

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *VIBRIO* *PARAHAEMOLYTICUS* EM OSTRAS (*CRASSOSTREA* *RHIZOPHORAE*) CULTIVADAS NA BAIÁ DE TODOS OS SANTOS¹

Leticia de Alencar Pereira Rodrigues²
Celso Duarte Carvalho Filho³

RESUMO: Com o objetivo de determinar as populações de *V. parahaemolyticus* ao longo da cadeia produtiva aliada à influência da salinidade e temperatura da água no cultivo, sete coletas de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) foram realizadas no município de Santiago do Iguape/BA. O Número Mais Provável (NMP/g) de *V. parahaemolyticus* nas amostras de cultivo, após o transporte, após a depuração e na etapa de consumo variou de <3 a $3,5 \times 10^2$, <3 a $4,7 \times 10^2$, <3 a $5,5 \times 10^2$, <3 a $3,3 \times 10^5$, respectivamente. A etapa de consumo apresentou a maior média e diferença estatística em relação às demais etapas. As variáveis ambientais no cultivo (temperatura e salinidade) demonstraram correlação com o isolamento de *V. parahaemolyticus*. Com a detecção do aumento do microrganismo ao longo da cadeia produtiva, faz necessário a implantação de programas de Boas Práticas de Produção na região.

PALAVRAS-CHAVE: *Crassostrea rhizophorae*, ostras, *V. parahaemolyticus*, consumo, depuração.

EVALUATION OF THE OCCURRENCE OF *Vibrio parahaemolyticus* IN OYSTERS
(*Crassostrea rhizophorae*) CULTIVATED IN BAIÁ DE TODOS OS SANTOS

ABSTRACT: Aiming to determine the populations of *V. parahaemolyticus* along the supply chain together with the influence of salinity and water temperature in cultivation, seven samples of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) were conducted in the city of Santiago de Iguape / BA. The Most Probable Number (MPN/g) of *V. parahaemolyticus* in samples of culture, after transport, after purification and consumption ranged from <3 to 3.5×10^2 ; <3 to 4.7×10^2 ; <3 to 5.5×10^2 ; <3 to 3.3×10^5 , respectively. The stage of consumption had the highest average and

¹Extraído da Dissertação de Leticia de Alencar Pereira Rodrigues. Título: Avaliação do risco microbiológico por *Vibrio parahaemolyticus* em ostras nativas (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Baía de Todos os Santos. 2009. Universidade Federal da Bahia.

² SENAI-CETIND/Laboratório de Microbiologia, Av. Luiz Tarquínio Pontes, 938, Aracuí, CEP 42700-000, Lauro de Freitas, BA, Brasil (letialencar@gmail.com)

³ Universidade Federal da Bahia, Departamento de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Rua Barão de Geremoabo s/n, Ondina, CEP 40170-290, Telefone: (71) 33321580, end_of_the_skype_highlighting Salvador, BA, Brasil (celsodc@ufba.br).

statistical difference compared to other stages. Environmental variables in cultivation (temperature and salinity) showed correlation with the isolation of *V. parahaemolyticus*. With the increase in the detection of microorganisms along the production chain, makes necessary the implementation of programs of Good Manufacturing Practices in the region.

KEY WORDS: *Crassostrea rhizophorae*, oysters, *V. parahaemolyticus*, consumption, depuration.

INTRODUÇÃO

A produção mundial da aqüicultura tem crescido notadamente durante os últimos 50 anos, aumentando de quase 1 milhão de toneladas no começo de 1950 para 59,4 milhões de toneladas em 2004. O consumo médio aparente aumentou, de cerca de, 9 kg per capita (FAO, 2007). Na Bahia, a produção estimada de moluscos foi de 1.252 ton., representando 2,7% do total da pesca extrativa marinha, que inclui peixes, crustáceos e moluscos. As principais espécies de moluscos produzidas foram mariscos, sururu e ostra, sendo que o volume de ostras produzidas foi de aproximadamente 29,5 ton. (IBAMA, 2005).

