bivalves e as encontradas na água (Rodrigues & Hofer 1986).

Sousa (1989), estudou a incidência de *V. parahaemolyticus* em águas costeiras, carne de caranguejo e ostras em João Pessoa (PB), obtendo os seguintes índices de contaminação: 42,9%, 26,7% e 93,3%, respectivamente. Observou também uma tendência entre o local de coleta das amostras de água do mar com a época e a temperatura das águas.

Investigando a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em alimentos marinhos frescos, congelados e resfriados, coletados no litoral Norte de São Paulo, e em mercados das cidades de Campinas (SP) e Piracicaba (SP), durante o inverno e verão de 1988 a 1990, Cardoso (1990) concluiu que dentre os alimentos pesquisados a presença de *V. parahaemolyticus* nos moluscos são de maior importância com relação à saúde pública, pelo fato de serem em muitos casos

ingeridos sem uma cocção prévia e que a presença da bactéria em produtos refrigerados requer cuidados higiênicos na obtenção, distribuição e manipulação.

Magalhães et al. (1991a), estudaram a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em 1100 amostras de fezes diarréicas submetidas a coprocultura em Recife (PE). Os pesquisadores não evidenciaram correlação entre a sazonalidade e o aparecimento do microrganismo. As bactérias foram isoladas em 1,3 % das amostras examinadas, sendo que estas representavam todos os espécimes aquosos de pacientes adultos chegando a conclusão de que *V. parahaemolyticus* é importante causa de diarréia aquosa em adultos no Recife.

Em um estudo comparativo, Magalhães et al. (1991b), investigaram as características bioquímicas, sorológicas e produção de hemolisina direta termoestável (TDH), entre as cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de fezes e as provenientes de ostras no Recife. Encontraram uma concordância entre as cepas e as características bioquímicas onde nenhuma cepa isolada das ostras foi produtora da hemolisina. Não houve, porém, uma similaridade entre os sorovares que ocorriam nas cepas dos casos clínicos com os daqueles recuperados das ostras, demonstrando assim uma provável diversidade de origem.

Rodrigues et al. (1993), pesquisaram características relacionadas com infectividade em cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* e *V. mimicus*, isoladas de alimentos marinhos e água do mar provenientes da cidade do Rio de Janeiro. O estudo demonstrou a presença de toxina, alguns componentes de natureza enzimática e compostos com atividade citolítica e proteolítica. As atividades enzimáticas analisadas mostraram resultados variáveis em todas as cepas.

A presença de *Vibrio parahaemolyticus* foi estudada por Vieira & Iaria (1993) em amostras de cauda de lagosta provenientes da Feira de Pescado do Mucuripe (CE), colhidas em 1988 e 1990 e de uma indústria pesqueira. Verificaram que 62,5%, 56,2% e 12,5% das amostras respectivamente encontravam-se contaminadas com NMP variando de <3,0 a 21,0, <3,0 a 6,1 e <3,0 a 4,0/g.

No município de Palhoça em Santa Catarina, Archer & Moretto (1994) verificaram a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em amostras de mexilhões procedentes de banco natural, em 52,5% das amostras e com NMP entre <3 e 93/g, sendo que nenhuma delas apresentou positividade para o teste de patogenicidade.

Theophilo & Vieira, (1994), pesquisaram a possível presença de *V. parahaemolyticus* em 24 amostras caranguejos crus e cozidos comercializados em barracas de praia em Fortaleza (CE), constatando a presença da bactéria em 75% das carnes cruas e 20,8% das cozidas, sendo que o teste de patogenicidade foi negativo para todas as amostras testadas.

A distribuição de *Vibrio* spp em mexilhões coletados em Ubatuba (SP), durante um ano, foi estudada por Matté et al. (1994a), os quais verificaram a presença de *V. parahaemolyticus* em 92% das amostras e cujos NMPs variaram de <3 a 24000/100g.

A possível presença de *Vibrio* spp patogênicos emergentes, contaminante de frutos do mar, consumidos na cidade de São Paulo, foi investigado por Landgraf et al.,(1996), que analisaram 100 amostras divididas entre ostras, mexilhões e camarões, encontrando 60% de positividade para *V. parahaemolyticus*.

2.3.6.6. Aspectos relacionados a patogenicidade

A patogenicidade do *V. parahaemolyticus*, vem sendo relacionada à produção de uma hemolisina direta termoestável (TDH) que está associada ao fenômeno de Kanagawa, que é observado pela capacidade de produção de β -hemólise em meio de ágar Wagatsuma. TDH tem sido encontrada em quase todas as cepas de *V. parahaemolyticus* de isolados clínicos, mas raramente em cepas isoladas do ambiente (Sakazaki et al.,1968).

Honda et al. (1988) purificaram e caracterizaram uma hemolisina produzida por *V. parahaemolyticus*, proveniente de uma amostra clínica, com fenômeno de

Kanagawa negativo, a qual era relacionada imunologicamente com TDH, mas significativamente diferente nas características físico químicas e atividade lítica frente a eritrócitos de várias espécies animais, denominando-a de hemolisina direta termoestável relacionada (TRH) com TDH. Ambas TDH e TRH, são consideradas como importantes fatores de virulência para o *V. parahaemolyticus*.

A relação entre a produção de TDH e a habilidade de cepas de *V. parahaemolyticus* produzirem urease foi relatada por Kaysner et al. (1994) os quais observaram que todas as cepas que transportavam o gene TDH (*tdh*) de isolados clínicos e do meio ambiente eram urease positivas. Concluíram que o teste de hidrólise da uréia é simples podendo ser útil para a identificação de *V. parahaemolyticus* patogênico, mas não relataram a detecção do gene TRH.

Osawa et al. (1996), observaram a presença de cepas urease positivas (UH⁺) e sua relação com o aparecimento de genes *tdh* e *trh*, em uma pesquisa com o *V. parahaemolyticus* e concluíram que a presença de cepas UH⁺ pode ser usadas como indicadoras da possível presença do gene *trh* nessa bactéria, mas não confirmam sua presença.

Pace & Chai (1989), estudando cepas de *V. parahaemolyticus* K⁺ e K⁻, observaram que a patogenicidade dessa bactéria pode estar relacionada com a composição do envelope celular, que pode variar dependendo da cepa e das condições de cultura.

Okuda et al. (1997), relatam o aparecimento de uma nova cepa de *V. parahaemolyticus* O3:K6 TDH-positivo, TRH-negativo e UH-negativo, prevalente em Calcutá (Índia) e em alguns países do sudeste da Ásia e sugerem a existência de um fator de virulência que merece ser estudado.

Nasu et al. (2000), isolaram um fago filamentoso na nova cepa de *V. parahaemolyticus* O3:K6, que pode estar associado a um novo fator de virulência da bactéria.

2.3.6.7. Isolamento e Identificação

De acordo com a 8ª edição do BAM, 1998, o método utilizado pelo FDA para a enumeração de *V. parahaemolyticus* é o do Número Mais Provável (NMP), com um enriquecimento em água peptonada alcalina, seguido de plaqueamento em agar seletivo TCBS. As colônias típicas têm coloração esverdeada, característica daquelas que são sacarose negativa e utilizadas para os testes bioquímicos confirmativos.

A eficiência de dois meios líquidos e dois meios sólidos para a recuperação e contagem de *V. parahaemolyticus*, foi comparada por Peterson (1979), sendo os caldos Teepol sal glicose (GSTB) e Horie (HB) e os ágaros TCBS e Amarelo alizarina e Azul água (WB). O autor concluiu que os meios sólidos tiveram uma boa recuperação quando utilizaram o caldo HB, sendo que a combinação HB-WB foi a mais eficiente.

Kaper et al. (1980), desenvolveram um meio para identificação rápida e presuntiva do *V. parahaemolyticus* reduzindo, assim, o tempo, o trabalho e os custos envolvidos. Utilizando um único tubo de ensaio contendo o meio observaram que era possível a fermentação de manitol, sacarose e lactose, hidrólise da arginina, produção de indol, gás e H₂S.

Karunasagar et al. (1986) testaram diferentes caldos de enriquecimento e observaram que não houve uma diferença significativa na enumeração de *V. parahaemolyticus*, nos meios estudados, mas relataram que uma boa contagem de *V. parahaemolyticus* em alimentos marinhos pode ser obtida com o plaqueamento direto em TCBS.

Um método para enumeração de células injuriadas de *V. parahaemolyticus*, que consiste na utilização da técnica da membrana filtrante hidrofóbica (ISO-GRID) e do o ágar VP sacarose (VPS), um novo meio seletivo e específico que se revelou uma alternativa para o método convencional foi proposto por Entis & Boleszcuk (1983).

Para uma rápida detecção de *V. parahaemolyticus*, Miyamoto et al. (1990), propuseram um novo e seletivo meio de cultura, onde *V. alginolyticus* e *V.harvey* não crescem e em seguida a sua detecção utilizando um substrato fluorogênico. Em um tempo total de dez horas foi possível a detecção de até 10 células de *V. parahaemolyticus* por grama de alimento marinho analisado.

Comparando o método convencional e um método fluorogênico para a detecção de *V. parahaemolyticus*, Venkateswaran et al. (1996) concluíram que o método fluorogênico é uma metodologia rápida e simples para a detecção de *V. parahaemolyticus*, mas devido a um grande número de resultados falso positivo a detecção direta de *V. parahaemolyticus* em alimentos marinhos não foi possível através deste método.

Hagen et al. (1994), realizaram um estudo comparando a capacidade de recuperação de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, utilizando Caldo Sal polimixina B (SPB) e água peptonada alcalina (APA), observando que o meio de enriquecimento utilizando este ultimo é capaz de detectar níveis baixos de *V. parahaemolyticus* recomendando assim a utilização do mesmo.

Baseado em métodos rápidos de detecção, Kaysner et al. (1994), propõem o isolamento e enumeração de *V. parahaemolyticus* em alimentos utilizando a técnica de membrana filtrante com filtros hidrofóbicos (HGFM), onde foi possível a diferenciação de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* utilizando a combinação de HGFM e prova de hibridização de DNA.

2.3.6.8. Controle de *V. parahaemolyticus* em Alimentos

Os alimentos de origem marinha podem ser considerados como fontes para a veiculação de *V. parahaemolyticus*, sendo este microrganismo um dos que já foi demonstrado estar presente em muitos ambientes costeiros, incluindo frutos do mar, lagosta, águas e sedimento.(Colwell et al., 1973; Leitão & Arima, 1975; Molitoris et al., 1985; Kaysner et al., 1990a,b; Vieira e Iaria, 1993; Matté et al., 1994a,b).

Vários estudos têm demonstrado que *V. parahaemolyticus* não se desenvolve bem em temperaturas de refrigeração quer seja em meios de cultura ou em alimentos marinhos (Gotcher et al., 1974; Beuchat et al., 1975; Boutin et al., 1985).

A temperatura é um fator preponderante para o desenvolvimento do *V. parahaemolyticus* e vários estudos têm demonstrado que este microrganismo não se desenvolve bem sob refrigeração, em intervalos de 0–5°C, e isto poderá ser utilizado como um método de controle (Beuchat et al., 1975; Boutin et al., 1985). Para Gotcher et al. (1974) além da viabilidade à temperatura de 5°C, constataram que a sobrevivência do *V. parahaemolyticus* dependia da cepa e do número de bactérias contaminantes.

Thomson & Tracer (citados por Sousa 1989), evidenciaram uma rápida multiplicação do *V. parahaemolyticus* quando ostras eram estocadas a 8°C perdendo a viabilidade nas temperaturas de 0° a 4°C.

A sobrevivência e o desenvolvimento de *V. parahaemolyticus* à 5°C em carne picada e surumi, feitos a partir de pescada polonesa, foram avaliados por Igham & Potter (1988) os quais observaram que este microrganismo se desenvolveu sob estocagem a 25°C mas não a 5°C quando as amostras foram adicionadas de sal. Porém, não verificaram crescimento nas diferentes temperaturas quando a quantidade de sal foi reduzida. Os resultados indicaram que a quantidade de sal utilizada nas preparações pode afetar o crescimento do patógeno.

Além da refrigeração, o aquecimento pode ser utilizado no controle de microrganismos. Para Beuchat (1982), a susceptibilidade à inativação por aquecimento depende do tipo de substrato no qual os microrganismos se encontram durante o tratamento térmico.

Segundo Delmore Júnior & Criley (1979), a resistência térmica de nove diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* em um homogeneizado de molusco variou nas temperaturas de 49°C a sua letalidade em minutos era de 39 a 70; a 51°C de 26 a 54, a 53° de 12 a 31 e a 55° de 3 a 24.

A resistência térmica deste microrganismo também foi alvo de pesquisa feita por Leitão (1969/1970), através do método de tubos, com cultura de 24 horas em água peptonada a pH 7,2. O valor $D_{62,7}$ foi de 38,2 minutos, $D_{65,7}$ foi igual a 2,01 minutos e $D_{67,7}$ foi de 0,51 minutos.

A utilização de sanificantes pode auxiliar o controle de contaminação por *V. parahaemolyticus* em alimentos.

A utilização de agentes químicos na sanitização de carcaças de animais recém abatidos destinados ao consumo humano tem sido bastante estudada, sendo seu principal objetivo a eliminação de patógenos aumentando, assim, a sanidade e a vida de prateleira da carne.

Beuchat (1980) observou os efeitos dos ácidos graxos e seus ésteres de glicerol e sacarose, sorbato de potássio e benzoato de sódio sobre o crescimento de *V. parahaemolyticus* em meio com pH 6,7. Concluiu que os primeiros possuem um potencial conservante para alimentos pouco ácidos ou alcalinos e pobres em lipídios e não são preservados pela ação antimicrobiana do sorbato de potássio e do benzoato de sódio.

De acordo com a legislação vigente, os ácidos orgânicos são classificados como conservadores ou como acidulantes e não como sanificantes, portanto definidos como substâncias que são adicionadas aos alimentos com a finalidade de impedir ou retardar a ação microbiana ou enzimática, protegendo o alimento contra a degradação

O vinagre comercial contém ácido acético em uma concentração mínima de 4% e o seu mecanismo de ação como de um ácido orgânico, segundo Cherrington et al.(1991) seria pela alteração do DNA da bactéria.

A eficiência e superioridade do vinagre quando comparada a de outros santificantes foi observada por Leitão et al. (1981) na redução de coliformes totais e por Eiroa & Porto (1995 e 1996) em *V.cholerae* O1 como contaminantes de folhas de alface.

Porto & Eiroa (1997) estudaram a influência de diferentes tipos de vinagre e do suco de limão na redução da população de *V.cholerae* O1 em filés de merluza contaminados artificialmente e evidenciaram a efetividade dos mesmos.

D'Aquino & Teves (1994) obtiveram resultados satisfatórios quando utilizaram o suco de limão na desinfecção de água potável contaminada com *V.cholerae*.

O limão possui uma mistura de ácidos orgânicos de cadeia curta, dentre eles o ácido cítrico que possui atividade antimicrobiana devido as moléculas não dissociadas. O provável mecanismo de inibição pode ser devido à interferência tanto no transporte de substrato quanto na fosforilação oxidativa do transporte de elétrons (Mendes et al., 1999).