Dentre os 10 principais grupos de espécies na produção da aqüicultura mundial no período de 2002 a 2004, as ostras representaram o segundo lugar, com produção de aproximadamente 4,3 milhões de toneladas em 2002 e 4,6 milhões de toneladas em 2004, representando crescimento médio de 3,1% no período (FAO, 2007).

O gênero *Crassostrea* reúne as ostras de maior interesse econômico em função do valor alimentício da “carne” e do uso da concha como matéria prima na fabricação de diversos produtos. (IBAMA, 2005).

A capacidade de filtração da ostra pode atingir 10 litros de água por hora e cerca de 200 litros por dia. Por esta característica e processo de bioacumulação, as ostras são reconhecidas como reservatório de vários microrganismos patogênicos humanos e podem acumular bactérias patogênicas naturais do ambiente marinho (LEE *et al*, 2003; POTASMAN *et al*, 2002).

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de reconhecer no ambiente marinho, bactérias autóctones e outras potencialmente capazes de provocar doenças no homem. O habitat dos microrganismos das famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae* é o ambiente aquático dulcícola e marinho. Convém ressaltar que a presença desses microrganismos no ecossistema aquático não possui correlação direta com a presença de indicadores de contaminação fecal (*Escherichia coli*) (LEE *et al*, 2003; GONZALES-ESCALONA *et al*, 2005).

As infecções humanas causadas por *V. parahaemolyticus* tem sido reportadas comumente na Ásia e nos Estados Unidos, sendo considerada rara na Europa. As Doenças de Transmissão Alimentar são a principal forma de infecção provocada por este microrganismo presente em alimentos crus ou imprópriamente cozido ou ainda em alimentos cozidos ou em casos de recontaminação dos alimentos. Infecções extraintestinais podem ocorrer, mas numa frequência bem menor quando comparada com as gastroenterites (HEITMANN *et al*, 2005).

V. parahaemolyticus é uma bactéria considerada emergente devido a sua associação com surtos epidêmicos após o consumo de alimentos, em especial pescados e moluscos consumidos *in natura* ou parcialmente submetidos à cocção. Esta particularidade favorece a atuação das toxinas TDH (Thermostable Direct Hemolysin), TRH (Thermostable Related Hemolysin) e TLH (Thermolabile Hemolysin), reconhecidas como principais fatores de virulência (GONZALEZ-ESCALONA *et al*, 2005; HEITMANN *et al*, 2005; HONDO *et al*, 1987; PERREIRA *et al*, 2004).

As ostras, *Crassostrea rhizophorae*, são geralmente consumidas *in natura* sem prévio cozimento adicionado de algumas gotas de limão. Essa característica de preparo do alimento torna-o um risco potencial para a saúde humana, pois os moluscos alimentam-se, por processo de filtração, de partículas e de microrganismos em suspensão na água, permitindo a retenção e acúmulo de poluentes e bactérias patogênicas (PRUZZO *et al*, 2005).

A pesquisa teve como objetivos: determinar *V. parahaemolyticus* em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) ao longo da cadeia produtiva (cultivo, após o transporte, após processo de depuração e comercialização), assim como

avaliar a influência dos parâmetros físico-químicos: salinidade e temperatura, sobre presença do *V. parahaemolyticus*.

MATERIAL E MÉTODOS

As colheitas das amostras foram realizadas em Santiago de Iguape, que pertence ao município de Cachoeira/BA. O período do experimento foi de 12 meses (janeiro de 2008 à janeiro de 2009). Foram realizadas sete colheitas de ostras *Crassostrea rhizophorae* e água de cultivo. Os quatro pontos de amostragem foram: cultivo, transporte, após o processo de depuração e consumo. A metodologia de colheita foi efetuada conforme orientações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB/SP.

Para análise de *V. parahaemolyticus*, as análises foram realizadas conforme Bacteriological Analytical Manual online (KAYSNER e DEPAOLA, 2003). O estudo da virulência foi efetuado através da verificação do fenômeno de Kanagawa, conforme Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (KAYSNER e DEPAOLA, 2001). A temperatura da água do mar e da água de depuração foi obtida por leitura direta através de Termômetro digital INCOTERM. A salinidade da água do mar e da água de depuração foi obtida através da análise conforme SMEWW, 2005.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando as ferramentas de análise do Microsoft® Excel, com nível de significância de 5%. Os valores de NMP foram calculados com a tabela para uma série de três tubos por diluição de acordo com Bacteriological Analytical Manual online (BLODGETT, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Número mais provável de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras ao longo da cadeia produtiva

O Número Mais Provável (NMP/g) de *V. parahaemolyticus* nas amostras de ostra na etapa de cultivo, após o transporte, após a depuração e na etapa de consumo está apresentado na Tabela 1, resultando em variações de <3 a $3,5 \times 10^2$, <3 a $4,7 \times 10^2$, <3 a $5,5 \times 10^2$, <3 a $3,3 \times 10^5$, respectivamente.

Tabela 1. População média de *Vibrio parahaemolyticus* (NMP/g) isolada de ostras em pontos da cadeia produtiva das ostras oriundas de Santiago do Iguape/BA.

Coleta	Cultivo	Transporte	Depuração	Consumo
	<i>V. parahaemolyticus</i> total			
Janeiro/08	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
Abril/08	2,3	2,5	3,4	$1,2 \times 10^3$
Agosto/08	4,2	4,7	9,3	$1,3 \times 10^3$
Setembro/08	9,2	9,3	$1,4 \times 10$	$1,6 \times 10^4$
Novembro/08	$1,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^5$
Janeiro/09	$3,5 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$3,3 \times 10^5$
Fevereiro/09	$3,2 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$

Uma vez introduzido, vários fatores podem influenciar a permanência de *V. parahaemolyticus* no ambiente, os quais incluem a interação de condições ambientais, as espécies e a fisiologia dos mariscos, além da genética do microrganismo (GARAY *et al*, 1985).

A média do NMP de *V. parahaemolyticus* em amostras de ostras, durante as sete colheitas, está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Média do Número Mais Provável de *V. parahaemolyticus* nas ostras em cada etapa, durante as sete colheitas.

Etapas do processo	Média (log NMP/g)
Cultivo	1,28 ^a
Transporte	1,32 ^a
Depuração	1,45 ^a
Consumo	3,67 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística a um nível de 5%.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de *V. parahaemolyticus* (log NMP/g) nas etapas de cultivo, transporte e depuração (Tabela 2). Para a etapa de consumo, foi observada a maior média e diferença estatística em relação às demais etapas.

A multiplicação de *V. parahaemolyticus* pode ocorrer no período compreendido entre a coleta das amostras, no local de cultivo, até a sua chegada ao comércio, sendo influenciada pelo tempo de coleta, pela temperatura da ostra durante o transporte, pela taxa de multiplicação de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura e pelo processo de depuração (SOBRINHO, 2007).

ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* PATOGÊNICO

No presente estudo, 156 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* oriundas de ostras foram isoladas ao longo da cadeia produtiva. Nenhuma cepa isolada apresentou resultado positivo para o teste de Kanagawa.

Alguns pesquisadores encontraram somente 1,1% de cepas oriundas de amostras de ostras como sendo Kanagawa positivas (MATTÉ *et al*, 1994) e outros não encontraram positividade (PERREIRA *et al*, 2004). Quase todas as cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras clínicas demonstraram esta atividade hemolítica, que tem sido chamada de fenômeno de Kanagawa (KP), ao passo que somente 1 a 2% das cepas de fontes não clínicas são KP positivas (DEPAOLA *et al*, 1990).

FREQÜÊNCIA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EM OSTRAS NA ETAPA DE CULTIVO

A presença de *V. parahaemolyticus* nas amostras de ostras deste trabalho foi de 85,7%, sendo também constatada em pesquisas realizadas em ostras valores de 93,8% (DEEPANJALI *et al*, 2005), 93% (DEPAOLA *et al*, 2000), 61,5% (RODRIGUES, 1998), 72,9% (COOK *et al*, 2002), em diferentes países.