A ação do suco de limão sobre coliformes e *V. parahaemolyticus* em ostras "in natura" foi estudada por Mendes et al. (1999), que não observaram efeito inibidor deste sobre a bactéria e um efeito positivo sobre os coliformes após 40 e 60 segundos de exposição.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Avaliação Microbiológica

3.1.1. Amostragem dos moluscos

As amostras de moluscos, aproximadamente 2 Kg, 100 unidades, de “chumbinho” (*Anomalocardia brasiliiana*, Gmelin, 1791) (Figuras 6 e 7), foram extraídas de banco natural de bivalves com o auxílio de pás, a uma profundidade máxima de sete centímetros, das praias do município de Salinas da Margarida, região de intensa produção extrativista de mariscos, localizada na Baía de Todos os Santos, BA.

Estas foram colhidas nas marés baixas, no período de abril de 2000 a março de 2001, perfazendo um total de 31 colheitas, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável, até o momento da análise, que não ultrapassava sete horas.

3.1.2. Amostragem da água do mar

As 31 amostras de água do mar (100 a 150 mL) foram colhidas durante a marés baixas, em frascos estéreis, de boca larga, com capacidade para 150 mL e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclado e transportadas para o laboratório em um período máximo de sete horas. No momento da colheita foi medida a temperatura superficial da água com o auxílio de termômetro com precisão de 0,5°C. Os valores de salinidade da água do mar foram fornecidos pela estação de maricultura local e os valores de pH foram tomados com o uso de potenciômetro, no laboratório, após a análise microbiológica.

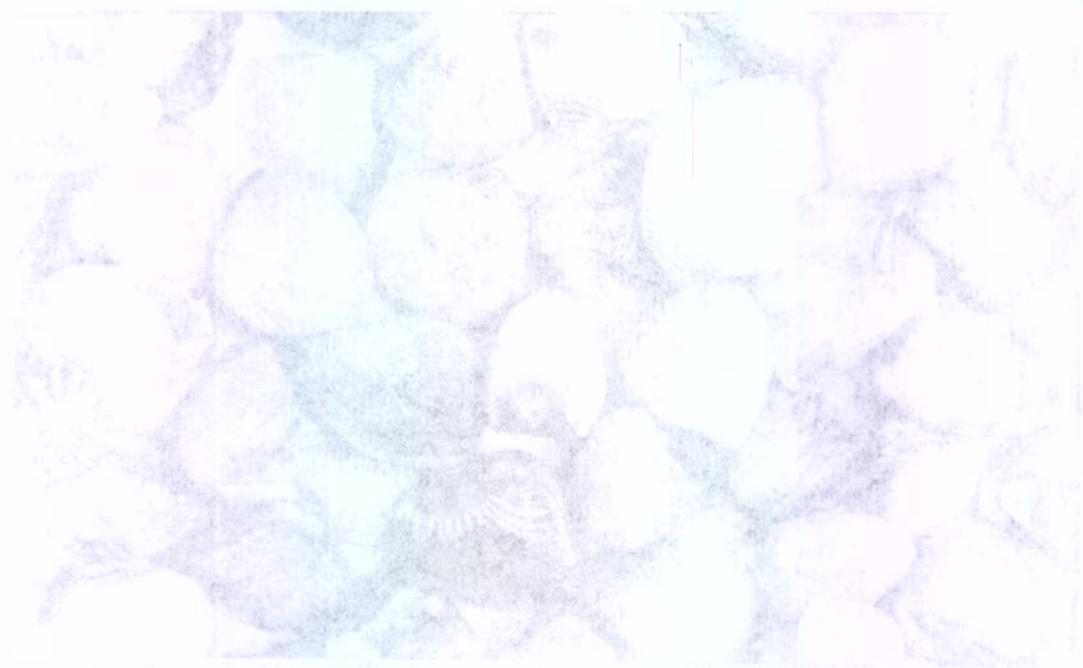


Figure 1. Histological section showing a dense population of cells with prominent nuclei and some mitotic figures. A small rectangular box highlights a specific area in the upper right quadrant.



Figure 2. Histological section showing a large, irregularly shaped mass of cells with a high degree of cellular pleomorphism and numerous mitotic figures. The cells are arranged in a disorganized pattern.

3.1.3. Amostragem do sedimento

As 31 amostras do sedimento (areia), aproximadamente 200g, foram colhidas com o auxílio de pás, nos mesmos locais onde foram capturados os moluscos e acondicionadas em sacos coletores estéreis Whirl-Pak, (Nasco) com capacidade de 500g e transportadas ao laboratório, dentro de um período máximo de sete horas, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

3.2. Preparo das Amostras

Moluscos

No laboratório, as conchas foram lavadas e escovadas sob água potável corrente para remoção de todo o material depositado em sua superfície, em seguida foram enxaguadas com água destilada e depositadas sobre papel toalha estéril para secagem rápida à temperatura ambiente.

Os animais estavam vivos e com as conchas unidas firmemente e sua abertura foi realizada com auxílio de faca pontiaguda estéril, que foi inserida entre as conchas na posição ventral. Logo após a secção do músculo adutor, o líquido e 100g de carne, provenientes de mais ou menos 100 moluscos, foram coletados em frasco estéril e transferidos para uma jarra onde foram homogeneizados por 60 segundos.

Sedimento

Para as 31 amostras do sedimento, após processo de decantação que foi realizado no próprio saco da colheita, o excesso de água foi retirado por escoamento e então pesava-se 25 g do "lodo" restante (Vanoy et al., 1992).

Água

As 31 amostras de água foram homogeneizadas no próprio frasco de colheita.

3.3. Isolamento e Identificação de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

3.3.1. Enriquecimento

A técnica utilizada foi a preconizada por Elliot et al (1998) onde alíquotas de 25g do homogeneizado de moluscos (3.2) e do sedimento (3.2), foram transferidas para um frasco contendo 225 mL de salina fosfatada tamponada (PBS), obtendo-se assim a diluição inicial a 10^{-1} . A partir desta, foram preparadas diluições decimais subseqüentes até 10^{-3} neste mesmo diluente. Em seguida, 1 mL de cada diluição foi inoculado em uma série de três tubos por diluição, contendo 10 mL de água peptonada alcalina 1%.

Para as amostras de água, 10 mL foram transferidos para um frasco contendo 90 mL de PBS, obtendo-se a diluição 10^{-1} que deu origem as diluições subseqüentes até 10^{-2} neste mesmo diluente, em seguida 1 mL da água, sem diluição e das diluições foi inoculado na série de três tubos contendo 10 mL de água peptonada alcalina 1%.

3.3.2. Plaqueamento diferencial

Após o período de incubação de 16-18 horas a 35-37°C, de cada tubo positivo, isto é, com turbidez, foi semeada uma alçada por estrias em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) (Oxoid) e em Ágar Dodecil Sulfato de Sódio Polimixina B Sacarose (SDS), com a finalidade de obter um melhor isolamento de *V. vulnificus* (Bryant et al., 1987) seguido de incubação, a 35-37°C, em estufa comum, por 24 horas.

3.3.3. Confirmação preliminar

Depois de transcorrido o período de incubação, 2-3 colônias de coloração verde-azuladas com 2 a 3mm de diâmetro, indicativa de microrganismos não fermentadores de sacarose, em ágar TCBS e colônias redondas opacas, azuis a acastanhadas com 2 a 3 mm de diâmetro e rodeadas por um halo azul opaco em ágar SDS, foram identificadas presuntivamente através de crescimento em ágar Tríplice Açúcar e Ferro (TSI), com 2% de cloreto de sódio, a 35°C por 24 horas. Em seguida as cepas foram semeadas em tubo contendo ágar Tripticase de Soja (TSA) com 2% de NaCl inclinado e após 24 de incubação, em estufa comum, a 35°C, foram submetidas aos testes de motilidade e oxidase (Elliot et al 1998; Silva et al, 1997).

3.3.4. Confirmação definitiva

As cepas que apresentaram as características presuntivas de *V.parahaemolyticus* e *V.vulnificus* foram confirmadas através de provas bioquímicas complementares recomendadas por Elliot et al, (1998); Silva et al., (1997), como:

- I) teste de halofilismo: crescimento em 0, 3, 6, 8, e 10% de NaCl em Caldo Triptona a 1% suplementado com a quantidade adequada de NaCl e incubado a 35°C por 24 horas.
- II) Teste de crescimento a 42°C: crescimento em Caldo Triptona a 1% suplementado com 2% de NaCl e incubado a 35°C por 24 horas.
- III) Teste de fermentação de celobiose, sacarose, lactose, arabinose, manitol e salicina em Meio de OF com 2% de NaCl, com uma camada de vaselina estéril e incubado a 35°C por 24 – 48 horas.
- IV) Produção de indol: caldo Triptona a 1% suplementado com 2% de NaCl e incubado a 35°C por 24 horas.
- V) Teste de descarboxilase da lisina e ornitina e hidrólise da arginina: caldo Descarboxilase de Moeller com 2% de NaCl, com uma camada de vaselina estéril e incubados a 35°C por 24-48 horas.

Esquema detalhado do enriquecimento, isolamento e identificação está apresentado na Figura 8. Os resultados esperados nos vários testes realizados para a identificação das espécies estão apresentados no Quadro 1.

Para acompanhamento dos testes bioquímicos de identificação foram utilizadas as cepas controle de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (INCQS 00081) e de *V. vulnificus* ATCC 27562 (INCQS 00316) cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (RJ).



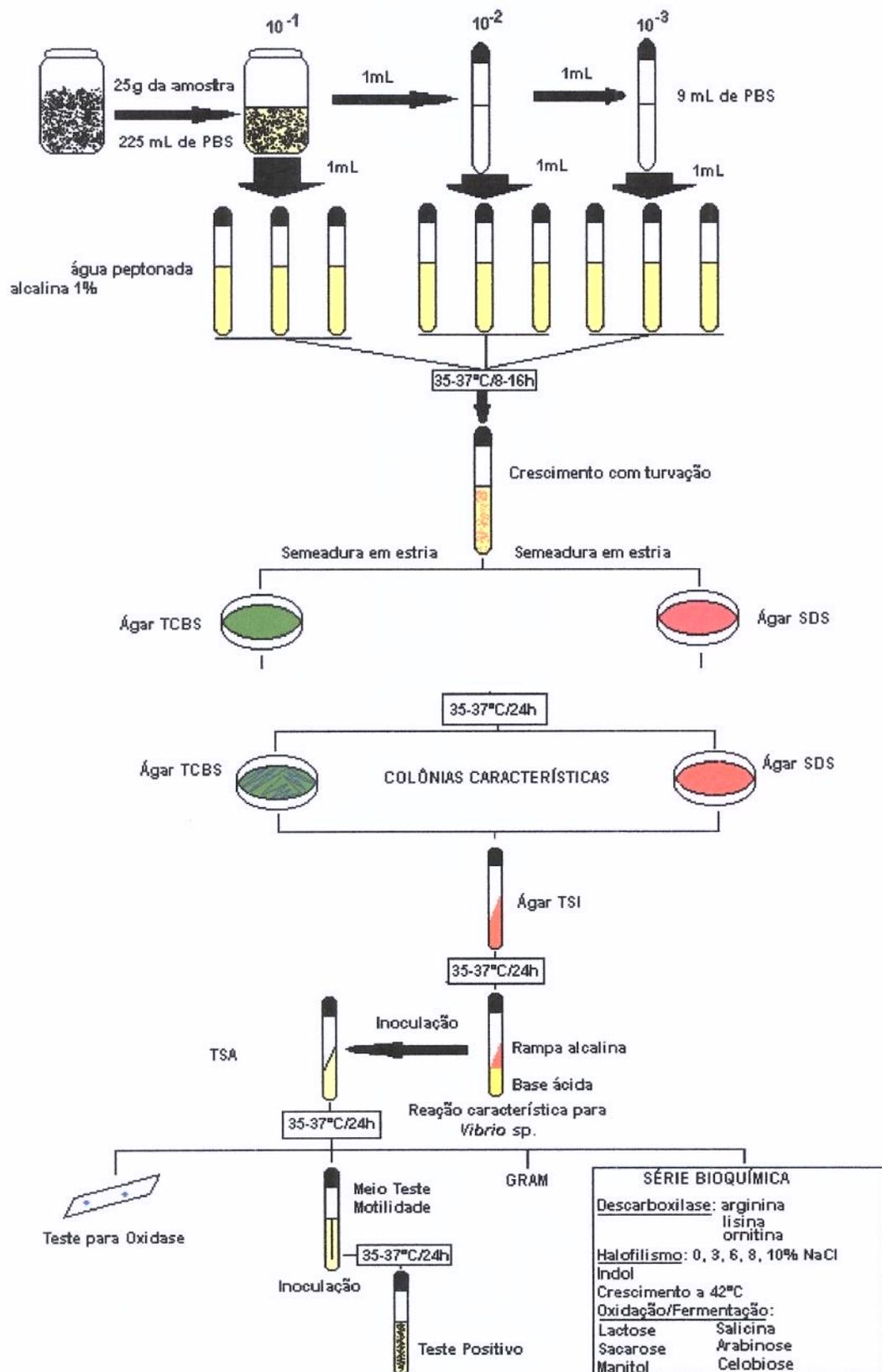


FIGURA 8. Esquema da metodologia utilizada para o isolamento e identificação de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em “chumbinho” e sedimento

QUADRO 1. Principais características bioquímicas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. (Adaptado de Elliot et al, 1998)

Testes	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>
Coloração Agar TCBS	verde	verde
Crescimento em:		
0% NaCl	-	-
3% NaCl	+	+
6% NaCl	+	+
8% NaCl	+	-
10% NaCl	-	-
Crescimento a 42°C	+	+
Ácido a partir de:		
Sacarose	-	-
D-Celobiose	-	+
Lactose	+	-
Arabinose	+	-
D-manose	+	+
D-manitol	+	v
Oxidase	+	+
Indol	+	+
Hidrólise da Arginina	-	-
Descarboxilase da Lisina	+	+
Descarboxilase da Ornina	+	+

TCBS- Tiosulfato citrato sais biliares e sacarose

+ -positivo - negativo v - variável

Após a identificação bioquímica foi utilizada a tabela do Número Mais Provável (NMP), para determinação do valor matemático (Silva et al.,1997). O cálculo da porcentagem de isolamento das espécies de vibrios presentes foi realizado considerando-se a ocorrência da espécie em pelo menos um dos meios de isolamento utilizados (TCBS ou SDS).

3.4- Teste de Kanagawa

Amostras de *V. parahaemolyticus* foram submetidas ao teste de patogenicidade (reação de “Kanagawa”). Para a realização do mesmo foram preparadas placas com Ágar Wagatsuma, contendo eritrócitos de coelho, e nas placas bem secas foram inoculadas uma gota de cultura de 18 horas em TSB, de *Vibrio parahaemolyticus*, em setores divididos de uma placa de Petri. Após incubação das mesmas à 35°C por 18 horas observou-se a ocorrência ou não de um halo transparente de beta-hemólise ao redor das gotas. A observação realizada após 24 horas de incubação não era válida para o teste (Fishbein & Wentz ,1973: Silva et al, 1997).

3.5. Caracterização Bromatológica do Molusco.

3.5.1. Preparo das Amostras do Molusco

Seguiu-se como descrito em 3.2., excetuando-se os cuidados com a assepsia.

3.5.2. Análises Físico-Químicas

Para a determinação de umidade (105°C), proteínas, lipídios e cinzas, que foram realizadas em triplicatas de amostras, seguiu-se os métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1984). Os dados de glicídios foram obtidos pelo cálculo de diferença das frações analisadas. O valor calórico total foi calculado a partir dos coeficientes calóricos correspondentes para proteínas lipídios e glicídios, respectivamente 4, 9 e 4 kcal/g.

3.6. Análise Estatística

A influência das variáveis ambientais medidas (temperatura, salinidade e pH), sobre a enumeração de *V. parahaemolyticus* foi examinada através da análise de regressão múltipla, considerando para os testes um nível de 5% de significância. A análise foi realizada com auxílio do programa STATISTICA 5 (Statsoft, Inc)

As contagens bacterianas foram ajustadas por transformação logarítmica para a normalização dos dados, através de software Excel.

3.7. Utilização de Ácidos Orgânicos no Controle de *V. parahaemolyticus*

3.7.1. Preparo do inóculo

Uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, foi utilizada como inóculo. A cultura foi mantida à temperatura ambiente em tubos contendo ágar Trypticase Soja (TSA) inclinado, contendo 3%NaCl, que foi repicada mensalmente com a finalidade de manter a viabilidade da mesma.

A cultura foi inoculada em 100 mL de Caldo Trypticase Soja (TSB) com 3% NaCl, a intervalos regulares de 30 minutos as amostras foram retiradas para determinação da população da bactéria através de contagem em placa, com a finalidade de se determinar a curva de desenvolvimento. A partir desta, foi estimado o tempo para a retirada de uma alíquota que fornecesse uma concentração ao redor de 10^6 – 10^7 /g.

A partir da cultura de 24 horas de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802 em caldo TSB 3% NaCl, um mL foi inoculado em 100 mL do mesmo caldo e incubado por 6 horas a 37°C. Em seguida, uma alíquota de 1,0 mL foi suspensa em um L de PBS 3% NaCl. Esta suspensão foi utilizada para contaminar os chumbinhos livres de suas cascas.

3.7.2. Preparo das Amostras e Inoculação

As conchas dos moluscos foram lavadas em água corrente com auxílio de uma escova para retirada de todo material aderido a elas. A seguir foram submetidos a um escaldamento em água fervente por mais ou menos 20 minutos, para abertura das conchas e facilitar a remoção da carne dos moluscos, simulando desta forma o que é realizado pelas mariscadeiras para a comercialização dos moluscos. A carne retirada das conchas foi depositada em frasco estéril.

Para a contaminação, porções de 100g de chumbinho foram inoculadas com a suspensão de *Vibrio parahaemolyticus* numa proporção 1:1 (v/p), seguindo-se uma homogeneização manual a intervalos regulares, durante 30 minutos. Em seguida, estes foram retirados e escorridos e colocados em frascos estéreis permanecendo nestes pelo mesmo período de tempo.

3.7.3. Tratamento com Vinagre e Suco de Limão

Para este experimento utilizou-se vinagres de álcool e vinho branco de mesma marca comercial e suco de limão Taiti puro, adquiridos no mercado.

Três porções de 25g de “chumbinho” contaminados com *V. parahaemolyticus* foram colocadas em 30mL de vinagre puro ou suco puro de limão e depois de transcorrido um período de 30 minutos, segundo método recomendado por Porto & Eiroa (1997), estas foram retiradas para a avaliação microbiológica, através de testes em triplicata.

3.7.4. Determinação de *Vibrio parahaemolyticus*

A determinação de *V. parahaemolyticus* foi realizada segundo a técnica do Número Mais Provável preconizada por Elliot et al. (1998). Para isto, alíquotas de 25g dos moluscos foram transferidas para um copo de homogeneizador estéril contendo 225mL de salina fosfatada tamponada (PBS), e homogeneizado por 60

segundos, obtendo-se assim a diluição inicial a 10^{-1} . A partir desta foram realizadas diluições decimais subsequentes até 10^{-6} , neste mesmo diluente. Um mL de cada diluição foi inoculado em série de três tubos de diluições em triplicata, os quais continham 10mL de água peptonada alcalina 1%.

Estas séries de tubos foram incubadas a 35-37°C por 16-18 horas e após o período de incubação o material de cada tubo positivo, isto é, apresentando turbidez, foi semeado com alça em estrias, de maneira a se obter colônias isoladas, em placas contendo ágar TCBS (Oxoid) e incubadas a 35-37°C por 24 horas. As colônias suspeitas de *V. parahaemolyticus*, isto é, colônias verdes indicativas de microrganismos não fermentadores de sacarose, foram identificadas presuntivamente conforme descrição no item 3.3.4.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 25g do mesmo lote de “chumbinhos”, sem tratamento pelos sanificantes usados no protocolo, para determinação da população inicial do *V. parahaemolyticus*.

3.7.5. Análises Físico-Químicas

Os vinagres e o suco de limão foram avaliados quanto a acidez titulável com NaOH 0,1N, que foi determinada em porcentagem de ácido acético e ácido cítrico e a leitura de pH realizada com o auxílio de pHmetro marca Quimis modelo Q 400 A.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características Bromatológicas do Molusco *Anomalocardia brasiliana*

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos na avaliação físico – química e o valor calórico do molusco cru, sem nenhum tratamento.

TABELA 1. Características físico-químicas e valor calórico do bivalve comestível *Anomalocardia brasiliana*, cru, obtido na cidade de Salinas da Margarida – BA, 2001.

Determinações (g%)	Valores médios*
Umidade	84,53
Lipídeos	0,60
Proteínas	7,95
Cinzas	3,66
Glicídios**	3,29
VCT (Kcal)	50,23

* Valores médios de três determinações em base úmida

** Glicídios calculados por diferença.

A composição química centesimal de um alimento expressa o seu potencial em nutrientes, sendo estes dados importantes para a indústria de alimentos. Sob o ponto de vista microbiológico a composição em nutrientes de um alimento e outros fatores intrínsecos, ao lado dos fatores extrínsecos é que irão selecionar a sua microbiota contaminante.

Na literatura poucas são as informações sobre a composição nutricional de mariscos, excetuando-se a de ostras e de mexilhões.

Dos resultados obtidos neste trabalho pode-se observar que os “chumbinhos” possuem um alto teor de umidade: 84,53%, valores médios de proteínas: 7,9% e uma baixa concentração de lipídeos: 0,60%, enquanto que com relação à fração de cinzas os valores foram altos: 3,66%, assim como os glicídios: 3,29% e um valor calórico baixo: 50,23 Kcal (Tabela 1).

Ao se comparar os valores de composição centesimal obtidos neste experimento com os obtidos por Miranda et al. (1999), observa-se uma diferença acentuada. Porém, alguns fatores podem ter contribuído para esta diferença como: a sazonalidade, fato este relatado pelos pesquisadores, assim como devido as análises terem sido realizadas a partir de amostras vendidas no mercado e que sofreram um processo de cocção prévia para a retirada das conchas. Este tipo de processamento, mesmo que caseiro, também pode alterar o conteúdo e valor nutritivo dos alimentos (Pedrosa & Cozzolino, 2001).

A composição centesimal de cinco diferentes tipos de mariscos crus e cozidos, dentre eles o *A. brasiliiana*, provenientes da cidade de Natal – RN, foi analisada por Pedrosa & Cozzolino (2001), que encontraram valores bem próximos aos desta investigação para a umidade, cinzas e glicídios, contrapondo-se aos valores discrepantes de proteínas e calorias. Estas diferenças encontradas possivelmente, podem estar relacionadas com outros fatores como habitat, sazonalidade e o tamanho dos moluscos que, de acordo com Miranda et al.(1999) seriam variáveis a se considerar nos resultados finais das análises.

No que se refere aos valores apresentados por Franco (1996) em Tabela de Composição Nacional para carne de marisco, embora esta não especifique ser o *A. brasiliiana*, os valores de proteínas e calorias estão bem próximos aos obtidos nesta pesquisa. Contudo, os valores de glicídios e lipídios estão 50% abaixo e acima, respectivamente, em relação aos deste trabalho.

4.2. Análises Microbiológicas

Foram realizadas, de abril de 2000 a março de 2001, 31 colheitas de “chumbinho” (*Anomalocardia brasiliana*), sedimento e de água do mar; procedentes de banco natural das praias do município de Salinas da Margarida, BA. Dessas amostras, foram isoladas 211 cepas de bactérias móveis, Gram negativas, oxidase positiva, a partir das amostras de chumbinho, 259 a partir dos sedimentos e 251 a partir da água do mar, totalizando 721 isolamentos, que foram submetidos aos testes bioquímicos para confirmação de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

4.2.1. Número Mais Provável de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em *A. brasiliana*.

Na Tabela 2 observa-se a variação do NMP/g de *V. parahaemolyticus* em “chumbinho” que foi de <3 a $1,1 \times 10^3$ e de *V. vulnificus* na ordem de <3 a 3.

Levando-se em consideração a escassez de literatura nacional e internacional, relativa a pesquisa de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em “chumbinho” (*A. brasiliana*), os resultados aqui discutidos foram comparados com trabalhos envolvendo moluscos comestíveis de origem marinha e de diferentes localizações geográficas.

Observa-se que da literatura nacional pesquisada os resultados aqui apresentados diferem daqueles obtidos por Matté et al (1994) que analisando mexilhões do litoral de Ubatuba-SP, o número mais provável de *V. parahaemolyticus* variou de <3 a $2,4 \times 10^4/100g$; Sousa (1989) encontraram NMP/g que variaram de $1,1 \times 10^4$ a $3,0 \times 10$ em ostras do litoral de João Pessoa – PB e Archer & Moretto (1994) em Santa Catarina, verificaram, NMP/100g de <3 a 93 em mexilhões. O método utilizado por esses pesquisadores foi semelhante ao deste trabalho, com exceção dos meios de enriquecimento.

TABELA 2. Número Mais Provável (NMP/g) de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de chumbinho (*Anomalocardia brasiliensis*) obtidos nas praias de Salinas da Margarida – Bahia, frente a dois diferentes meios de isolamento, 2001.

Amostra	Mês	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
		TCBS ^a	SDS ^b	TCBS ^a	SDS ^b
1	Abril	<3	<3	<3	<3
2	Abril	<3	<3	<3	<3
3	Abril	<3	<3	<3	<3
4	Maio	11	<3	<3	<3
5	Maio	3	<3	<3	<3
6	Maio	4	<3	<3	<3
7	Junho	11	<3	<3	<3
8	Junho	9	7	<3	<3
9	Julho	23	4	<3	<3
10	Julho	9	7	<3	<3
11	Agosto	3	<3	<3	<3
12	Agosto	<3	<3	<3	<3
13	Setembro	<3	<3	<3	<3
14	Setembro	<3	<3	<3	<3
15	Setembro	<3	<3	<3	<3
16	Setembro	4	<3	<3	<3
17	Outubro	<3	<3	<3	<3
18	Outubro	<3	<3	<3	<3
19	Novembro	<3	<3	<3	<3
20	Novembro	4	<3	<3	<3
21	Dezembro	4	<3	<3	3
22	Dezembro	3	<3	<3	<3
23	Dezembro	1,5 x 10 ²	<3	<3	<3
24	Janeiro	9	<3	<3	<3
25	Janeiro	<3	<3	<3	<3
26	Janeiro	1,1 x 10 ³	7	<3	<3
27	Fevereiro	11	<3	<3	<3
28	Fevereiro	15	4	<3	<3
29	Março	4	<3	<3	<3
30	Março	3	<3	<3	<3
31	Março	7	4	<3	<3

^aAgar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose.

^bAgar Dodecil Sulfato de Sódio Polimixina Sacarose.

Em vários países, pesquisas como as de Chan et al (1989) e Kaysner et al (1990a,b) revelaram NMP do microrganismo em mexilhões e ostras da ordem de $4,6 \times 10^4/g$, 32 a $10^4/g$ e 0,4 a 15/100g, respectivamente, sendo que os autores utilizaram diferentes caldos de enriquecimento, porém o meio de isolamento utilizado foi o TCBS.

Para o *V.vulnificus* foram encontrados resultados superiores aos de Matté et al (1994a), encontraram NMP <3 e 3/100g, entretanto Landgraf et al (1996) obtiveram um NMP/g para este microrganismo de <3 a $3,6 \times 10^2$, em frutos do mar do litoral paulista já, Kaysner et al. (1990 b) não obtiveram o isolamento desta bactéria nas amostras estudadas. Com relação às semelhanças e diferenças dos resultados obtidos nas pesquisas, possivelmente estes se devem aos métodos e aos meios de cultura utilizados.

4.2.2. Número Mais Provável de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* no Sedimento.

Para as amostras de sedimento coletadas, o NMP de *V. parahaemolyticus* variou de 3 a 93 /g em ágar TCBS e de <3 a 39/g em ágar SDS (Tabela 3).

Comparando-se estes resultados com os de outros pesquisadores, como Kaysner et al. (1990a,b), constatou-se uma concordância destes quanto à presença de *V. parahaemolyticus*, porém em números diferentes, onde estes autores obtiveram valores superiores do NMP iguais a 40 a $2,5 \times 10^5/g$ e 8 a 1500/100g

Com relação ao *V. vulnificus* estes resultados estão de acordo com Kaysner et al. (1990 b) que não isolaram a bactéria. Contudo, em pesquisa realizada por Wright et al. (1996) o NMP/mL do microrganismo variou de, $1,2 \times 10^3$ a $3,3 \times 10^5$. Para estes autores, uma possível explicação para o elevado número de *V. vulnificus* é que as amostras eram colhidas em locais onde havia uma grande concentração de ostras e em virtude de se ter utilizado técnicas mais apuradas, como a prova de oligonucleotídeo de DNA.

No que diz respeito ao estudo realizado por Vanoy et al. (1992) na baía de Galveston (EUA), vale salientar que o microrganismo foi detectado durante os meses de inverno no sedimento, em NMP variando de $<0,1$ a $2,1 \times 10^5/g$. De acordo com os pesquisadores, este fato deve ter ocorrido devido ao organismo ter suportado o rigor do inverno, protegido sob a camada superficial dos sedimentos. Além disso, há que se citar a utilização de uma metodologia diferente da empregada nesta pesquisa, isto é, foram utilizadas técnicas com anticorpos monoclonais e ensaio imunoenzimático atrelado ao NMP.

4.2.3. Número Mais Provável de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em Água do Mar.

O Número Mais Provável por mL (NMP/mL) de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* isolados da água do mar está apresentado na Tabela 4. Observa-se que o NMP/mL de *V. parahaemolyticus* variou de $<0,3$ a $4,3$ no meio de TCBS e de $<0,3$ a $2,1$ no meio de SDS.

No que se refere ao *V. parahaemolyticus*, comparando estes resultados com os obtidos por Kaysner et al. (1990 a) observa-se que os da presente pesquisa foram menores de que os obtidos por estes, cujo NMP/mL variou de $3,2$ a $1 \times 10^2/g$, em amostras pesquisadas de diferentes locais de colheita na Baía de Willapa, Estados Unidos.

Esta diferença também pode ser constatada comparando-se com os resultados obtidos por Jones & Summer-Brason (1998) que encontraram valores máximo de NMP ao redor de $5/mL$, em águas do estuário do estado de New England (Estados Unidos), assim como daqueles obtidos por Barros & Vianni (1980) e Sousa (1989) que foram de $1,2 \times 10^3/mL$, em águas na Baía da Guanabara e NMP de $4,0 \times 10$ a $2,3 \times 10^2/mL$ em águas marinhas coletadas no litoral de João Pessoa- PB, respectivamente.