Pesquisas realizadas no Brasil em ostras, também constataram uma

variação na incidência de *Vibrio parahaemolyticus*: 87,5% (LANDGRAF *et al*, 1996), 100% (RISTORI, 2000) e 86,4% (PERREIRA *et al*, 2004).

Relação entre os parâmetros do ambiente (temperatura e salinidade) e o isolamento de *Vibrio parahaemolyticus*

A incidência de *Vibrio parahaemolyticus*, neste estudo, demonstrou correlação significativa com a temperatura das águas onde os moluscos foram cultivados ($R^2 = 0,5902$, $R = 0,7683$, $p = 0,0436$), ou seja, a medida que observamos um aumento na temperatura das águas, há também um aumento na incidência de *V. parahaemolyticus* nas ostras cultivadas (Figura 1).

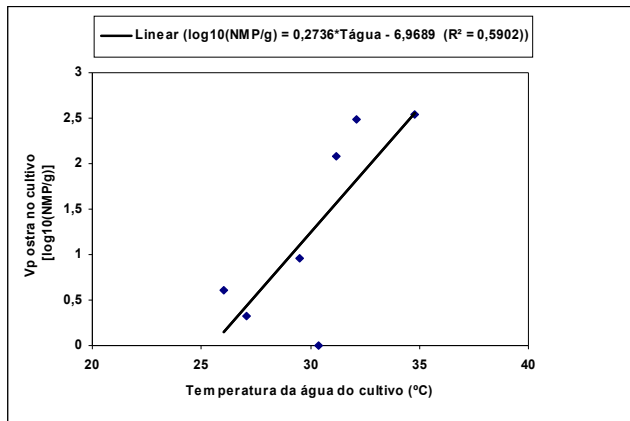


Figura 1. Ajuste do modelo de regressão linear da população de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras no cultivo em função da temperatura da água do cultivo.

Um estudo realizado em seis regiões diferentes na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina onde os moluscos são cultivados, encontrou correlação significativa de *Vibrio* spp. em ostras com a temperatura das águas ($R = 0,5085$, $p = 0,00001$), mas em relação à salinidade, não encontrou correlação significativa com a população de *V. parahaemolyticus* ($R = 0,1753$, $p > 0,05$) (RAMOS, 2007).

A correlação também foi significativa com a salinidade da água (Figura 2) onde os moluscos foram cultivados ($R^2 = 0,66970$, $R = 0,81835$, $p =$

0,02442) indicando que a população de *V. parahaemolyticus* foi também influenciada pela variação de salinidade das águas de cultivo.

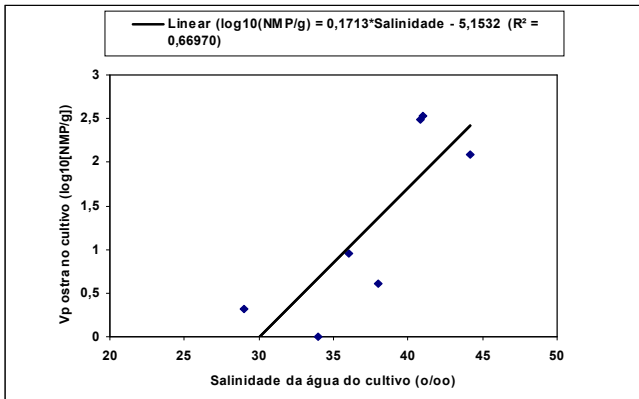


Figura 2. Ajuste do modelo de regressão linear da população de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras no cultivo em função da salinidade da água do cultivo.

Pesquisadores estudaram a influência da temperatura da água e salinidade na ocorrência de *Vibrio cholerae* em ostras produzidas em Veracruz, no México e encontraram uma correlação positiva, tanto com a temperatura, como com a salinidade da água de cultivo (CHAVÉZ *et al*, 2005).