TABELA 3. Número Mais Provável (NMP/g) de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de sedimento obtidos nas praias de Salinas da Margarida – Bahia, frente a dois diferentes meios de isolamento, 2001.

Amostra	Mês	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
		TCBS ^a	SDS ^b	TCBS ^a	SDS ^b
1	Abril	3	<3	<3	<3
2	Abril	<3	<3	<3	<3
3	Abril	3	<3	<3	<3
4	Maio	<3	<3	<3	<3
5	Maio	3	<3	<3	<3
6	Maio	<3	<3	<3	<3
7	Junho	<3	<3	<3	<3
8	Junho	4	3	<3	<3
9	Julho	11	<3	<3	<3
10	Julho	11	3	<3	<3
11	Agosto	23	<3	<3	<3
12	Agosto	11	4	<3	<3
13	Setembro	15	11	<3	<3
14	Setembro	43	15	<3	<3
15	Setembro	93	39	<3	<3
16	Setembro	11	<3	<3	<3
17	Outubro	9	4	<3	<3
18	Outubro	<3	<3	<3	<3
19	Novembro	4	<3	<3	<3
20	Novembro	4	4	<3	<3
21	Dezembro	11	3	<3	<3
22	Dezembro	<3	<3	<3	<3
23	Dezembro	15	3	<3	<3
24	Janeiro	15	15	<3	<3
25	Janeiro	4	3	<3	<3
26	Janeiro	39	4	<3	<3
27	Fevereiro	14	4	<3	<3
28	Fevereiro	9	4	<3	<3
29	Março	23	3	<3	<3
30	Março	<3	<3	<3	<3
31	Março	7	3	<3	<3

^aAgar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose. ^bAgar Dodecil Sulfato de Sódio Polimixina Sacarose.

TABELA 4. Número Mais Provável (NMP/mL) de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* isolados de amostra de água do mar obtidos nas praias de Salinas da Margarida – Bahia, frente a dois diferentes meios de cultura, 2001.

Amostra	Mês	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
		TCBS ^a	SDS ^b	TCBS ^a	SDS ^b
1	Abril	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
2	Abril	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
3	Abril	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
4	Maio	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
5	Maio	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
6	Maio	0,3	<0,3	<0,3	<0,3
7	Junho	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
8	Junho	0,4	<0,3	<0,3	<0,3
9	Julho	4,3	0,7	<0,3	0,4
10	Julho	0,4	<0,3	<0,3	0,3
11	Agosto	0,7	<0,3	<0,3	<0,3
12	Agosto	0,9	0,3	<0,3	<0,3
13	Setembro	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
14	Setembro	0,4	<0,3	<0,3	<0,3
15	Setembro	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
16	Setembro	0,7	0,4	<0,3	<0,3
17	Outubro	2,8	0,4	<0,3	<0,3
18	Outubro	0,3	<0,3	<0,3	<0,3
19	Novembro	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
20	Novembro	1,5	0,4	<0,3	<0,3
21	Dezembro	0,4	0,4	<0,3	<0,3
22	Dezembro	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
23	Dezembro	1,1	2,1	<0,3	<0,3
24	Janeiro	1,5	0,3	<0,3	<0,3
25	Janeiro	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
26	Janeiro	2,3	<0,3	<0,3	<0,3
27	Fevereiro	2,0	0,3	<0,3	<0,3
28	Fevereiro	0,3	<0,3	<0,3	<0,3
29	Março	1,1	<0,3	<0,3	<0,3
30	Março	0,4	0,4	<0,3	<0,3
31	Março	0,4	<0,3	<0,3	<0,3

^aÁgar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose.

^bÁgar Dodecil Sulfato de Sódio Polimixina Sacarose.

Já com relação à enumeração do *V. vulnificus*, Vanoy et al. (1992), Wright et al. (1996) e Jones & Summer-Brason (1998), assim como os resultados desta investigação, também encontraram positividade em suas pesquisas, com NMP de $2,1 \times 10^3$ a $<0,1$ /mL em amostras da Baía de Galveston, $3,0 \times 10$ a $2,1 \times 10^2$ /mL na Baía de Chesapeake e NMP 4,5/mL em New England respectivamente, todos nos Estados Unidos, contrapondo-se ao resultado de Kaysner et al (1990 b) que não isolaram este microrganismo em pesquisa com amostras colhidas no Estado de Washington.

4.2.4. Freqüência de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em “Chumbinho”, Sedimento e na Água do Mar.

A freqüência de *V. parahaemolyticus* e *V.vulnificus* em amostras de “chumbinho”, sedimento e água marinha está apresentada na Tabela 5.

TABELA 5. Freqüência de *V. parahaemolyticus* e *V.vulnificus* em “chumbinho”, sedimento e água do mar colhidas em Salinas da Margarida-BA,2001.

Natureza da amostra	Nº de amostras	Amostras positivas			
		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
		Nº	%	Nº	%
Chumbinho	31	20	64,52	01	3,23
Sedimento	31	24	77,42	0	—
Água do mar	31	20	64,52	02	6,45

Nas demais amostras analisadas, a população esteve abaixo do nível de detecção do método, eventualmente poderia haver a presença da bactéria muito embora em números reduzidos.

A presença do *V. parahaemolyticus* em "chumbinho" observada neste trabalho (64,52%) foi também constatada em outros moluscos bivalves e alimentos de origem marinha em pesquisas realizadas por Kaysner et al (1990 b) (100%); Chan et al (1989) (36%); Flores & Abuxapqui (1996) (2,1%) e Guevara-Duncan (1989) (27%) , em diferentes países.

Comparativamente às pesquisas realizadas no Brasil, constata-se também uma variação na freqüência de isolamento de *V. parahaemolyticus*, onde Landgraf et al. (1996) obtiveram 60% em diferentes frutos do mar estudados; Matté et al. (1994a) obtiveram uma variação de 67 a 92% em mexilhões de dois diferentes locais de colheita; Archer & Moretto (1994) com 52,5% em mexilhões; Vieira & Iaria (1993) 43,75% em caudas de lagostas; Sousa, (1989) em 93,3% das amostras de ostras e Leitão et al. (1976) em 100% das ostras.

Com relação a freqüência do microrganismo em amostras de sedimento (77,42%), observa-se uma similaridade quanto ao isolamento de *V. parahaemolyticus* em pesquisas realizadas por Kaysner et al (1990 a,b) que obtiveram 66,7% e 100% respectivamente, porém Leitão e Arima (1975), encontraram uma freqüência menor 21,6%.

Este fato também foi constatado quando se utilizou a água do mar para se pesquisar a possível presença desta bactéria. Observou-se uma freqüência de 64,52% neste trabalho, assemelhando-se ao de Barros e Vianni (1980) que obtiveram 61,6%, porém em pesquisa realizada por Leitão e Arima (1975) a freqüência isolamento foi de 45%; semelhante a de Sousa (1989) que obteve 42,9%. No que se refere a literatura estrangeira, Kaysner et al. (1990a,b) também demonstraram a presença do *V. parahaemolyticus* na água numa freqüência de 66,7% e 100%, respectivamente, e Wu et al. (1996), em 22,5%.

A variação na freqüência do *V. parahaemolyticus* nos materiais em estudo foi ampla, conforme os resultados apresentados na Figura 9. A contaminação nos

“chumbinhos” prende-se ao fato destes organismos, em seu processo de alimentação e respiração, aspirarem e expelirem grande quantidade de água e tendo vida sedentária, captam o alimento por sistema de filtração da água, o que permite a concentração dos microrganismos dispersos na água do mar, em seus corpos, desde que se encontrem contaminados. Os resultados das análises microbiológicas são indicativos, portanto, da microbiota do ambiente marinho e da presença de contaminante.

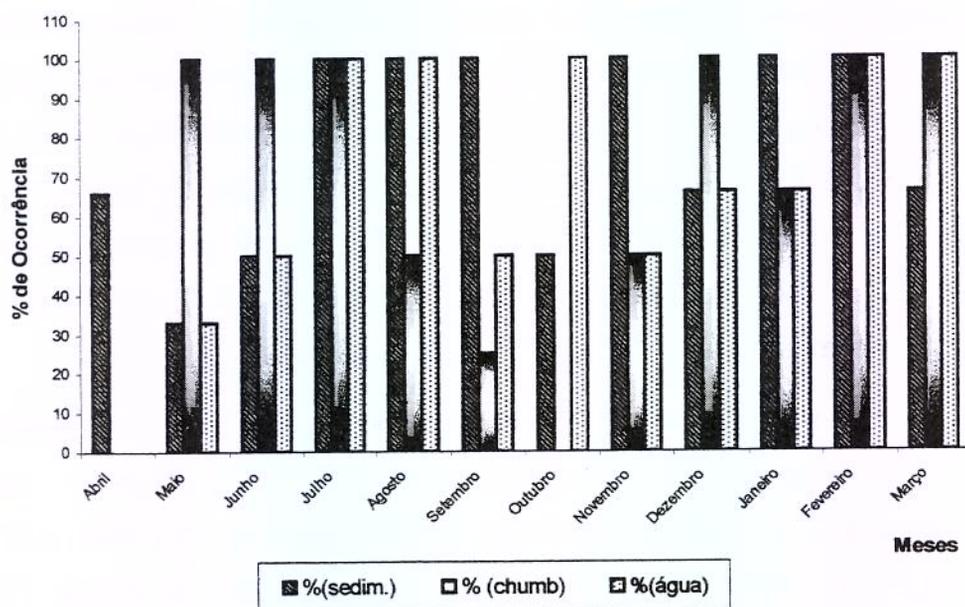


FIGURA 9. Porcentagem da ocorrência mensal de *V. parahaemolyticus* em amostras de chumbinho, sedimento e água do mar.

De acordo com Cerutti & Barbosa (1991) a falta de relação entre a quantidade de microrganismos no molusco e na água do mar não deve inibir estudos similares, pois na realidade não existe uma real simultaneidade entre a amostra de água e a do bivalve. A primeira oferece resultados instantâneos da massa de água no momento da colheita, sendo que a segunda corresponde à

integração total ou parcial do molusco às características bacteriológicas e ambientais da quantidade de água que se sucederam antes da colheita.

No que diz respeito à presença de *V. vulnificus* poucas amostras positivas foram encontradas neste trabalho, como se constata pela frequência contida na Tabela 4. Além de sua baixa presença, somente nas amostras de “chumbinho” e água é que o microrganismo foi isolado.

Contraopondo-se a estes resultados outros pesquisadores no Brasil apresentaram valores mais elevados em mariscos, como é relatado em pesquisa realizada por Landgraf et al (1996) que encontraram a bactéria em 51,8% das ostras e 25% das amostras de mexilhões analisadas; Garcia-Moreno & Landgraf (1997) em 65,4 das ostras e 41,2% dos mariscos e Matté et al. (1994a) estudando a bactéria em mexilhões observou uma variação de 8 a 17% nos diferentes locais de colheita. Contudo, Rodrigues & Hofer (1986), não obtiveram isolamento de *V. vulnificus* em molusco e somente em 0,51% de amostras de água do mar.

O meio mais comumente utilizado para a detecção de vibrios é o ágar TCBS, mas sua seletividade para o isolamento de *V. vulnificus* é questionada por não permitir sua diferenciação de outras espécies de *Vibrio*, portanto, dois outros meios (SDS e mCPC) são indicados. Kaysner et al.(1989) e Oliver et al. (1992) utilizando os meios de TCBS, SDS e CPC observaram que o CPC tem uma seletividade superior em diferenciar *V. vulnificus* de outros vibrios presentes, a partir do meio de enriquecimento. A diferença nos resultados encontrados por Landgraf et al. (1996) e Garcia-Moreno & Landgraf (1997) pode ser explicada pelo uso de diferentes métodos para o isolamento de *V. vulnificus*, principalmente no que se refere ao meio de isolamento. Estes autores utilizaram no primeiro estudo o meio TCBS e no segundo fizeram uso do meio mCPC, que de acordo com a literatura é o meio mais indicado para o isolamento de *V. vulnificus*, mas por se tratar de um meio de custo bastante elevado, tornou inviável a sua utilização no presente estudo. Para a confirmação de *V. vulnificus*, os autores fizeram uso de kits comerciais para a caracterização do microrganismo

Pelos dados obtidos na literatura internacional, nota-se que a maioria dos autores, em suas pesquisas, isolaram o *V. vulnificus* em amostras de moluscos comestíveis, sedimento e água marinha com grande variação. Especificamente, O'Neill et al. (1990), obtiveram positividade de 8,97% em ostras e 10,25% em água marinha coletadas em New England. Porém, em 1992, trabalhando com o mesmo tipo de amostras coletadas do estuário de Great Bay, O'Neill detectaram uma frequência maior, isto é, de 37,8 e 27,06%, respectivamente. Por outro lado, Kaysner et al. (1987) constataram uma frequência de 0,37% desta bactéria em alimentos marinhos e em 3,2% de amostras de água. Há que se ressaltar que estes autores também isolaram o microrganismo de 2,30% das amostras de sedimento coletadas. Os autores tentam explicar essa diferença na frequência de isolamento nas diferentes amostras em função do número relativo de *V. vulnificus* presente, a quantidade e o tipo de outras bactérias presentes ou mesmo de limitações dos métodos de detecção (O'Neill et al., 1992).

4.2.5. Relação entre os Parâmetros do Ambiente (temperatura, salinidade e pH) e o Isolamento de *V.vulnificus* e *V. parahaemolyticus*.

No presente estudo a temperatura da água do local de captura, em Salinas da Margarida, variou de 25 a 32°C sendo a média de 28,65 ±2,9°C. Assim, esta temperatura apresentava-se em um intervalo favorável ao desenvolvimento dos microrganismos estudados e isto talvez tenha sido um dos fatores que compensou a salinidade, que variou de 29 a 36‰ com média de 32,48 ±1,67‰, sendo esta última, possivelmente, um fator limitante para a baixa frequência de isolamentos de *V.vulnificus* neste estudo (Tabela 6).

Os vibrios patogênicos são mais frequentemente isolados de ambientes com temperatura entre 10° e 30°C (West, 1989). Grimes, 1991 (citado por Jones e Summer-Brason,1998) sugeriu que a temperatura e salinidade ótimas para *V. parahaemolyticus* é de 20°C e 20‰, respectivamente.

Apesar de sua aparente tolerância a uma larga faixa de salinidade e temperatura, O'Neill et al.(1992) citaram que o *V. vulnificus* é mais freqüentemente observado em números mais elevadas quando a temperatura da água está na faixa de 17 a 31°C e a salinidade ao redor de 25‰.

Arias et al.(1999) também encontraram uma baixa incidência de *V. vulnificus* em frutos do mar colhidos na costa oeste do Mediterrâneo, sendo que na água do mar a bactéria não foi isolada. Os autores acreditam que a salinidade do Mar Mediterrâneo com uma média de 34,6‰, é superior a máxima em que ainda ocorre o crescimento do microrganismo. Para Motes et al. (1998), a salinidade acima de 25‰ reprime os níveis de *V. vulnificus* mesmo em águas mornas.

A salinidade superior a 30‰ classifica as águas de onde os moluscos foram colhidos como salina (Resolução Conama nº 20, de 18 de junho de 1986). Isto ocorreu na maior parte do ano (Tabela 6) e é um fator ambiental que favorece a presença de microrganismos de espécies halofílicas. Porém, a salinidade média de 32‰ pode ter sido um fator limitante, resultando o reduzido número de *V. vulnificus* isolado.

Neste trabalho foram utilizados dois diferentes meios de isolamento, o ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e o ágar Dodecil Sulfato de Sódio Polimixina Sacarose (SDS). Observou-se que o *V. vulnificus* somente foi isolado no ágar SDS e o ágar TCBS permitiu um melhor isolamento de *V. parahaemolyticus*, confirmando assim a necessidade da utilização de um meio mais seletivo para se obter um melhor isolamento do *V. vulnificus*

Os resultados obtidos nesta investigação foram tratados estatisticamente, levando em consideração somente os resultados positivos obtidos com o protocolo utilizado para se pesquisar a presença de *V. parahaemolyticus*.

Um estudo de correlação das variáveis do ambiente, com o NMP de *V. vulnificus*, não foi realizado devido ao reduzido número de isolamentos obtidos (Tabela 4).

TABELA 6. Valores individuais por colheita, média, mediana e desvio padrão das variáveis do ambiente: salinidade, temperatura e pH analisado de amostras de água obtidas nas praias de Salinas da Margarida – BA, 2001.

Amostras	Mês	Salinidade (‰)	Temperatura (°C)	pH
1	Abril	30	25	8,05
2	Abril	30	27	8,06
3	Abril	29	25	8,00
4	Maio	31	30	8,05
5	Maio	32	32	8,07
6	Maio	32	24	8,17
7	Junho	31	25	8,10
8	Junho	33	28	8,07
9	Julho	31	25	8,07
10	Julho	32	27	8,06
11	Agosto	33	27	8,10
12	Agosto	34	32	8,10
13	Setembro	33	34	8,15
14	Setembro	32	24	8,10
15	Setembro	33	24	8,10
16	Setembro	31	28	8,01
17	Outubro	32	28	8,00
18	Outubro	32	29	8,05
19	Novembro	34	30	8,04
20	Novembro	36	30	8,05
21	Dezembro	33	31	8,04
22	Dezembro	35	30	7,80
23	Dezembro	36	32	8,10
24	Janeiro	34	30	8,26
25	Janeiro	33	28	8,17
26	Janeiro	35	32	8,09
27	Fevereiro	33	34	8,08
28	Fevereiro	32	30	8,06
29	Março	31	27	8,07
30	Março	32	30	8,10
31	Março	32	30	8,15
	Média	32,48	28,65	8,08
	Mediana	32	29	8,07
	Desvio padrão	1,67	2,90	0,08

Verificou-se que não houve correlação entre a temperatura, a salinidade e o pH com o NMP de *V. parahaemolyticus* isolado do chumbinho, da água e do sedimento (Tabela 7).

Destas três variáveis do ambiente estudadas, nenhuma influenciou, significativamente, a enumeração de *V. parahaemolyticus*. Apenas no caso do NMP em “chumbinho” a variável salinidade apresentou efeito em limite de significância ($p < 0,10$), explicando 37% da variação de *V. parahaemolyticus*.

Porém, há evidências de uma fraca associação entre a enumeração de *V. parahaemolyticus* no “chumbinho” e na água ($r=0,48$) e entre o NMP do microrganismo na água e no sedimento ($r=0,42$) com um nível de 5% (Tabela 7).

TABELA 7. Coeficiente de correlação entre os diferentes parâmetros obtidos nas colheitas em praias do município de Salinas da Margarida – BA (2001).

Variáveis	Salinidade	Temperatura	pH	NMP chumbinho	NMP sedimento	NMP água do mar
Salinidade	–					
Temperatura	0,5517	–				
PH	0,0235	0,0332	–			
NMP chumbinho*	0,3668	0,2987	0,1309	–		
NMP sedimento**	0,2757	0,0575	0,2759	0,1866	–	
NMP água do mar***	0,2766	0,1564	0,0917	0,4804	0,4244	–

* Número Mais Provável de *V. parahaemolyticus* em chumbinho.

** Número Mais Provável de *V. parahaemolyticus* no sedimento.

*** Número Mais Provável de *V. parahaemolyticus* na água do mar.

No presente estudo verificou-se que não houve a interferência da sazonalidade com relação ao isolamento do *V. parahaemolyticus* nos locais de

amostragem pois, sabe-se que a temperatura é uma variável ambiental determinante, pois a mínima necessária para o desenvolvimento do microrganismo é 10°C (Colwell et al.,1973) e quando a temperatura ambiente está abaixo deste limite o microrganismo não é detectado. Portanto, o efeito da sazonalidade na concentração de *V. parahaemolyticus* neste estudo não foi observado pois, a temperatura durante toda a colheita de amostras permaneceu acima desse limite, permitindo a identificação do microrganismo na maioria das colheitas realizadas (Figuras 10, 11 e 12).

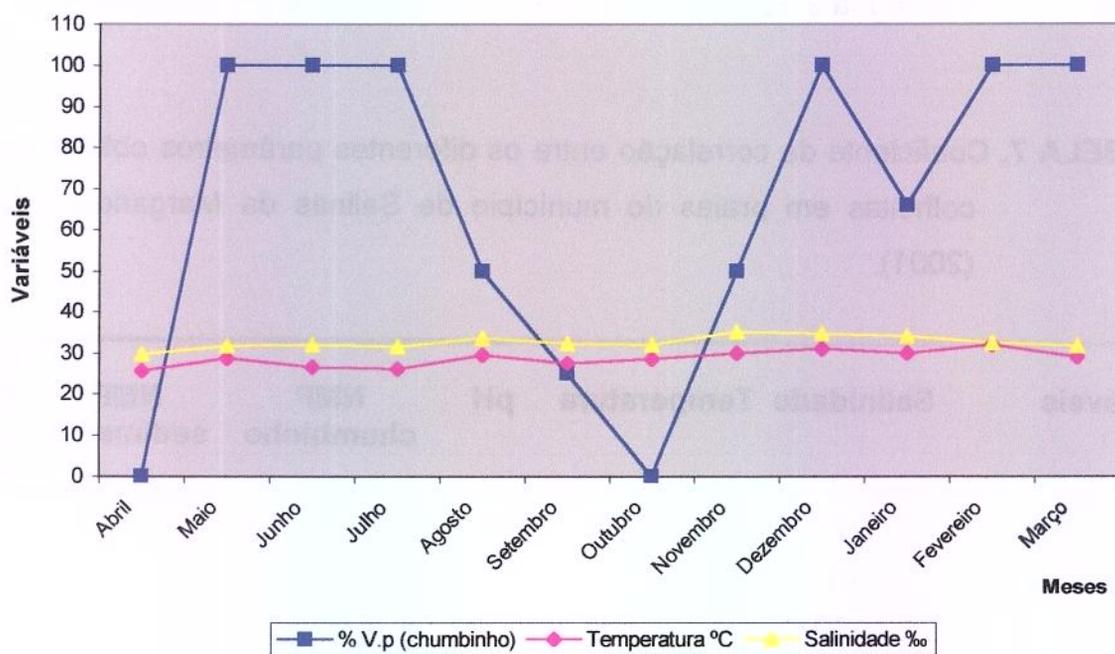


FIGURA 10. Porcentagem da ocorrência de *V. parahaemolyticus*, valores de temperatura e salinidade em amostras de *A. brasiliiana* colhidas durante o período de abril de 2000 a março de 2001, nas praias de Salinas da Margarida – BA.

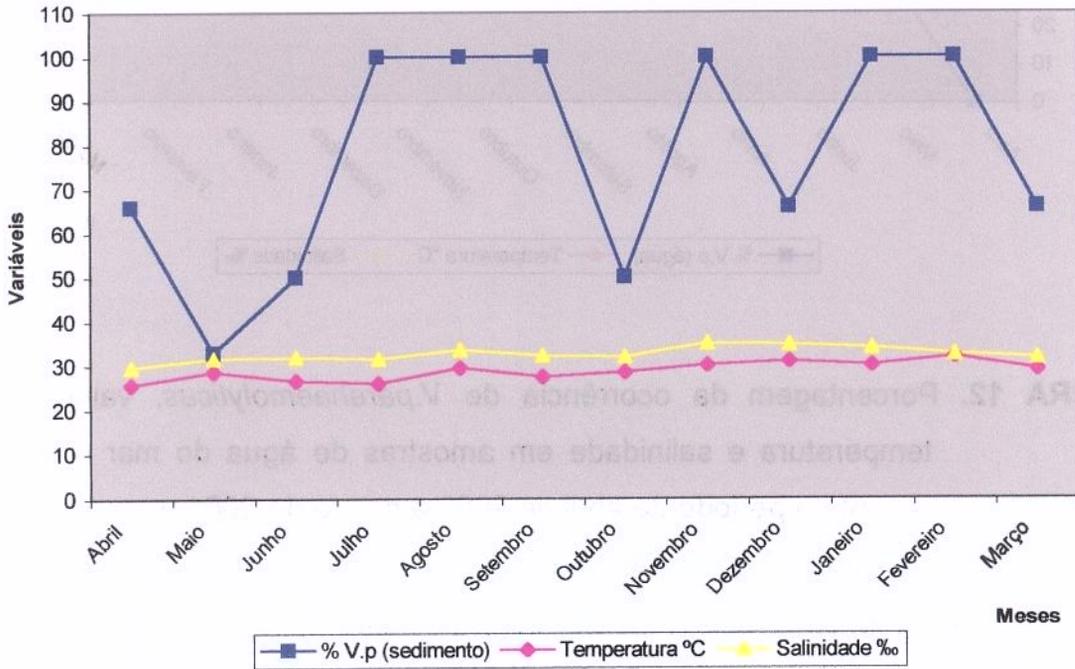


FIGURA 11. Porcentagem da ocorrência de *V. parahaemolyticus*, valores de temperatura e salinidade em amostras de sedimento colhidas durante o período de abril de 2000 a março de 2001, nas praias de Salinas da Margarida – BA.

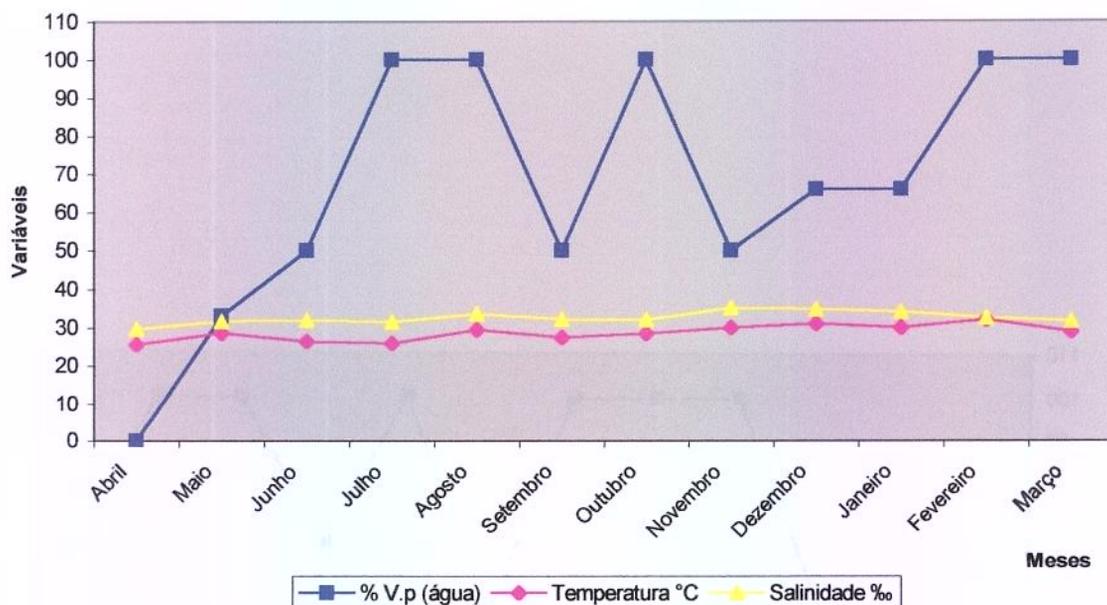


FIGURA 12. Porcentagem da ocorrência de *V. parahaemolyticus*, valores de temperatura e salinidade em amostras de água do mar colhidas durante o período de abril de 2000 a março de 2001, nas praias de Salinas da Margarida – BA.

Os valores obtidos para o pH da água do mar variaram entre 7,8 e 8,26 (Tabela 7). O valor médio anual dessa variável para a região estudada foi de 8,08 com desvio padrão igual a 0,08, que, segundo Mendonça-Hagler & Hagler (1991) está dentro da normalidade estabelecida para a água do mar, que é de 8,2.

De acordo com Twedt (1998) o *V. parahaemolyticus* se desenvolve em uma faixa de pH ótima de 7,5 a 8,5, enquanto que o *V. vulnificus* não se desenvolve em pH abaixo de 5,0, segundo experimentos realizados por Hijarrubia et al (1996). Portanto, o pH médio anual encontrado neste experimento foi favorável para o desenvolvimento dos microrganismos estudados, pois, esta variável tem grande influência no desenvolvimento bacteriano.

4.3. Teste de Kanagawa

Das 107 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas e submetidas ao teste de Kanagawa, nenhuma delas apresentou beta-hemólise. Estes dados estão em conformidade com a maioria dos outros estudos (Kaysner et al., 1990a; Miyamoto et al., 1969 e Archer & Moretto, 1994), que demonstraram pouca ou nenhuma atividade hemolítica para cepas ambientais, sendo que as cepas isoladas de casos clínicos freqüentemente são Kanagawa positivas.

4.4. Avaliação dos Tratamentos com os Ácidos Orgânicos Utilizados

Todos os tratamentos utilizados foram bastante eficientes na diminuição de *Vibrio parahaemolyticus* inoculados artificialmente, sendo a redução obtida igual em todos os experimentos (Tabela 8).

No final de trinta minutos de exposição, tanto ao vinagre quanto ao suco de limão, nenhum microrganismo foi isolado em meio de TCBS. Apesar de ter sido feita uma contaminação artificial superior àquela que poderia ocorrer em uma situação real.

Os resultados obtidos neste experimento são iguais àqueles obtidos por Porto & Eiroa (1997) que obtiveram em filés de merluza contaminados artificialmente, a redução de 5,5 e 6,5 ciclos log do NMP de *Vibrio cholerae* O1 através da utilização de vinagre e suco de limão, respectivamente, para a desinfecção. Estes resultados diferem dos obtidos por Mendes et al. (1999), que utilizaram suco de limão diretamente em ostras contaminadas com *V. parahaemolyticus* e não observaram efeito inibidor. Possivelmente, isto pode ter ocorrido pelo pequeno volume de suco utilizado e também pelo tempo de 80 segundos de exposição das bactérias a este tratamento.

Tabela 8. Contagem inicial e NMP final de *V. parahaemolyticus* em “chumbinhos” inoculados artificialmente, após tratamento com dois tipos de vinagre e suco de limão . Salvador-Bahia, (2001)

Compostos	Acidez %	pH	<i>V. parahaemolyticus</i>	
			Contagem inicial	NMP/g final
Vinagre de álcool	4,42 ¹	2,37	10 ⁶	<3
Vinagre de vinho branco	4,75 ¹	2,80	10 ⁶	<3
Suco de limão	6,16 ²	2,24	10 ⁶	<3

1:% de ácido acético 2:% de ácido cítrico

Estes resultados são concordantes também com os obtidos por D'Aquino e Teves (1994) e Ducan et al. (1995) onde evidenciaram a eficiência do suco de limão sobre a sobrevivência de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, respectivamente, em água utilizada como bebida, apesar dos primeiros autores ressaltarem que a alcalinidade da água pode reduzir marcadamente a atividade deste suco.

Apesar de o substrato ser diferente, resultados semelhantes utilizando vinagre foram obtidos por Leitão et al. (1981) que estudaram sua ação bactericida sobre folhas de alface contaminadas com coliformes totais e *V. cholerae* O1. Eiroa & Porto (1995 e 1996) observaram uma atividade mais eficiente do mesmo sobre o *V. cholerae* do que sobre coliformes.

A cozinha baiana faz uso de vinagre e limão nos alimentos de uma maneira rotineira, visando não só a função destes como acidulantes, mas também para a retirada de odores característicos das carnes, principalmente a de aves.

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo com o uso do vinagre e do limão como inibidores do desenvolvimento de *V. parahaemolyticus*

em chumbinho, esses constituintes em termos práticos poderiam ser utilizados pelas mariscadeiras após o processo de retirada da carne dos chumbinhos, pois além do vinagre e do limão terem se mostrado eficientes, são produtos baratos e de fácil obtenção, além de, sob o ponto de vista da qualidade higiênico-sanitária seria ofertado um produto mais seguro.

O processamento do molusco na região onde foi colhido é um processo extremamente artesanal e extrativista, sem nenhuma sofisticação tecnológica e sem algum tipo de treinamento para as mariscadeiras.

Estas mariscadeiras, durante a maré baixa, cavam a areia com o auxílio de pequenas pás improvisadas à procura de chumbinhos, passando uma grande parte do tempo de cócoras(Figura 13). Com a subida da maré voltam para suas casas carregando cerca de 15 a 20 quilos do marisco, resultado de horas de trabalho (Figuras 14 e15).

Após o retorno, geralmente, saem novamente à procura de lenha para fazer o fogo e esquentar os chumbinhos, processo este utilizado para facilitar a abertura das conchas e retirada da carne, que é realizada com o auxílio dos dedos. Esse material é então acondicionado em sacos plásticos, de mais ou menos um quilo, e vendido às “ganhadeiras” ou durante o período de veraneio à comunidade que passa suas férias na cidade e também para o seu próprio consumo.

Como as condições de moradia são bastante precárias, pois em uma pesquisa realizada pela própria Associação das Mariscadeiras, com 120 entrevistas, observou-se que 35% delas não possuíam instalações sanitárias, 96% não dispunham de rede de esgoto, 25% não recebiam água encanada e 53% não dispunham de geladeira.

Depreende-se portanto, que esse produto é manipulado em condições bastante precárias e que permanece por um grande período de tempo exposto à temperatura ambiente, sendo que na maior parte do ano a temperatura local é bastante elevada, típica de clima tropical. Considerando-se a falta de critério existente para a comercialização deste produto, sugere-se um estudo a respeito, a fim de se obter a melhor forma de oferecimento ao comércio.

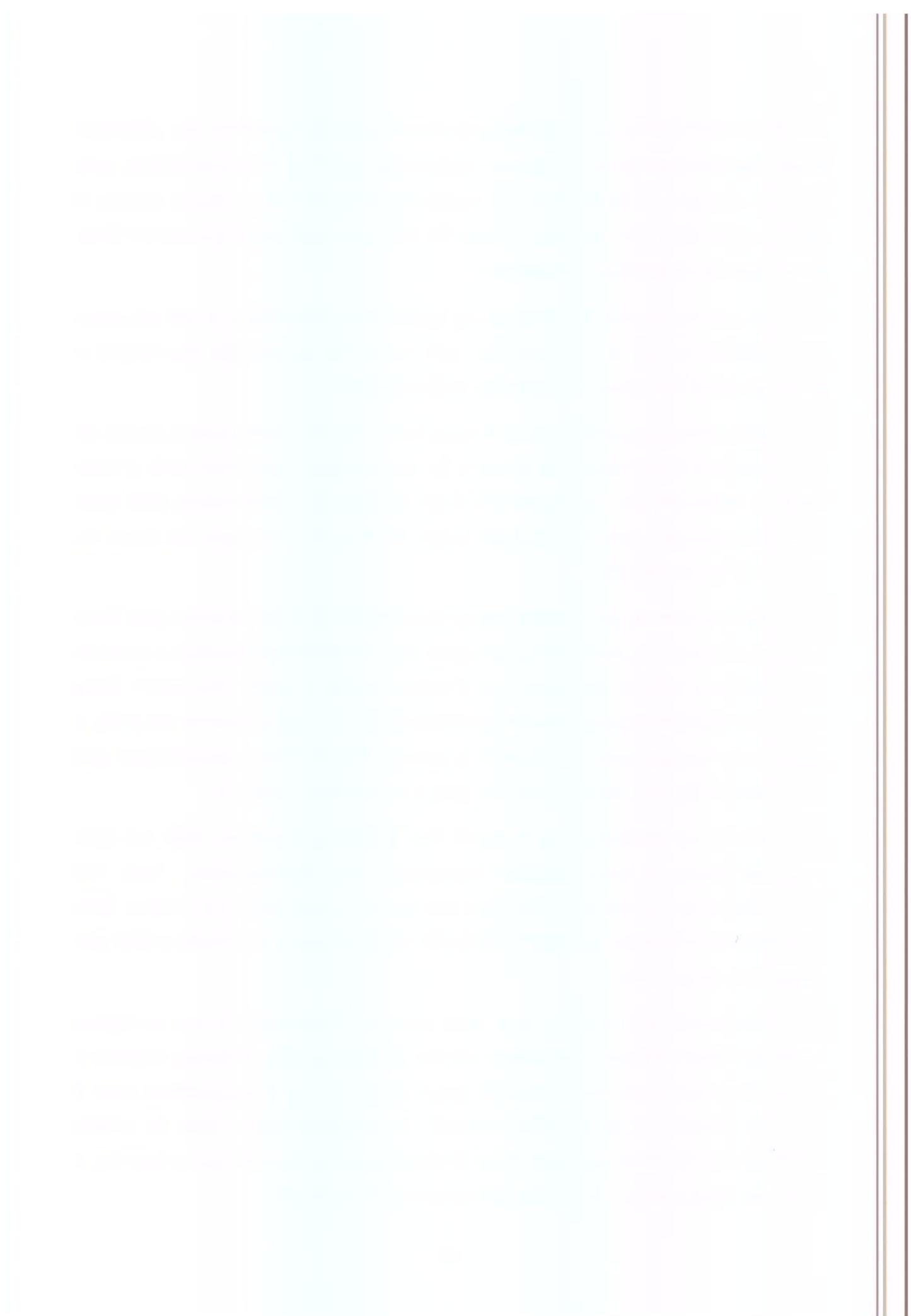




FIGURA 13. Colheita de *Anomalocardia brasiliana* praias do Município de Salinas da Margarida – BA.



FIGURA 14. “Chumbinho” (*A. brasiliana*), coletados nas praias do Município de Salinas da Margarida – BA.





FIGURA 15. Marisqueira voltando do trabalho.



Resolução - RDC número 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001), exige a pesquisa de *V.parahaemolyticus* somente para pratos prontos à base de pescados consumidos crus, onde o NMP máximo permit

ido é de $10^3/g$. Para as amostras analisadas neste trabalho, foi obtido somente uma amostras com este valor próximas deste valor (Tabela 2).

Mas, levando-se em consideração o tempo de geração do *V. parahaemolyticus*, que parece ser um dos menores entre as bactérias sendo seu crescimento muito rápido em alimentos de origem marinha, chegando a se observar um tempo de geração de 13 minutos (Lee, 1973), o que promoverá números superiores a $10^3/g$ nos moluscos. Portanto, medidas preventivas e de controle como o monitoramento de práticas de sanitização, práticas higiênicas de manipulação, monitoramento de patógenos dos produtos do mar e suas águas, bem como o de microrganismos indicadores, de educação e treinamento das pessoas envolvidas com este tipo de alimento, devem ser praticadas pois, estes são pontos chaves da prevenção das doenças transmitidas por alimentos e do controle de qualidade.

O processamento e preparação de alimento em condições adequadas de higiene têm sido por muitos anos o requisito básico e a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos. Embora esta tentativa seja incapaz de assegurar ao pescado a ausência de patógenos naturalmente presentes no meio ambiente, como é o caso do gênero *Vibrio*, a boa higiene, limpeza e sanitização são necessários para assegurar baixos índices desses microrganismos no produto final (Huss, 1997).

Muito embora a aplicação de uma boa higiene seja recomendada, ela não é suficiente para garantir a segurança alimentar e a segunda linha de defesa, prevenção do crescimento, deve ser estabelecida. Os alimentos devem ser produzidos higiênicamente por muitas razões, mas parece que o controle seguro dos mesmos deriva da prevenção da situação, ao invés da preocupação com o número de bactérias que estavam inicialmente presentes no alimento (Huss, 1997).

Uma vez que o *V. parahaemolyticus* e o *V. vulnificus* são amplamente distribuídos no ambiente marinho, todos os alimentos do mar podem ser considerados como fontes em potencial para a veiculação destes microrganismos, embora o maior número de casos reportados tenham envolvimento da ingestão de ostras cruas.

Bryan, (1980) comenta que o processo usual de aquecimento elimina os *Vibrios* spp, mas que o fruto do mar cozido pode ser recontaminado por contato com fruto do mar cru, por manipuladores que previamente manusearam este produto, equipamento ou utensílio que foi previamente usado no processamento deste alimento, ou mesmo ser lavado com água do mar que pode estar contaminada. Se o fruto do mar não for severamente aquecido e se for deixado à temperatura ambiente ou refrigerado em grandes quantidades, pode se tornar causador de doença transmitida por alimento.

Todos estes fatos não são seguidos pelas mariscadeiras, uma vez que executam várias etapas desta tarefa de uma só vez, além de que muitas não possuem refrigeração adequada, considera-se portanto, necessária a adoção de medidas específicas, que possam proteger o consumidor das infecções veiculadas por estes microrganismos. Para tanto, faz-se necessária uma reavaliação das condições de comercialização dos alimentos de origem marinha oriundos dessa região, bem como a adoção de medidas que procurem esclarecer o consumidor sobre os possíveis riscos da ingestão desses alimentos crus ou indevidamente cozidos.

Levando-se em consideração que esses moluscos são eventualmente consumidos crus ou insuficientemente cozidos, tem-se a convicção de que sua ingestão sem os devidos cuidados, constitui-se um determinado grau de risco para a saúde do consumidor, principalmente as crianças, idosos, os imunocomprometidos, aqueles com doenças hepáticas e as gestantes. Portanto, é prudente que se evite seu consumo nessas condições e que práticas adequadas de manipulação e estocagem sejam implantadas e bem obedecidas.

5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que o trabalho foi desenvolvido e baseados nos resultados obtidos conclui-se que:

- A ingestão de moluscos bivalves crus ou insuficientemente cozidos representa risco à saúde do consumidor devido a alta frequência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.
- A frequência de amostras positivas de sedimento e água do mar para *V. parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* também constitui risco para a população que entra em contato direto com a água do mar e com o sedimento.
- Não observou-se correlação entre as variáveis do ambiente mensuradas como salinidade, temperatura e pH e a presença dos microrganismos estudados.
- A frequência do isolamento de *V. parahaemolyticus* não foi influenciada pela sazonalidade, demonstrando que o clima tropical local favorece o desenvolvimento desses microrganismos durante todo o ano.
- O ágar SDS apresenta um melhor desempenho no isolamento de *V. vulnificus* que o ágar TCBS, enquanto que este último apresenta uma maior eficiência no isolamento de *V. parahaemolyticus*.
- Os resultados negativos do teste de Kanagawa para todas as cepas de *V. parahaemolyticus* testadas confirmam a evidência de que as cepas isoladas do ambiente em sua grande maioria são negativas para o teste.
- A utilização de vinagres de álcool e de vinho branco e de suco de limão no processamento de “chumbinho” constitui eficiente instrumento no controle da contaminação por *Vibrio parahaemolyticus*.

- Em virtude da região de Salinas da Margarida ser uma das maiores fornecedoras de chumbinho do Estado, é importante sugerir a implantação efetiva de programas que visem a aplicação das Boas Práticas de Manufatura tendo como objetivo a qualidade destes alimentos e a garantia da saúde dos consumidores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T.C.A. ***Anomalocardia brasiliensis*: Relação entre níveis de mercúrio e parâmetros biológicos, em populações naturais da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.** Salvador, 1990. 121p. Dissertação (Mestre em produção Aquática) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia.

ARCHER, R.M.B.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de banco natural do litoral do município de Palhoça, S.C. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.143-150, 1994.

ARIAS, C.R.; MACIÀN, M.C.; AZNAR, R.; GARAY, E.; PULJATE, M.J. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.86, p.125-134, 1999.

Associação das Marisqueiras de Salinas da Margarida. (ASMASAM) **Situação geral das marisqueiras residentes na sede do município.** Salinas da Margarida, 1997. 30p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 14 ed. Arlington, 1984. 1141p.

BAHIA, I.S. **Aspectos quantitativos da dinâmica do crescimento e da nutrição de *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) da ilha de Madre de Deus – Baía de Todos os Santos (Bahia, Brasil).** Salvador, 1995, 89p. Dissertação (Mestre em Produção Aquática) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia.

BARROS,G.C.; VIANNI, M.C.E. *Vibrio parahaemolyticus* isolamento e identificação em águas da baía de Guanabara. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, v.22, p.163-169, 1980.

BAUMANN,P.; SCHUBERT, R.H. Family II. Vibrionaceae In: MURRAY, R.G.E.; BRENNER, D.S.; BRYANT, M.P.; HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; MOULDER, J.W.; PFENNING, N.; SREATH, P.H.A.; STANLEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 10 edição. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984, vol I, p.516- 550.

BEUCHAT, L.R. Comparison of anti-vibrio activities of potassium sorbate, sodium benzoate and glycerol and sucrose esters of fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39,n.6, p.1178-1182, 1980.

BEUCHAT, L.R. Environmental factors affecting survival and growth of *Vibrio parahaemolyticus*. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v.38, n.4, p. 476-480, 1975.

BEUCHAT, L.R. Interacting effects of pH, temperature and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied of Microbiology**, Washington, v.25, p.844-846, 1973.

BEUCHAT, L.R. *Vibrio parahaemolyticus*: public health significance. **Food Technology**, Chicago, v.25, n.1, p. 80-83, 1982.

BHASHAR, N.; SETTY, T.M.R.; MONDAL, S.; JOSEPH, M.A.; RAJU, C.V.; RAGHUNATH, B.S.; ANANTHA, C.S. Prevalence of bacteria of public health significance in the cultured shrimp (*Penaeus monodon*). **Food Microbiology**, London, v.15, p.511-519, 1998.

BLAKE, P.; HERSON, M.; WEAVER, R.; HOLLIS, D.; HEUBLEIN, P. Disease caused by a marine vibrio: clinical characteristics and epidemiology. **New England Journal of Medicine**, Boston, 3.300, n.1, p.1-5, 1979.

- BLAKE, P.A.; WEAVER, R.E.; HOLLIS, D.G. Diseases of human (other than cholera) caused by vibrios. **Annual Revist of Microbiology**, Palo Alto, v.34, p.341-367, 1980.
- BOUTIN, B.K.; REYES, A.L.; PEELER, J.T.; TWEDT, R.M. Effect of temperature and suspending vehicle on survival of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.48, n.10, p.875-878, Sept., 1985.
- BRASIL. RDC nº12, 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre adões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 7 de janeiro de 2001. 34p.
- BRAUNS, L. A.; HUDSON, C.M., OLIVER, J.D.; Use of polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.9, p. 2651-2655, Sept., 1991.
- BRENNER, D.J., HICKMAN-BRENNER, F.W., LEE, J.V., STEIGERWALT, A.G., FANNING, G.R.; HOLLIS, D.G., FARMER III, J.J., WEAVER, R.E.; JOSEPH, S.W., SEIDLER, R.J. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), new species isolated from human feces and the environmental. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.18, n.4, p.816-824, 1983.
- BRYAN, F.L. Epidemiology of foodborne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970-1978. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.43, n.11, p.859-876, 1980.
- BRYANT, R.G.; JARVIS, J.; JANDA, M. Use of dodecyl sulfate-polymixin B - sucrose medium for isolation of *Vibrio vulnificus* from shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.7, p.1556-1559, July, 1987.
- BUSH, C.A.; PATEL, P.; GUNAWARDENA, S.; JOHNSON, J.A.; MORRIS, G.J. Classification of *Vibrio vulnificus* strains by the carbohydrate composition of their capsular polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, New York, v.250, p.186-195, 1997.

CARDOSO, A.L.M.P. **Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em alguns produtos de origem marinha frescos, refrigerados e congelados.** Piracicaba, 1990. 49 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CARROZZO, G. **Contaminação bacteriana em bivalves comestíveis da enseada dos Tainheiros e comercializados em feiras livres de Salvador.** Salvador, 1994. 54p. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas - modalidade Organismos Aquáticos) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal da Bahia.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Vibrio vulnificus* Infections associated with raw oyster consumption – Florida, 1981-1992. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.42, n.21, Jun.04, 1993.
<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/vulnif.html>. 22 Feb. 2000.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Vibrio vulnificus* Infections associated with eating raw oysters Los Angeles, 1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.44, n.2, Jul, 28, 1995.
<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/vulaca.html>. 14 feb.2000.

CERUTTI, R.L.; BARBOSA, T.C.P. Flora bacteriana heterotrófica em ostras (*Crassostrea rhizophora*) e águas da Baía Norte, Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Pulo, v.22, n.4, p.330-334, 1991.

CHAN, K.Y.; WOO, M.L.; LAM, L.Y.; FRENCH, G.L. *Vibrio parahaemolyticus*, and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, p.57-64, 1989.

CHERRINGTON, A.C.; HINNON, M.; PEARSON, G.R.; CHOPRA, I. Short-chain organic acids at pH 5,0 kill *E.coli* and *Salmonella* sp without causing membrane perturbation. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, n.2, p.161-165, 1991.

CHIOU, C.S.; HSU, S.Y.; CHIOU, S.I.; WANG, T.K.; CHO, C.S. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Twain from 1996 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.12, p.4621-4625, 2000.

COLWELL, R.R.; LOVELACE, T.E.; WAN, L.; KANENO, T.; STALEY, T.; CHEN, P.K.; TUBIASH, H. *Vibrio parahaemolyticus*- isolation, identification, classification, and ecology. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v.36, n. 4.,p.202-213, 1973.

COOK, D. W.; RUPLE, A. D. Cold storage and mild heat treatment as processing aids to reduce the numbers of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n.12, p.985-989, 1992.

COOK, D.W. Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus*, in postharvest Gulf Coast shellstock oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.9, p.3483-3484, 1994.

COOK, D.W. Refrigeration of oyster shellstock: conditions, which minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.4, p.349-352, 1997.

D'AQUINO, M.; TEVES, S.A . Lemon juice as a natural biocide for disinfecting drinking water. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v.28, n.4, p.324-330, 1994.

DAVIS, B.R.; FANNING, G.R.; MODDEN, J.M.; STEIGERWALT, A.G.; BRADFORD Jr., H.B.; SMITH Jr.,H.L.; BRENNER,D.J. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 14, n.16, p.631-639, 1981.

DELMORE, R.P.; CRISLEY, F.D. Thermal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in clam homogenate. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.42, n.2, p.131-134, 1979.

DUCAN, G. J.; VALENCIA, E.; GUEVARA, J. Acción in vitro de frutas y plantas sobre bacteria enteropatógenas. **Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos**, Lima, v.56, n.2, p.36-38, 1995.

EIROA, M.N.U; PORTO, E. Evaluation of different chlorine based disinfectants and vinegar against *Vibrio cholerae* present in lettuce. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.162-172, July/Dec., 1995.

EIROA, M.N.U ; PORTO, E. Influência de diferentes tipos de vinagre e do hipoclorito de sódio na sobrevivência de *Vibrio cholerae* em folhas de alface (*Lactuca sativa*) artificialmente contaminadas e sobre a microbiota natural. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.199-207, July/Dec., 1996.

ELLIOT, E. L.; KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 8. Gaithersburg. AOAC, 1998. p. 9.01-9.27.

EMPRESA BAIANA DE ÁGUAS E SANEAMENTO S.A. – (EMBASA) **Estudos de impactos ambientais para a ampliação do sistema integrado de abastecimento de água de Salinas da Margarida, Bahia**. Salvador, 1999. v.3. Relatório de Impacto Ambiental – RIMA.

ENTIS, P.; BOLESZCZUK, P. Overnight enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by hydrophobic grid membrane filtration. **Journal of Food Protection**, Des Moines v.46, n.9, p.783-786, 1983.

ESPAT, N. J.; AUFFENBERG, T. ABOUHAMZE, A.; BAUMHOFER, J.; MOLDAWER, L. L.; HOWARD, R. J. A role for tumor necrosis factor-alpha in the increased mortality associated with *Vibrio vulnificus* infection in the presence of hepatic dysfunction. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v.223, p.428-433, 1996.

FARMER III, J.J. *Vibrio (Beneckeia) vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicemia, and the sea. **Lancet**, London, v.2, p.903, 1979.

FISHBEIN, M.; WENTZ, B. *Vibrio parahaemolyticus* methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v.36, n.2, p.118-123, 1973.

FLORES ABUXAPQUI, J.J.; SUÁREZ HOIL, G.J.; HEREDIA NAVARETTE, M.R.; PUC FRANCO, M.A.; FRANCO MONSREAL, J. Calidad microbiologica de los alimentos marinos en la ciudad de Mérida Yucatán, México. **Veterinária Mexicana**, México v.27, n.4, p.319-324, 1996.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9 ed., São Paulo: Atheneu, 1996, 300p.

GARCIA – MORENO, M.L.; LANDGRAF, M. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.2, p.177-180, 1997.

GARCIA CONTÉS, V.; ANTILLÓN, F. Aislamento de vibrios enteropatógenos de bivalvos y cielo Del Golfo de Nicoya, Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, San José, v.32, n.2B, p.437-4440, 1990.

GOATCHER, L.J.; ENGLER, S.E.; WAGNER, D.C.; WESTHOFF, D.C. Effect of storage at 5°C on survival of *Vibrio parahaemolyticus* in processed Maryland oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v.37, n.2, p.74-75, 1974.

GROTTA, M.; LUNETTA, J.E. Ciclo sexual de *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin 1791) do litoral do Estado da Paraíba. **Revista Nordestina de Biologia**, João Pessoa, v.3, n.1, p.5-55, 1980.

GUEVARA DUNCAN, J.; ROEL PINEDA, S.; CARDIO GÓMEZ, E. *Vibrio parahaemolyticus* en cebiches vendidos por ambulantes de Lima – Peru. **Diagnóstico**, Lima, v.24n 1-2, p.23-26, 1989.

HACKNEY, C.R.; DICHARRY, A. Seafood-borne bacterial pathogens of marine origin. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n.3, p. 104-109, 1988

- HAGEN, C. J., SLOAN, E. M.; LANCETTE, G.A.; PEELER, J.T.; SOFOS, J.N. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various seafoods with two enrichment broths. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.5, p.403-409, 1994.
- HARRIS – YOUNG, L.; TAMPLIN, M. L.; MASON, J. W.; ALDRICH, H. C.; JACKSON, J.K. Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the American oyster (*Crassostrea virginica*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.1, p.52-57, Jan., 1995.
- HICKMAN, F.W., FARMER III, J.J.; HOLLIS, D.G.; FANNING, G.R.; STEIGERWALT, A.G.; WEAVER, R.E.; BRENNER, J.D. Identification of *Vibrio hollisae* sp.nov from patients with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.15, n.3. p.395-401, 1982.
- HIJARRUBIA, M.J.; LÁZARO, B.;SUÑÉN, E.; FERNÁNDEZ-ASTORGA, A. Survival of *V.vulnificus* under pH, salinity and temperature combined stress. **Food Microbiology**, London, n.13, p.193-199, 1996.
- HILL, W.E.; KEASLER, S.P., TRUCKSESS, M. W.; FENG,P.; KAYSNER, C.A.; LAMPEL, K.A. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.3, p. 707-711, Mar., 1991.
- HLADY, W.G.; KLONTZ, K.C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. **Journal of Infections Diseases**, Chicago, v.173, n.4, p.1176-1183, 1996.
- HOFER, E.; SILVA, C.H.D. Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no Litoral Brasileiro. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, n.4, p.327-331, 1986.
- HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E., BAKER, C.N., THORNSBERRY, C. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.3., n.4, p.425-431, 1976.

HONDA, T.; NI, Y.; MIWATANI, T.; Purification and characterization of a haemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon –negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to be the thermostable direct haemolysin. **Infectology and Immunology**, Washington, v.56, p.961-965, 1988.

HUSS, H.H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood **Food Control**, Oxford, v.8, n.2, p. 91-98, 1997.

IDLER, D.R. Effects of pollutants on quality of marine products and effects on fishing. IN: Ruivo, M. (ed). **Marine pollution and sea life**. England (FAO) Fishing News (Books) Ltda 1972, section 6, p. 533-541.

IGHAM, S.C.; POTTER, N.N. Survival and growth of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Staphylococcus aureus* on cooked mince and surimis made from Atlantic Pollock. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 51,n.8, p.634-638, 1988.

JANDA, J.M.; POWER, S.C.; BRYANT, R.G.; ABBOT, S.L. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.1, n.1, p.245-267, 1988.

JONES, S. H.; SUMMER-BRASON, B. Incidence and detection of pathogenic *Vibrio* sp in a Northern New England estuary, USA. **Journal of Shellfish Research**, New York, v.17, n. 5, p.1665 -1669, 1998.

KAPER, J.B.; REMMERS, E.F.; COLWELL, R.R. A medium for presumptive identification of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.43, n.12, p.936-938, 1980.

KARUNASAGAR, I.; ENUGOPAL, M.N.; KARUNASAGAR, I.; SEGAR, K. Evaluation of methods for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. **Applied and Environmental of Microbiology**, Washington, v.52, n.3, p.583-585, 1986.

KASPAR, C.W.; TAMPLIN, M. L. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.8, p.2425-2429, Aug. 1993.

KAYSNER, C.; ABEYTA Jr., C.; WEKELL, M.; DePAULA Jr., A.; STOTT, R.F.; LEITCH, J.M. Virulent strain of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.6, p.1349-1351, June, 1987.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA Jr., C.; JINNERMAN, K.C.; HILL, W.E. Enumeration and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* by DNA-DNA colony hybridization using the hydrophobic grid membrane filtration technique for isolation. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.2, p.163-165, 1994.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA Jr., C.; STOTT, R.F.; KRANE, M.H.; WEKELL, M.M. Enumeration of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae* from samples of an oyster growing area, Grays Harbor, Washington. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.4, p.300-301, 1990.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA Jr., 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 Pacific Northwest. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.8, p.3020-3022, 1994.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA, JR.C; STOTT, R.F.; LILJA, J.L.; WEKELL, M.M. Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, April, v.56, n.4, p. 904-907, 1990 (a).

KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L.; WEKEEL, M.M.; STOTT, R.F.; COLBURN, K.G. Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effects of isolation medium on recovery. **Applied and Environmental Microbiology** Washington, v.55, n.12, Dec, p.3072-3079, 1989.

KELLY, M.T. Effect of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* occurrence in Gulf Coast environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.820-824, 1982.

KELLY, M.T.; DINUZZO, A. Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf Coast oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50,n.6, p.1548-1549, Dec., 1985.

KLONTZ, K.C.; SPENCER, L., SCHEREIBER, M.; JANOWSKI, H.; BALDY, L.; GUNN, R.S. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections: clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v., p. 318-323,1988.

KLONTZ, K.C.; WILLIAMS, S.L.; BALDY, L.M.; CAMPOS, M. Raw oyster-associated vibrio infections: linking epidemiological data with laboratory testing of oysters obtained from a retail outlet. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, n.11, p.977-979, 1993.

KOBAYASHI, K.; OHNATA, T. Food poisoning due to newly recognized pathogens. **Asian Medical Journal**, Tokyo, v.32, n.1, p.1-12, 1989.

KUMAMOTO, K. S.; VUKICH, D.J. Clinical infections of *Vibrio vulnificus*. A case report and review of the literature. **The Journal of Emergency Medicine**, New York, v.16, n.1, p. 61-66, 1998.

LANDGRAF, M.; LEME, K.B.P.; GARCIA –MORENO, M.L. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio* spp in seafood consumed in São Paulo city – Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.126-130, 1996.

LEE, J.S. What seafood processors should know about *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v.36, n.4,p.405-408, 1973.

LEE, S.E.; KIM, S.J.; KIM, H.S.; SHIN, J. S.; CHOI, S.H.; CHUNG, S.S.; RHEE, J.H. Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.10, p. 2887-2892, 1998.

LEITÃO, M.F.F. Resistência térmica e caracterização *Vibrio parahaemolyticus* por eletroforese em gel de sobrenadantes de culturas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.3, p.369-423, 1969-1970.

LEITÃO, M.F.F.; ARIMA, H.K.; KAI, M. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do estado de São Paulo. II- Incidência em peixes, moluscos e crustáceos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p.181-190, 1976.

LEITÃO, M.F.F.; ARIMA, H.K. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do estado de São Paulo. I – Ocorrência na água e avaliação da metodologia para isolamento. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.6, p.149-166, 1975.

LEITÃO, M.F.F.; MONTEIRO FILHO, E.; DELAZARI, I.; ANGELUCCI, E. Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface (*Lactuca sativa* L.) **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.2, p.201-226, 1981.

LEVINE, M.M; BLACK, R., CLEMENTS, M.L. Pathogenesis of enteric infections caused by *Vibrio*. In COLWELL, R.R.. **Vibrios in the environment**. New York: John Wiley, 1984, p.109-143.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; TATENO, S. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de humanos e de ostras no Recife, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n.2, p.83-88, 1991(b).

MAGALHÃES, M.; SILVA, G.P.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; ANDRADE, M.A.; TATENO, S. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* associated with infantile diarrhea. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.24, n.4, p.295-298, 1990.

MAGALHÃES, V.; LIMA, R. A.; TATENO, S.; MAGALHÃES, M. Gastrenterites humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.33, n.1, p.64-68, 1991(a).

MASCARENHAS, J. C.; SIMÕES, A.M.M.; MORAIS, S.I.M.; ALMEIDA, A. C. de; GÓES, R.C.S. Isolamento do *V.mimicus* em pescado envolvidos em surto de toxinfecção alimentar na cidade de Salvador-BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador. **Livro de Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, 1999. p. 386.

MASSAD, G; OLIVER, J.D. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n. 9, p.2262-2264, Sept.,1987.

MASSAD,G.; SIMPSON, L..M., OLIVER, J.D. Isolation and characterization of hemolysin mutants of *Vibrio vulnificus*. **FEMS. Microbiology Letters**, Amsterdam, v.56, p.295-300, 1988.

MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M. H.; RIVERA, I.G.; MARTINS, M.T. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from a tropical region. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.10, p.870-873, 1994b.

MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M. H; SATO, M. I. Z.; SANCHEZ, P. S.; RIVERA, I.G.; MARTINS, M.T. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic Coast of Brazil. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.77, p.281-287, 1994a.

MAUGERI, T.L.; CACCAMO, D.; GUGLIANDOLO, C. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.89, n.2, p.261-266, 2000.

MELLO,R.L.S. **Aspectos preliminares sobre *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin1791) no litoral de Pernambuco (Molluca-Bivalvia)**. Recife,1974. 143p. Tese de Livre Docência – Universidade Federal de Pernambuco.

MENDES, E. S.; MENDES, P.P.; SOUZA,J.C.R.; COELHO, M.I.S.; CRUZ, M.C.S.; ASSIS, A.S. Influencia do suco de limão sobre os coliformes e vibrios. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca e Congresso Latino Americano de Engenharia de Pesca, 9 e 1.1999, Recife. **Anais**. Recife:CONBEP, 1999. p. 339-343.

MENDONÇA – HAGLER, L.C. ; HAGLER, A .N. Microbiologia aquática. In: Roitman, I.; Travassos, L. R.; Azevedo. J.L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, Ltda, 1991.v.2, cap.4, p.83-102.

MIRANDA,M.S.; MOTA, E. ; GUIMARÃES, A. G. ; CONCEIÇÃO, M.F.; FERNANDES, B.G. Influência da sazonalidade na composição química centesimal de marisco da Baía de Todos os Santos- Bahia. In: Simpósio latino Americano de Ciência de Alimentos, 3.,1999, Campinas. **Livro de Programa e Resumos**. Campinas: FEA-UNICAMP, 1999, 230p.

MIYAMOTO, T., MIWA, H.; HATANO, S. Improved fluorogenic assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.5, p.1408-1484, 1990.

MIYAMOTO, Y.; KATO, T.; OBARA, Y. ARIYAMA, S.; TAKIGAMA, K.; YMAI, S. In vitro hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human, pathogenicity. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.100, n.2, p.1147-1149, 1969.

MIYAMOTO, Y.; NAKAMURA, K.; TAKIZAWA, N. Proposals of a new genus “*Oceanomonas*” and of the amended species names **Japanese Journal of Microbiology**, Tokyo, v. 5,p.477-486, 1961.

MOLITORIS, E.; JOSEPH, S.W.; KRICHEVSKY,M.Y.; SINDHUHARDJA, W.; COLWELL, R.R. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* an *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, n.6, p.1388-1394, Dec., 1985.

MORRIS Jr., G.; BLACK, R.E. Cholera and other vibrioses in the United States. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.312, p.343-350, 1985.

MORRIS Jr., J.G.; WRIGHT, A.C.; ROBERTS, D.M; WOOD, P.K.; SIMPSON, L.M.; OLIVER, J.D. Identification of environmental *Vibrio vulnificus* isolates with a DNA probe for the cytotoxin-hemolysin gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53,n.1, p.193-195, Jan., 1987.

MOTES, M.L.; DePAOLA, A.; COOK, D.W., VEAZEY, J.E.; HUNSUCKER, J.C., GARTHRIGHT, W.E.; BLODGETT, R. J.; CHIRTEL, S.J. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.4, p. 1459-1465, Apr., 1998.

MURPHY, S.K. ; OLIVER, J.D. Effects of temperature abuse on survival of *Vibrio vulnificus* in oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.9, p.2771- 2775, 1992.

NARCHI, W. **Anatomia funcional de alguns Bivalvia do litoral do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1969. 128p. Tese de Livre Docência - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo.

NARCHI, W. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v.27, n.9, p.235-262, 1974.

NARCHI, W. Ciclo anual da gametogênese de *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Mollusca- Bivalvia). **Boletim de Zoologia**, São Paulo, v.1, p.331-350, 1976.

NASU, H.; IIDA, T.; SUGAHARA, T.; YAMAICHI, Y.; PARK, K.S. YOKOYAMA, K.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; HONDA, T. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.6, p.2156-2161, 2000.

NICKELSON, R.; VANDERZANT, C. *Vibrio parahaemolyticus* a review. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v. 34, n.9, p.447-452, 1971.

NILSSON, L.; OLIVER, J.D.; KJELLEBERG, S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, n.16, p.5054-5059, 1991.

O'NEILL, K.R., JONES, S.H., GRIMES, D.Y. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n. 10, p.3257-3262, Oct., 1992.

O'NEILL, K.R.; JONES, S.H.; GELMES, D. J.; Incidence of *Vibrio vulnificus* in Northern New England water and shellfish. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v.72, p.163-168, 1990.

OKUDA, J., ISHIBASHI, M., HAYAKAWA, E., NISHINO, T.; TAKEDA, Y.; MUKHOPADHYAY, A. K. ; GARG, S.; BHATTACHARYA, S.K.; NAIR, G.B.; NISHIBUCHI, M. Emergence of unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.12, p. 3150-3155, 1997.

OLIVER, J.D.; GUTHRIE, K.; PREYER, J., WRIGHT, A.; SIMPSON, L.M.; SIEBELING, R.; MORRIS Jr., J.G. Use of colistin-polymixin B –cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 2, p.737-739, Feb., 1992.

OLIVER, J.D.; *Vibrio vulnificus*. In: Doyle, M.P., ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York : Marcel Dekker, 1989. p.570-600.

OLIVER, J.D.; WARNER, R.A.; CLELAND, D.R. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.45, n.3, p.985-998, 1983.

OLIVER, J.D.; NILSSON, L.; KJELLEBERG, S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2640-3644, 1991.

OSAWA, R.; OKITSU, T.; MOROZUMI, H.; YAMSI, S. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related –hemolysin genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.725-727, 1996.

PACE, J.; CHAI, T. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine water and rich medium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.8, p.1877-1887, 1989.

PAN, T.M.; WANG, T.K.; LEE, C.L.; CHIEN, S.W.; HORNG, C.B. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Twain, 1986 a 1995. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.2, May, p.1260-1262, 1997.

PARKER, R.W.; LEWIS, D.H. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio vulnificus* hemolysin to detect *Vibrio vulnificus* in environmental specimens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.2, p. 476-480, Feb., 1995.

PARKER, R.W.; MAURER, E.M.; CHILDERS, A.B.; LEWIS, D.H. Effect of frozen storage and vacuum-packaging on survival of *Vibrio vulnificus* in Gulf Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.7, p.604-606, 1994.

PEDROSA, L.F. ; COZZOLINO, S.M.F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/R.N. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21,n.2, p.154-157, May/Aug., 2001.

PESO, M.C. **Bivalves comestíveis da Baía de Todos os Santos. Estudo quantitativo com especial referência a *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) (Bivalvia – Veneridae)**. Curitiba, 1980, 168p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná.

PETERKIN, P.I. New pathogens of interest in food *Vibrio vulnificus*. **Revista Microbiologia**, São Paulo, v.25, n.3, p.137-143, 1994.

PETERSON, E.H. Comparative study of procedures for quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.42, n.11, p.852-854, 1979.

PORTO, E. ; EIROA, M.N.U. Influência de diferentes tipos de vinagre e do suco de limão Taiti , na sobrevivência de *Vibrio cholerae* presente em filés de merluza. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n. 1,2, p.1-6, 1997.

- RANK, E.L.; SMITH, I.B.; LANGER. Bacteremia caused by *Vibrio hollisae*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.2, p.375-376, 1988.
- RENDÓN, F.E.; NAVA FÉRNANDEZ, L.M.; DELACARLA, L.M.; Ausencia de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado crudo. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v.30, n.2, p.91-96, 1998.
- RIOS, E.C. **Seashells of Brazil**. 2ed., Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande, 1994, 492p.
- RODRIGUES, D.P.; HOFER, E. *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, n.4, p.332-338, 1986.
- RODRIGUES, D.P.; RIBEIRO, R.V., ALVES, R.M.; HOFER, E. Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.88, n.4, p.589-592, 1993.
- RUPLE, A. D.; COOK, D. W. *Vibrio vulnificus* and indicator bacteria in shellstock and commercially processed oysters from the Gulf Coast. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, p. 667-671, Sept., 1992.
- SAKASAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAI, S.; HOBOKAWA, K. Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* III Enteropathogenicity. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, Tokyo, v.21, p.325-331, 1968.
- SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; FUKUMI, H.; Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural, and biochemical properties and its taxonomical position. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, Tokyo, v.16, p. 161-188, 1963.
- SAUTTER, R.L.; TEYLOR, J.S.; OLIVER, J.D.; O'DONNELL, C. *Vibrio parahaemolyticus* (Kanagawa negative) wound infection in a hospital dietary employee. **Diagnostic of Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v.9, p.41-45, 1988.

SCHANDEVYL, P.; VAN DICK, E.; PIOT, P. Halophilic vibrios species from seafish in Senegal. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.1, p.236-238, 1984.

SHINODA, S.; MIYOSHI, S.; YAMANAKA, H.; MIYOSHI-NAKAHARA, N. Some properties of *Vibrio vulnificus* hemolysin. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.29, n.7, p.583-590, 1985.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.S.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SIMONSON, J.; SIEBELING, R.J. Rapid serological identification of *Vibrio vulnificus* by anti-h coagglutination. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n. 6. p.1299-1304, Dec., 1986.

SIMPSON, L.M.; WHITE, V. K.; ZANE, S. F.; OLIVER, J. D. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. **Infections and Immunology**, Washington, v. 55, n.1, p.269-272, 1987.

SLOAN, E. M.; HAGEN, C.J.; LANCETTE, G.A., PEELER, J.T.; SOFOS, J.N. Comparison of five selective enrichment broths and two selective agars for recovery of *Vibrio vulnificus* from oysters. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n.5, p. 356-359, May, 1992.

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

SUN, Y.; OLIVER, J.D. Anti microbial action of some GRAS compounds against *Vibrio vulnificus*. **Food Additives and Contaminants**, London, v.11, n.5, p.549-558, 1994(a).

SUN, Y.; OLIVER, J.D. Effects of GRAS compounds on natural *Vibrio vulnificus* populations in oysters. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.10, p.921-923, 1994(b).

TACKET, C.O., BRENNER, F., BLAKE, P. A., Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.149, n.4, p.558-561, 1984.

TAKIKAWA, I. Studies on pathogenic halophilic bacteria. **Yokohama Medical Bulletin**, Yokohama, v.9, p.313-322, 1958.

TAMPLIN, M.L.; CAPERS, G.M. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with U.V light. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.5, p. 1506-1510, 1992.

TAMPLIN, M.L.; MARTIN, A.L.; RUPLE, A.D.; COOK, D.W.; KASPAR, C.W. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment and oysters **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.4, p.1235-1240, Apr., 1991.

THEOPHILO, G.N.; VIEIRA, R.H.S.F. Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em caranguejos crus e cozidos comercializados na praia do Futuro (Fortaleza –Ce). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.134-142, 1994.

TISON, D.L.; NISHIBUCHI, M.; SCIDLER, R.J.; SIBELING, R.J. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from Oregon coastal environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, n.2, p.444-445, 1986.

TOLEDO, L.R. Nem tanto ao mar. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, ano 16, n.187, p.77-82, maio, 2001.

TWEDT, R.M. *Vibrio parahaemolyticus*. In: Doyle, M.P. ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p.543-568.

VANOY, R. W.; TAMPLIN, M.L.; SCHWARZ, J.R. Ecology of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay oysters, suspended particulate matter, sediment and seawater: detection by monoclonal antibody-immunoassay-most probable number procedures. **Journal of Industrial Microbiology**, Basingstoke, v. 9, p.219-223, 1992.

VIEIRA, R.H.S.F.; IARIA, S.T. *Vibrio parahaemolyticus* in lobsters *Panulirus laevis* (Latreille). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.24, n.1, p.16-21, 1993.

VENKATESWARAN, K.; KURUSU, T.; SATAKE, M.; SHINODA, S. Comparison of fluorogenic assay with a conventional method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.9, p.3516-3520, 1996.

VENKATESWARAN, K.; KIIYKUIA, C.; TAKAKI, M.; NAKANO, H.; MATSUDA, H.; KAWAKAMI, H.; HASHIMOTO, H. Characterization of toxigenic vibrios isolated from the freshwater environment of Hiroshima, Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.10, p.2613-2618, 1989.

WEST, P.A. The human pathogenic vibrios- A public health update with environmental perspectives. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.103, p.1-3, 1989.

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

WOOD, P.C. **Manual de higiene de los mariscos**. Tradução Pedro José Menodio Iglesia. Zaragoza: Editorial Acribia, 1979, 83 p.

WRIGHT, A.C.; HILL, H.T.; JOHNSON, J.A.; ROGHMAN, M.C.; COLWELL, R.R.; MORRIS Jr., J.G. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.717-724, Feb., 1996.

WRIGHT, A.C.; MICELI, G.A.; LANDRY, W.L.; CHRISTY, J.B.; WATKINS, W.D.; MORRIS Jr., J.G. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase labeled oligonucleotide probe. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.2, p.541-546, Feb., 1993.

WRIGHT, A.C.; MORRIS Jr, J.G. The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*. Inactivation and relationship to virulence in mice. **Infections and Immunology**, Washington, v.59, n.1, p.192-197, 1991.

WRIGHT, A.C.; SIMPSON, L. M.; OLIVER, J.D. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. **Infections and Immunology**, Washington, v. 34, n.2, p.503-507, 1981.

WU, H.S.; LIU, D.P.; HWANG, C. H.; CHEN, M.J.; HWANG, J.L., LIU, Y.; SHANKVAN. L.C.; LIN, C.S.; WU, T. N. Survey on the distribution of *Vibrionaceae* at the seaports areas in Taiwan, 1991-1994. **Chinese Journal of Microbiology Immunology**, [s.l], v.29, p.197-209, 1996.

YAM,W.C.; CHAN,C.Y.; BELLA,S.W.H.; TAM,T.Y.; KUEH,C.; LEE,T. Abundance of clinical enteric bacterial pathogens in coastal waters and shellfish. **Water Resources**, New York, v.34, n.1, p.51-56, 1999.

YAMANAKA, H.; SUGIYAMA, K.; FUKUTA, H.; MIYOSHI, S.; SHINODA, S.; Cytolysin action of *Vibrio vulnificus* haemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity. **Journal of Medicine and Microbiology**, Edimburgo, v.32, p39-43, 1990.

YOSHIDA, S. I.; OGAWA, M.; MIZUGUCHI, Y. Relation of capsular material and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. **Journal of Infections and Immunology**, Chicago, v. 47, n.2, p. 446-451, 1985.

ZEBRAL, A.A. Isolamento e caracterização de vibrio lactose positivo, de mexilhões da Baía de Guanabara, Estado do Rio de Janeiro. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p.46-48,1985.