A concentração de *Vibrio parahaemolyticus* nas águas marinhas aumenta com o aumento da temperatura destas, e corresponde com um aumento sazonal na ocorrência de casos esporádicos de infecções nos meses mais quentes (HLADY e KLONTZ, 1996). Recentemente, estudos demonstraram correlação positiva entre *Vibrio parahaemolyticus* em água do mar e temperatura da água nos meses de verão (DUAN e SU, 2005).

Diante do exposto, pode-se verificar que houve interferência da sazonalidade com relação ao isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* no local do cultivo, pois, sabe-se que a temperatura é uma variável ambiental determinante.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a população de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras é maior após a etapa de depuração e no momento do consumo do que na etapa de cultivo, o que sugere que as práticas adotadas na empresa estudada contribuem para a multiplicação de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, ao longo da cadeia produtiva, sendo necessária a implantação de programas de controle de qualidade tais como Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)..

REFERÊNCIAS

- BLODGETT, R.J. Most probable number from serial dilutions. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. 2003. Appendix 2. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>. Acesso em: 10 set. 2007.
- CHÁVEZ, M. DEL R.C.; SEDAS, V.P.; BORUNDA, E.O.; REYNOSO, F.L. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 12, p. 1641-1648, 2005.
- COOK, D. W.; BOWERS, J. C.; DePAOLA, A.. Density of total and pathogenic (*tdh*+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf Coast molluscan shellfish at harvest. **J. Food Prot.**, v. 65, p. 1873-1880. 2002.
- DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oysters along the southwest coast of India. **Appl Environ Microbiol.**, v. 71, n. 7, p. 3575–3580, 2005.
- DePAOLA, A., HOPKINS, L.H., PEELER, J.T., WENTZ, B.; MCPHEARSON, R.M. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.8, p. 2299–2302, 1990.
- DePAOLA, A., KAYSNER, C.A., BOWERS, J., COOK, D.W. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4649–4654. 2000.

DUAN, J.; SU, Y.C. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays. **J. Food Sci.**, v. 70, 2005.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006. Departamento de Pesca y Acuicultura de la. Roma, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/a0699s/A0699S00.HTM>>. Acesso em: 06 nov. 2007.

GARAY, E.; ARNAU, A.; AMARO, C. Incidence of *Vibrio cholerae* and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 426-430, 1985.

GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; CACHICAS, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M.L.; VERGARA, J.A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 129-131, 2005.

HEITMANN, I. G.; JOFRE, L. M.; HORMAZABAL, O. J. C.; OLEA, A.; VALLEBUONA, C.; VALDES, C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 22, n. 2.; p. 131-140, 2005.

HONDO, S.; GOTO, I.; MINEMATSU, I.; IKEDA, N.; ASANO, S.; ISHIBASHI, M, KINOSHITA, Y.; NISHIBUCHI, N.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. **Lancet**, v. 1, n. 8528, p. 331-332, 1987.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da Pesca, 2005**. Brasília, DF, 2005. 115 p.

HUSS, H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. 176p. **FAO Documento Técnico sobre as Pescas**, v. 334, Roma, 1997.

KAYSNER, C.A.; DePAOLA, A. *Vibrio*. In: DOWNES, F. P. & K. ITO (eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4^{ed}**. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 40, p. 405-420.

KAYSNER, C.A.; DePAOLA, A. *Vibrio*. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. 2003. Cap. 9. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html> >. Acesso em: 11 ago. 2008.

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

LEE, C.Y.; PANICKER, G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish

using multiple-PCR followed by CovaLinkk NH microwell plat sandwich hybridization. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 2, p. 199-209, 2003.

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**, v. 57, n. 10, p. 870-873, 1994.

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

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreak associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 921-928, 2002.

PRUZZO C, GALLO G, CANESI L. Persistence of *Vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 761-772, 2005.

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

RISTORI, C.A. **Bactérias patogênicas em ostras (*Crassostrea brasiliiana*) e água da região estuarina de Cananéia, litoral Sul, do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2000. 101p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

SMEWW. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 21 ed. 2005.

SOBRINHO, P.S.C. **Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus* associado ao consumo de ostras (*Crassostrea brasiliiana*) cruas cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2007. 134p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Universidade Federal da Bahia.

Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI