

Roberta Juliano Ramos

**VIBRIO sp. EM OSTRAS E ÁGUAS DE ÁREAS DE CULTIVO
DA BAÍA SUL DE SANTA CATARINA: OCORRÊNCIA,
CARACTERIZAÇÃO FENO E GENOTÍPICA,
SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DEPURAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Cleide Rosana
Werneck Vieira

Coorientador: Prof. Dr. Jaime Fernando
Ferreira

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Ramos, Roberta Juliano

Vibrio sp. em ostras e águas de áreas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina [tese] : ocorrência, caracterização feno e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração / Roberta Juliano Ramos ; orientadora, Cleide Rosana Werneck Vieira ; co-orientador, Jaime Fernando Ferreira. - Florianópolis, SC, 2012.

146 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Ostras. 3. Vibrios. 4. Depuração. I. Vieira, Cleide Rosana Werneck . II. Ferreira, Jaime Fernando. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

**VIBRIO sp. EM OSTRAS E ÁGUAS DE ÁREAS DE CULTIVO
DA BAÍA SUL DE SANTA CATARINA: OCORRÊNCIA,
CARACTERIZAÇÃO FENO E GENOTÍPICA,
SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DEPURAÇÃO.**

Por

Roberta Juliano Ramos

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 06 de julho de 2012.

Prof.^a, Dr.^a. Roseane Fett
Coordenador

Banca Examinadora:



Prof.^a, Dr.^a. Cleide Rosana Werneck Vieira
Orientadora(UFSC)



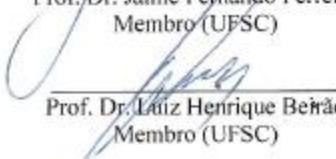
Prof.^a, Dr.^a. Dália dos Prazeres Rodrigues
Membro (FIOCRUZ/RJ)



Prof. Dr. Felipe Matarazzo Suplicy
Membro (FMP/SC)



Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira
Membro (UFSC)



Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão
Membro (UFSC)

Este trabalho é dedicado ao meu amor
Taylor, e às minhas filhas, Carolina e
Luiza

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira, pelas oportunidades, apoio, amizade, e confiança, que permitiram um crescimento profissional e pessoal nestes muitos anos de convívio.

À Associação de Maricultores do Sul da Ilha - AMASI, pela parceria e colaboração na etapa de monitoramento.

Aos maricultores da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, em especial ao Néelson Silveira Jr. e ao Fábio Brognoli, pela disponibilidade, pelas informações prestadas, e pela parceria na realização desta pesquisa.

À EPAGRI, pelo envio dos dados pluviométricos diários na região de Florianópolis.

A UFSC, pela oportunidade concedida para o aprimoramento da minha formação acadêmica.

A Capes e ao CNPq, pelas bolsas concedidas nos diferentes momentos do doutorado.

Ao CNPq e a FAPESC, pelo financiamento desta pesquisa.

Ao LMM, especialmente ao Prof. Jaime e ao Pancho, pela oportunidade de desenvolver parte desta pesquisa naquele laboratório, e por dividirem seus conhecimentos, na busca pelo desenvolvimento da maricultura em SC.

A Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, pela parceria na realização das análises de patogenicidade, em especial a Profa. Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues, pelas valiosas colaborações prestadas no decorrer desta pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, por serem parte fundamental na aquisição de conhecimentos indispensáveis para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Ogliari, pela orientação na parte estatística deste trabalho.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação, Sérgio de Sousa, pela prestatividade e amizade.

Aos demais funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, em especial ao Carlos e Bento, pela amizade e bons momentos vividos.

Ao meu braço direito, e ao meu braço esquerdo, as irmãs Letícia Miotto e Marília Miotto, pela parceria incondicional nas diferentes etapas deste projeto, assim como nos momentos de descontração, vocês foram fundamentais.

As minhas queridas amigas, pesquisadoras do NUMICAL, Andréia Cirolini, Helen da Silva, Cristiane Cattani e Fernanda Machado, pela amizade, pelo apoio, pela troca de experiências, pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis, e principalmente pelos ótimos momentos vividos.

Aos bolsistas do CNPq Luiz Fernando Bleyer de Faria e Andressa Baseggio, por toda colaboração, indispensável à realização desta pesquisa, e pelos bons momentos vividos no laboratório.

A todos os monitores que passaram pelo laboratório de microbiologia de alimentos, pelo apoio na realização das análises e pelos bons momentos de convívio.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação, em especial à Valéria, Tatiana, Sabrina, Eunice, Juciele e Andréia pelo apoio e por tornarem ainda mais prazerosa à convivência no Departamento.

Aos amigos Priscila, Sandro, Kica e Vanessa pelos bons momentos vívidos durante este período.

A todos os amigos de Floripa, pelos bons momentos vividos ao longo deste tempo, e aos amigos que mesmo distantes, se fizeram presentes em todos os momentos.

Ao meu Dindo Roberto e Cris, por toda força e incentivo que recebi no decorrer destes anos.

A minha mãe Celina, por ser meu porto seguro, pela amizade, pelo amor e pelo exemplo de vida.

Ao meu pai, Sérgio, e a minha amada avó, Lorena Luiza, onde quer que eles estejam, por terem sempre acreditado em mim.

Aos meus irmãos, Octavio, Sérgio Jr. e Vanessa, e a toda minha família pelo incentivo, amor, torcida, e pela compreensão dos longos períodos de ausência.

Ao Taylor, pelo amor, dedicação, parceria e incentivo que me deram suporte para chegar até aqui.

Às minhas filhas Carolina e Luiza, por existirem em minha vida, servindo de estímulo na busca do crescimento, tanto profissional como espiritual.

A Deus pela vida.

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo identificar e quantificar vibrios marinhos potencialmente patogênicos em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas provenientes da Baía Sul de Santa Catarina, Brasil. Assim como avaliar a patogenicidade e susceptibilidade destas cepas frente a diferentes antibióticos e verificar a eficácia da depuração de ostras (*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* usando luz ultravioleta (UV) isoladamente e efeito sinérgico com cloro. Das 60 amostras de ostras 48,3% estavam contaminadas por uma ou mais espécies de vibrio. As espécies mais frequentes foram *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. As contagens de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nas amostras variaram entre $< 0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} a $2,3 \log_{10}$ NMP g^{-1} de ostra, e $< 0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} a $2,1 \log_{10}$ NMP g^{-1} de ostra, respectivamente. Das 60 amostras de água 73,3% estavam contaminadas por uma ou mais espécies de vibrios. As contagens de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nas amostras variaram entre $< 0,3 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} a $1,7 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} de água marinha, e $< 0,3 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} a $2,0 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} de água marinha, respectivamente. Das 120 cepas enviadas para tipificação, foram avaliadas as características de 106 cepas reativadas. Destas 83 (78,3%) foram previamente identificadas como *V. parahaemolyticus*, 20 (18,9%) como *V. vulnificus*, três (2,8%) como *V. cholerae*. Foram caracterizados 20 diferentes sorotipos de *V. parahaemolyticus*, e identificados genes de patogenicidade tanto de *V. parahaemolyticus* quanto de *V. cholerae*. A resistência à gentamicina e cefuroxima foi observada em 84,3% das cepas testadas para ambos antibióticos, e a resistência a ampicilina foi observada em 80,0% das cepas de *Vibrio* spp. O cloranfenicol foi o antibiótico ao qual as cepas de *Vibrio* spp. foram mais sensíveis, seguido da tetraciclina, diferente do observado para *V. cholerae* que apresentou maior sensibilidade a Amoxicilina + clavulanato. Para o experimento de depuração as ostras foram contaminadas com um coquetel de cinco cepas de *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus* ao nível de 10^4 a 10^5 UFC mL^{-1} . A depuração foi realizada num sistema fechado de recirculação. As contagens de *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus* foram realizadas no tempo zero, 6, 18, 24 e 48 h. Três tratamentos foram realizados: T1

(controle), T2 (luz UV) e T3 (luz UV mais cloro). Após 48 h de depuração de *V. parahaemolyticus*, T3 reduziu 3,1 log NMP g⁻¹ e T2 reduziu 2,4 log NMP g⁻¹, enquanto T1 reduziu apenas 2,0 log NMP g⁻¹. Após 48 h de depuração de *V. vulnificus*, tanto T2, como T3 foram eficientes na redução das contagens, reduzindo a população em 2,5 e 2,4 log NMP g⁻¹, respectivamente, enquanto que T1 reduziu apenas 1,4 log NMP g⁻¹. O tratamento utilizando Luz UV mais cloro foi mais eficiente para controlar *V. parahaemolyticus* em ostras. Tanto o tratamento utilizando luz UV, como o tratamento utilizando luz UV mais cloro foram eficientes para reduzir as contagens de *V. vulnificus*. Os resultados desta pesquisa servem de subsídio para análise de risco de vibrios potencialmente patogênicos em ostras.

Palavras-chave: Ostras. *Crassostrea gigas*. *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio vulnificus*. Depuração. Antibiótico.

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the incidence and level of contamination for *Vibrio* spp. in seawater and oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in Southern Brazil, as to evaluate the pathogenicity of strains and test the susceptibility of these strains to different antibiotics, and to evaluate efficacy of depuration using UV light and UV light plus chlorinated seawater for decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in oysters. Of the 60 oysters' samples analyzed, 29 (48.3%) contained one or more vibrio species. The most frequently isolated species were *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. The counts of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the samples ranged between $< 0.5 \log_{10}$ MPN g^{-1} to $2.3 \log_{10}$ MPN g^{-1} of oyster, and $< 0.5 \log_{10}$ MPN g^{-1} to $2.1 \log_{10}$ MPN g^{-1} of oyster, respectively. Of the 60 seawater samples analyzed, 44 (73.3%) contained one or more species vibrios. The counts of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the samples ranged between $< 0.3 \log_{10}$ MPN 100 mL^{-1} to $1.7 \log_{10}$ MPN 100 mL^{-1} of seawater, and $< 0.3 \log_{10}$ MPN 100 mL^{-1} to $2.0 \log_{10}$ MPN 100 mL^{-1} of seawater, respectively. Of the 120 strains sent for typing were evaluated the characteristics of the strains 106 reactivated, 83 (78.3%) were previously identified as *V. parahaemolyticus*, 20 (18.9%) as *V. vulnificus*, three (2.8%) and *V. cholerae*. Were characterized 20 different serotypes of *V. parahaemolyticus*, and isolated genes of patogenicity for *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae*. The gentamycin and cefuroxime resistance was observed in 84.3% of the strains to both antibiotics, and the ampicillin resistance was observed in 80.0% of the strains of *Vibrio* spp. Chloramphenicol is the antibiotic to which the strains of *Vibrio* spp. were more susceptible. The tetracycline antibiotic was the second to which the strains of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were more susceptible than the observed for *V. cholerae* that showed greater susceptibility to amoxicillin + clavulanate. For depuration the oysters were contaminated with five-strain cocktail of *V. parahaemolyticus* or *V. vulnificus* to level of 10^4 to 10^5 CFU mL^{-1} . The depuration was conducted in a recirculated closed system. Counts of *V. parahaemolyticus* or *V. vulnificus* were determined at zero, 6, 18, 24 and 48 h. Three

treatments were conducted: T1 (control treatment); T2 (UV treatment); and T3 (UV plus chlorine treatment). After 48 h of depuration of *Vibrio parahaemolyticus*, T3 reduced 3.1 log MPN g⁻¹ and T2 reduced 2.4 log MPN g⁻¹, while T1 reduced only 2.0 log MPN g⁻¹. After 48 h of depuration of *Vibrio vulnificus*, T2 as well as T3 were efficient reducing counts in 2.5 and 2.4 log MPN g⁻¹, respectively; while T1 reduced only 1.4 log MPN g⁻¹. UV light plus chlorine treatment was more efficient for controlling *V. parahaemolyticus* in oysters. Both UV light and UV light plus chlorine were efficient for *V. vulnificus*. These results serve as input for risk analysis studies of potentially pathogenic vibrios in oysters in southern Brazil.

Keywords: Oysters. *Crassostrea gigas*. *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio vulnificus*. Depuration. Antibiotic.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - A Baía Sul da Ilha de Santa Catarina. | 28 |
| Figura 2 - Aspecto morfológico das valvas da ostra <i>Crassostrea gigas</i> : valva inferior com músculo adutor e brânquias, e valva superior sobreposta. | 30 |
| Figura 3 - Esquema de um sistema de depuração com recirculação de água marinha. | 43 |
| Figura 4 - Pontos de coleta nas seis diferentes regiões da Baía Sul Insular | 61 |
| Figura 5 - Acumulado pluviométrico mensal na região da Grande Florianópolis durante o período de estudo. | 72 |
| Figura 6 - Acumulado pluviométrico da semana anterior às coletas na região da Grande Florianópolis durante o período de estudo. | 72 |
| Figura 7 - Foto gel de agarose PCR multiplex <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 80 |
| Figura 8 - Região de onde as cepas de vibrios foram isoladas na Baía Sul de Santa Catarina, Brasil. | 99 |
| Figura 9 - Foto gel de agarose PCR multiplex <i>Vibrio cholerae</i> | 106 |
| Figura 10 - Esquema do sistema de depuração utilizado nos experimentos ... | 130 |
| Figura 11 - Bioacumulação e depuração de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> utilizando três diferentes tratamentos (T1: tratamento controle; T2: tratamento com luz UV; T3: tratamento com luz UV e cloro). | 134 |
| Figura 12 - Bioacumulação e depuração de <i>Vibrio vulnificus</i> utilizando três diferentes tratamentos (T1: tratamento controle; T2: tratamento com luz UV; T3: tratamento com luz UV e cloro). | 134 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta | 62 |
| Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras de águas salinas analisadas nas seis diferentes regiões geográficas da Baía Sul..... | 71 |
| Tabela 3 - Prevalência de <i>Vibrio</i> sp. em amostras de ostras e águas marinhas provenientes de seis áreas de cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009..... | 74 |
| Tabela 4 - Número de isolados de diferentes espécies de vibrios isoladas de ostras provenientes das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009. | 74 |
| Tabela 5 - Média de contaminação de ostras provenientes de diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009..... | 75 |
| Tabela 6 - Média de contaminação de águas marinhas provenientes de diferentes regiões de cultivo de moluscos bivalves da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009. | 78 |
| Tabela 7 - Fator de patogenicidade, gene, sequências de nucleotídeos e tamanho dos produtos da PCR utilizados na análise de patogenicidade. | 100 |
| Tabela 8 - Resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos de 120 diferentes cepas de <i>Vibrio</i> spp. pelo método de difusão em disco. | 109 |
| Tabela 9 - Taxa de retenção de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em ostras submetidas a diferentes tratamentos de depuração por 48h. | 136 |
| Tabela 10 - Taxa de retenção de <i>Vibrio vulnificus</i> em ostras submetidas a diferentes tratamentos de depuração por 48h | 137 |
| Tabela 11 - Parâmetros físico-químicos da água de recirculação nos tratamentos de depuração de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i> em ostras | 139 |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 21 |
| CAPÍTULO I..... | 23 |
| 1.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 25 |
| 1.1. MALACOCULTURA NO BRASIL E NO ESTADO DE SANTA CATARINA..... | 25 |
| 1.2. A BAIJA SUL DA ILHA DE SANTA CATARINA..... | 27 |
| 1.3. CARACTERIZAÇÃO DA OSTRAS <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> | 29 |
| 1.4. ASPECTOS GERAIS DA MICROBIOLOGIA DE MOLUSCOS BIVALVES..... | 31 |
| 1.5.VIBRIOS MARINHOS PATOGÊNICOS: IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS DE ORIGEM MARINHA..... | 34 |
| 1.6. CONSUMO DE MOLUSCOS BIVALVES: VIBRIOS X SAÚDE PÚBLICA..... | 38 |
| 1.7.PREVENÇÃO E CONTROLE DE VIBRIOS EM ALIMENTOS..... | 40 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 44 |
| CAPÍTULO II..... | 53 |
| RESUMO..... | 55 |
| ABSTRACT..... | 57 |
| 1.INTRODUÇÃO..... | 59 |
| 2.MATERIAL E MÉTODOS..... | 61 |
| 2.1. ÁREA DE ESTUDO..... | 61 |
| 2.2.COLETA DE AMOSTRAS..... | 62 |
| 2.2.1.Ostras..... | 62 |
| 2.2.2. Águas marinhas provenientes de regiões de cultivo de ostras..... | 63 |
| 2.3.PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS ÁGUAS MARINHAS..... | 63 |
| 2.4. PREPARO E DILUIÇÕES DAS AMOSTRAS DE OSTRAS..... | 64 |
| 2.5. DETERMINAÇÃO DO PH DA CARNE DAS OSTRAS..... | 64 |
| 2.6. ACUMULADO PLUVIOMÉTRICO..... | 64 |
| 2.7. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS..... | 65 |
| 2.7.1.Ostras..... | 65 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.7.2. Águas marinhas provenientes de cultivos de ostras..... | 66 |
| 2.8. DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS CEPAS DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS..... | 67 |
| 2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS..... | 68 |
| 3. Resultados E DISCUSSÃO..... | 68 |
| 3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS..... | 68 |
| 3.2. ACUMULADO PLUVIOMÉTRICO..... | 70 |
| 3.3. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS..... | 73 |
| 3.3.1. Ostras..... | 73 |
| 3.3.2. Águas marinhas..... | 77 |
| 3.3.3. Determinação de patogenicidade..... | 80 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 82 |
| CAPÍTULO III..... | 94 |
| RESUMO..... | 93 |
| ABSTRACT..... | 96 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 97 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 98 |
| 2.1. CEPAS DE VIBRIOS..... | 98 |
| 2.2. TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA..... | 99 |
| 2.3. PATOGENICIDADE..... | 100 |
| 2.3.1. Ensaio genotípicos..... | 100 |
| 2.3.2. Ensaio fenotípicos..... | 102 |
| 2.4. SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS..... | 102 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 103 |
| 3.1. IDENTIFICAÇÃO E TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA DAS CEPAS..... | 103 |
| 3.2. PATOGENICIDADE..... | 105 |
| 3.2.1. Ensaio genotípicos..... | 105 |
| 3.2.2. Ensaio fenotípicos..... | 107 |
| 3.3. SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS..... | 108 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 113 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 114 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CAPÍTULO IV..... | 124 |
| RESUMO..... | 123 |
| ABSTRACT..... | 125 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 127 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 128 |
| 2.1. PREPARAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS..... | 128 |
| 2.2. PREPARAÇÃO DAS OSTRAS..... | 129 |
| 2.3. CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS OSTRAS..... | 129 |
| 2.4. DEPURAÇÃO DAS OSTRAS..... | 130 |
| 2.5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS..... | 131 |
| 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 132 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 133 |
| 3.1. OCORRÊNCIA DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> E <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> EM OSTRAS NATURALMENTE CONTAMINDAS..... | 133 |
| 3.2. BIOACUMULAÇÃO DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> E <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> EM OSTRAS..... | 133 |
| 3.3. MUDANÇAS NAS POPULAÇÕES DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> E <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> EM OSTRAS NÃO CONTAMINADAS..... | 135 |
| 3.4. MUDANÇAS NAS POPULAÇÕES DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> NAS OSTRAS DURANTE A DEPURAÇÃO..... | 135 |
| 3.5. MUDANÇAS NAS POPULAÇÕES DE <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> NAS OSTRAS DURANTE A DEPURAÇÃO..... | 137 |
| 3.6. EFICÁCIA DO TRATAMENTO UTILIZANDO LUZ UV E LUZ UV MAIS CLORO NA INATIVAÇÃO DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> E <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> NA ÁGUA DE RECIRCULAÇÃO..... | 138 |
| 3.7. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE RECIRCULAÇÃO..... | 138 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 139 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 140 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 145 |

1. INTRODUÇÃO

Diante da importância da maricultura para a economia do estado de Santa Catarina, como atividade geradora de emprego e renda e, diante da necessidade de garantir a qualidade microbiológica dos moluscos bivalves cultivados, e conseqüentemente a segurança alimentar dos consumidores destes moluscos, principalmente de ostras cruas ou mal cozidas, nesta tese foi pesquisada a presença de vibrios marinhos potencialmente patogênicos em ostras *Crassostrea gigas* cultivadas na Baía Sul de Santa Catarina, no Sul do Brasil, local onde é cultivada a maior parte da produção nacional de ostras.

Após o isolamento e identificação, foi realizada a caracterização fenotípica e genotípica das cepas isoladas, que também foram avaliadas quanto à suscetibilidade frente a diferentes antimicrobianos recomendados para infecções causadas por vibrio. Na última etapa da pesquisa foi desenvolvido e testado um sistema de depuração de ostras contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

A tese foi dividida em quatro capítulos: o primeiro, uma revisão bibliográfica a respeito de todos os assuntos abordados neste trabalho, tais como: a malacocultura no Brasil e no estado de Santa Catarina; caracterização da ostra *Crassostrea gigas*; Aspectos da microbiologia de moluscos bivalves; Vibrios marinhos patogênicos: importância em produtos de origem marinha; Segurança alimentar de moluscos bivalves: vibrios x saúde pública; Controle e prevenção de vibrios: processo de depuração.

O segundo capítulo, intitulado “Ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos em águas marinhas e ostras (*Crassostrea gigas*) da Baía Sul de Santa Catarina, Brasil”; teve como objetivo identificar e quantificar vibrios marinhos potencialmente patogênicos em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas marinhas provenientes de diferentes regiões de cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil, e correlacionar a incidência destes microrganismos com os parâmetros físico-químicos das águas marinhas destas regiões. Foram coletadas 60 amostras de ostras e 60 amostras de águas salinas em seis regiões de cultivo do lado insular da Baía Sul.

O terceiro capítulo intitulado “Patogenicidade e resistência a antibióticos de cepas de vibrios marinhos isolados de ostras e águas salinas da Baía Sul de Santa Catarina” teve como objetivo avaliar a patogenicidade de cepas de vibrios marinhos potencialmente patogênicos isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) e águas marinhas provenientes de regiões de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina,

e testar a susceptibilidade destas cepas frente a dez diferentes antimicrobianos recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para tratamento de infecções causadas por vibrios.

E o quarto e último capítulo intitulado “Depuração de ostras (*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* com luz UV e água marinha clorada” teve como objetivo avaliar a eficácia da depuração de ostras (*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* usando luz ultravioleta (UV) isoladamente e efeito sinérgico com cloro.

Os resultados descritos nesta tese podem servir de referência para a pesquisa de análise de risco de vibrios potencialmente patogênicos em ostras.

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. MALACOCULTURA NO BRASIL E NO ESTADO DE SANTA CATARINA

A aquicultura, que envolve o cultivo de moluscos, algas, camarões, crustáceos e peixes, é uma atividade que tem adquirido importância em diversos países de vasto litoral como fornecedora de proteína animal. Isso se dá em decorrência da necessidade de garantir o acesso a estes alimentos, que até poucos anos atrás só chegavam à mesa do consumidor através de atividade extrativista. Colaboram com este crescimento os menores custos de produção e a rentabilidade satisfatória. Na América Latina, a aquicultura tem avançado, sendo que os principais países produtores são Brasil, México, Equador e Chile, os quais têm liderado este desenvolvimento, produzindo quantidades crescentes de salmão, truta, tilápia, camarão e moluscos (SOUZA-FILHO, 2003; FAO, 2010).

Segundo a Food and Agriculture Organization (2008), a ostra do pacífico (*Crassostrea gigas*) é a principal espécie produzida em sistemas aquícolas ao redor do mundo devido ao seu potencial de crescimento rápido e a sua ampla tolerância a diferentes condições ambientais, tendo atingido uma produção mundial de 4,6 milhões de toneladas em 2006, superior a produção de qualquer outra espécie de pescado, molusco ou crustáceo. A ostra do pacífico foi introduzida em diferentes habitats tanto para reposição de estoques de ostras nativas dizimadas pela pesca excessiva ou por doenças, quanto para criar uma indústria que não existia antes.

O estado de Santa Catarina abriga atualmente o maior pólo de maricultura do país. A região produtora do estado é compreendida por 12 municípios, inseridos na faixa costeira que se estende de São Francisco do Sul, no norte do estado, a Palhoça, na região centro-leste, com um contingente de 643 maricultores, representados por 28 associações municipais, uma estadual, duas cooperativas e duas federações. A cadeia produtiva do cultivo de moluscos em Santa Catarina envolve direta e indiretamente cerca de 8.000 pessoas, desde a produção, colheita e beneficiamento, até a comercialização (OLIVEIRA NETO, 2007; SANTOS et al., 2011).

A mudança da atitude extrativista tradicional para o cultivo de mexilhões e ostras em fazendas marinhas tem tornado rentável essa atividade atraindo produtores pelo aumento da renda familiar proporcionada pelo baixo investimento e curto prazo para o retorno da

produção. No entanto, cada vez mais se faz necessário o monitoramento das áreas ocupadas pelos cultivos, bem como a análise dos seus reflexos no entorno da área de produção (MACHADO, 2002).

A produção total de moluscos comercializados em Santa Catarina (mexilhões, ostras e vieiras) no ano de 2010 foi de 15.635 toneladas, representando um aumento de 25,5% em relação a 2009, e a maior produção aquícola já registrada pelo estado. O total produzido foi de 5,2 toneladas de vieiras, 1.908 toneladas de ostras e 13.722 toneladas de mexilhões. O volume da produção de moluscos, em 2010, proporcionou uma movimentação financeira bruta estimada em R\$ 37.883.770,72 para o estado (SANTOS et al., 2011).

A comercialização de mexilhões (*Perna perna*) apresentou um aumento de 28,69% em relação a safra de 2009, impulsionada pela crescente demanda nacional do produto, além da maior disponibilidade de sementes em coletores artificiais, assentamento remoto e extração de bancos naturais, entre outros fatores. Já a comercialização de ostras apresentou um aumento de 6,49% em relação à safra anterior, mas ainda 39,5% abaixo da comercialização recorde observada em 2006, que foi de 3,152 toneladas (SANTOS et al., 2011).

Os primeiros exemplares de ostras (*Crassostrea gigas*) que chegaram ao Brasil foram importados pelo Instituto de Pesquisas da Marinha de Cabo Frio, no Rio de Janeiro e eram oriundos da Grã-Bretanha. Em 1987, os primeiros exemplares foram trazidos de Cabo Frio para Santa Catarina e com eles iniciou-se um cultivo experimental (POLI, 2004).

Na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, os resultados se mostraram promissores desde o início, motivando o interesse dos pescadores da localidade de Santo Antônio de Lisboa – Florianópolis. Formou-se aí o primeiro condomínio de Pesca e Aqüicultura do Brasil, chamado Condomínio de Pesca e Aqüicultura Baía Norte, formado por um grupo de pescadores pioneiros (POLI, 2004).

Em 2006 eram 166 ostreicultores, número que vem reduzindo a cada ano, atingindo 121 ostreicultores em 2010. Dentre os fatores que contribuíram para este comportamento estão a migração dos produtores para o cultivo de mexilhões, o curto tempo de conservação do produto *in natura*, em torno de quatro dias, o que muitas vezes inviabiliza a comercialização, e o excesso de produção frente ao limitado mercado brasileiro para o comércio de ostra viva. A produção de vieiras apresentou uma redução de 3,7% em relação à safra de 2009, com redução de 40% do número de produtores, passando de 10 para seis produtores. O fator limitante para consolidação desta atividade

produtiva é a indisponibilidade de áreas aquícolas com condições ambientais adequadas ao cultivo da espécie (SANTOS et al., 2011).

A liderança ocupada por Santa Catarina na produção de ostras e mexilhões é justificada por diferentes fatores: existência de condições oceanográficas favoráveis aos cultivos, tais como: existência de inúmeras áreas protegidas formadas por baías, enseadas, estuários, sacos e angras, e íntima afinidade entre os produtores, na grande maioria advindos da pesca artesanal (COELHO et al., 2003).

Um agente que tem desempenhado um papel crucial é o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que fica localizado na Barra da Lagoa, em Florianópolis, e identificou o potencial das águas marinhas de Florianópolis para o cultivo da ostra japonesa e, posteriormente, iniciou e expandiu a produção em laboratório destas ostras, tornando-se o principal produtor de sementes do país (SOUZA FILHO, 2003). Hoje o LMM/UFSC é o principal laboratório no Brasil a produzir regularmente sementes de ostras do Pacífico, constituindo-se, portanto, no principal pilar de sustentação da atividade (FERREIRA et al., 2006).

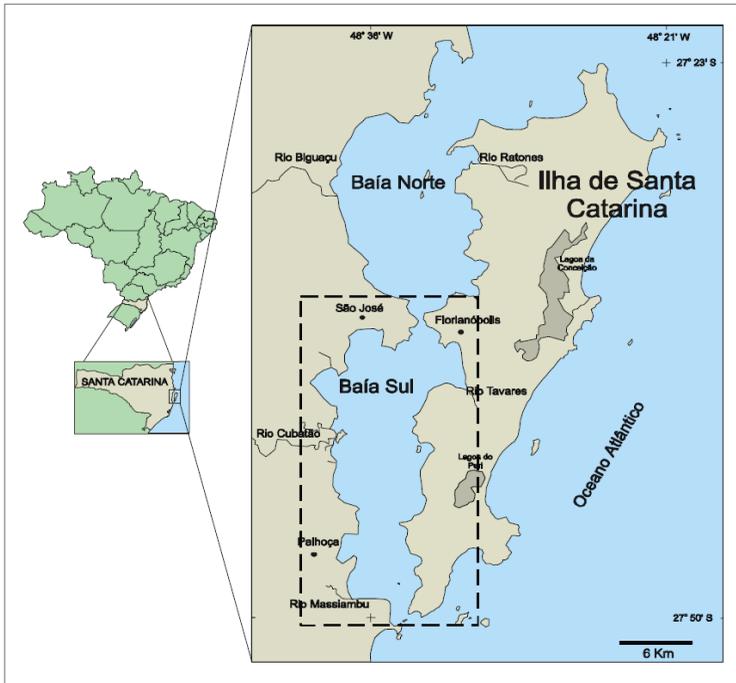
Atualmente o estado de Santa Catarina é responsável pela produção de, aproximadamente, 85% do total de ostras produzidas no Brasil, sendo o município de Florianópolis o maior produtor de ostras do Brasil com 1477 toneladas, representando 77,4% da produção estadual. As Baías Norte e Sul de Santa Catarina, juntas são responsáveis por 95,7% da produção de ostras do estado. E a comunidade do Ribeirão da Ilha, localizada na Baía Sul de Florianópolis responde por cerca de 75,0% do total produzido em Florianópolis. Os municípios de Florianópolis e Palhoça apresentaram os maiores volumes de produção de ostras, em relação aos demais. Juntos eles produziram 86,8% da produção estadual (SANTOS et al., 2011).

1.2. A BAIA SUL DA ILHA DE SANTA CATARINA

O estado de Santa Catarina possui cerca de 560 km de linha de costa. Sua zona costeira é constituída por 13 municípios, distribuídos em sete bacias hidrográficas. A Ilha de Santa Catarina situa-se entre as latitudes 27° 22'S e 27° 50'S. Possui uma área de aproximadamente 410 Km², onde se localiza a maior parte da cidade de Florianópolis, capital do Estado. A ilha separa-se do continente por um estreito canal de 21 m de profundidade máxima, e de cerca de 550m de largura, cujos prolongamentos dão forma a duas baías denominadas Baía Norte e Sul (CECA/FNMA 1996).

A Baía Sul da Ilha de Santa Catarina (Figura 1) constitui uma importante feição costeira no litoral do estado de Santa Catarina e os municípios circunvizinhos a Florianópolis, São José e Palhoça estão entre os mais populosos do Estado. Possui cerca de 25 Km de comprimento médio (máxima de 27 Km) e 6,8 Km de largura média (máxima de 10,8Km e mínima de 3Km). Com uma área total de aproximadamente 125 Km², engloba no seu entorno cerca de 100 Km de linha de costa. Sua comunicação com mar aberto é feita pelo canal sul que possui cerca de 830m de largura e 30m de profundidade. A partir deste canal a baía se alarga, apresentando contornos irregulares, caracterizando a presença de várias enseadas. O interior da baía apresenta um fundo relativamente plano ocorrendo os maiores valores de profundidade na parte central deste sistema com 5 m em média (SILVA, 2002).

Figura 1 - A Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.



Na área da Baía Sul encontra-se manguezais, uma reserva extrativista marinha, enseadas e um grande número de ilhas e praias. É utilizada em atividades de lazer, turismo, pesca artesanal, cultivo e comercialização de moluscos, ou seja, como fonte de alimento e de geração de renda para uma parcela significativa da população local (MOLLERI; BONETTI, 2005).

1.3. CARACTERIZAÇÃO DA OSTRA *CRASSOSTREA GIGAS*

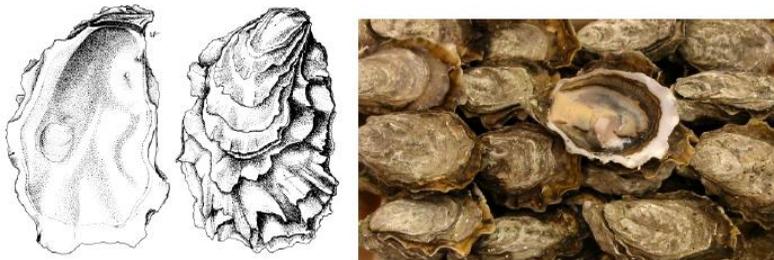
A espécie *Crassostrea gigas* conhecida como Ostra do Pacífico ou Japonesa pertence ao Filo MOLLUSCA, Classe PELECYPODA ou BIVALVIA, Família OSTREIDAE, Gênero *Crassostrea* (BARNES, 1990). São moluscos que se alimentam através da filtração branquial de partículas de matéria orgânica e inorgânica, incluindo fitoplâncton (FAO, 2004). A composição da dieta e, especificamente, a proporção destes componentes, depende muito das condições ambientais e da localização (áreas estuárias, águas oceânicas). A absorção de matéria orgânica dissolvida, assim como de bactérias, também contribui na dieta das ostras (MIOSSEC et al., 2009).

Os cílios branquiais produzem uma corrente de água até o interior do animal, enviando as partículas em suspensão até os filamentos branquiais, onde são retidas e levadas por batimentos ciliares até os palpos labiais, onde ocorre uma seleção, tanto química quanto por tamanho (FURLAN, 2004; RUPP, 1999). As partículas filtradas são menores que 50 μm e, principalmente, em torno de 1 a 10 μm (MIOSSEC et al., 2009).

Os moluscos bivalves não possuem esqueleto interno e têm o corpo contido em uma concha formada por duas partes iguais, as valvas, as quais são unidas medianamente por uma estrutura conhecida como ligamento e contém delicadas linhas de crescimento. O músculo adutor une as duas valvas sendo o responsável pelo fechamento das mesmas. Este músculo atua contra a pressão do ligamento e quando está relaxado, as valvas encontram-se abertas (RUPP, 1999).

A concha é muito variável e depende do ambiente onde as ostras crescem, sendo usualmente alongada (Figura 2). A valva inferior ou esquerda é côncava e, encaixada sob a articulação, sendo esta a valva pela qual a ostra encontra-se fixada ao substrato, enquanto a valva superior ou direita é plana (RUPP, 1999).

Figura 2 - Aspecto morfológico das valvas da ostra *Crassostrea gigas*: valva inferior com músculo adutor e valva superior sobreposta (MIOSSEC et al., 2009).



A ostra *Crassostrea gigas* ocorre naturalmente no litoral do Japão, China e Coréia (IMAI, 1982) sendo que, em nossas águas, é considerada uma espécie exótica. São animais hermafroditos sequenciais, isto é, em um mesmo indivíduo, inicialmente, maturam as células de um sexo e, após a desova, podem maturar as de outro. Após cada período de desova, pode ocorrer a troca de sexo. As espécies do gênero *Crassostrea* são classificadas como ovíparas ou não incubatórias, ou seja, os gametas são liberados diretamente para o ambiente externo, onde ocorre a fertilização (POLI, 2004; RUPP, 1999).

De acordo com Poli (2004), as ostras *Crassostrea gigas* têm limite de tolerância de salinidade e temperatura. A faixa de melhor desempenho é de salinidade de 18-32 ppm, podendo seu cultivo ser realizado em salinidade inferior ou superior, porém seu crescimento é mais lento.

Os limites de salinidade e temperatura variam muito, dependendo da variedade e localização geográfica que se encontram. Em alguns locais a salinidade pode variar entre 2-25 ppm entre o verão e inverno. Ostras jovens e adultas podem sobreviver durante semanas em ambientes com baixa salinidade, fechando suas valvas, assim como pode tolerar salinidades elevadas de até 45-50 ppm, como ocorre em cultivos na França, sendo que a mortalidade é observada em salinidades acima de 50 ppm (MIOSSEC et al., 2009). Além disto, a combinação dos fatores salinidade-temperatura parece ser mais importante para esta espécie, do que cada um destes fatores isoladamente, da mesma forma a condição fisiológica e estágio de vida também são determinantes para tolerância destes fatores. A concha das ostras oferece proteção contra

estresses temporários, como a presença de poluentes e variações de temperatura e salinidade (POWELL et al., 2000).

O fenômeno conhecido como mortalidade em massa de verão (MMV) tem sido descrito em diferentes locais do mundo e parece estar relacionado com a elevada temperatura da água do mar associado à atividade reprodutiva das ostras. Embora não seja totalmente compreendido, este fenômeno está relacionado com interações altamente complexas de diferentes fatores: condições ambientais, estado de saúde dos moluscos e presença de patógenos oportunistas (MIOSSEC et al., 2009). O risco de um evento de mortalidade aumenta quando ocorrem, simultaneamente, condições especiais: (i) um inverno ameno e chuvoso, (ii) temperatura mínima da água do mar de 18 °C, (iii) um elevado nível de disponibilidade de alimentos durante a primavera anterior, (iv) um intenso esforço reprodutivo, e (v) a susceptibilidade genética da população de ostras. Um estresse adicional (químico, térmico ou associado a práticas de cultivo) é necessário para dar início ao evento de mortalidade, que por sua vez está associado com patógenos, como vibrios ou vírus (SAMAIN et al., 2007).

Os sistemas de cultivo utilizados para a engorda de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) são os de fundo, fixos e os suspensos. O sistema suspenso pode ter duas formas de estrutura: espinhel, mais comumente chamado de “long-line” e balsa. Estes são adaptados conforme as condições do local escolhido: profundidade, correntes, ondas e ventos. Já a contenção das ostras em cultivo, nestas estruturas, é feita utilizando-se caixas plásticas, armações de madeira envoltas em telas ou redes, travessieiros de rede, ou da maneira convencional, com “lanternas”. O cultivo de fundo não é realizado no Brasil, apenas em países europeus e da América do Norte, enquanto o cultivo suspenso é o sistema mais empregado no mundo, pois permite cultivar grande quantidade de ostras, utilizando pouca área, explorando o volume d’água, ao usar a profundidade do local (POLI, 2004; SILVA, 1999).

1.4. ASPECTOS GERAIS DA MICROBIOLOGIA DE MOLUSCOS BIVALVES

Segundo Feldhusen, (2000), existem três grupos de bactérias patogênicas, associadas a doenças causadas devido ao consumo de moluscos bivalves e outros produtos marinhos, divididos conforme a fonte de contaminação. O grupo das bactérias naturalmente presentes no ecossistema aquático (como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*

e *Listeria monocytogenes*), o grupo das bactérias presentes nesse ambiente como resultado da contaminação por fezes animais (como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Escherichia coli*) e o grupo de bactérias que chegam nestes produtos durante a manipulação e o processamento dos mesmos (como *Staphylococcus aureus*).

A microbiota de moluscos bivalves varia consideravelmente, dependendo da qualidade da água na qual é capturado e/ou cultivado, da qualidade da água que se utiliza para sua lavagem, e de outros fatores (JAY, 2005).

Vibrios são, caracteristicamente, originários de habitats marinhos, salobres e estuários, aparecem em grandes concentrações em temperaturas de 20-25 °C. Em temperaturas baixas, os vibrios permanecem nos sedimentos do fundo do mar em concentração insuficiente para causar infecções. Sua concentração aumenta nos meses quentes, devido às condições ecológicas favoráveis ao plâncton, aumentando seu acúmulo por moluscos filtradores (GUTIÉRREZ; MARTOS, 1997). As espécies patogênicas são principalmente mesófilas, isto é, ocorrem, em geral, em águas tropicais e em número mais elevado em águas temperadas nos finais do verão ou princípios do outono (HUSS, 1997).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* (como *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli*) ocorrem em alimentos de origem marinha como resultado de contaminação causada pela atividade do homem ou dos animais. Esta contaminação tem sido normalmente associada à contaminação fecal ou à poluição das águas naturais ou de ambientes aquáticos, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período, ou à contaminação direta dos produtos durante o processamento (HUSS, 1997).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como os coliformes a 45 °C e a *Escherichia coli* têm sido utilizadas como indicadores da qualidade sanitária das águas onde os moluscos são cultivados e dos próprios moluscos bivalves (BARARDI et al., 2006). Entretanto, os níveis de *Escherichia coli* ou coliformes a 45 °C somente significam que há risco de outros patógenos intestinais estarem presentes, portanto baixos níveis destes indicadores não garantem a ausência de patógenos (LEE; YOUNGER, 2002).

Uma relação direta de causa e efeito entre a presença de bactérias indicadoras e, diversos agentes patogênicos na água e nos moluscos bivalves, tem sido questionada. A concentração de microrganismos nos moluscos filtradores varia enormemente de um

animal para outro e depende também das condições meteorológicas, da temperatura, da matéria total particulada (turbidez) e da fisiologia alimentar do molusco (HUSS, 1997).

Ensaio microbiológicos para detecção e enumeração de coliformes são amplamente utilizados para verificar a sanidade de moluscos e crustáceos, mas nem sempre eles são considerados bons indicadores de qualidade sanitária. O Programa Nacional de Sanificação de Moluscos e Crustáceos dos Estados Unidos teve início em 1925 e a presença de coliformes foi utilizada como indicador, para avaliar a sanidade de água onde estes animais eram cultivados. Geralmente moluscos e crustáceos cultivados em águas que apresentam adequação aos critérios de coliformes têm um bom histórico de qualidade sanitária, contudo alguns patógenos humanos ainda podem estar presentes nesses animais. Em ostras não existe correlação entre coliformes fecais e *Vibrio cholerae*, ou entre *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus* ou *Yersinia enterocolitica* (JAY, 2005).

O Ministério da Saúde através da Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que aprova o regulamento técnico e princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, estabelece para moluscos bivalves *in natura* limites máximos permitidos de Estafilococos coagulase positivo de até $1,0 \times 10^3$ UFC g⁻¹ e ausência de *Salmonella* sp. em 25g. O limite para coliformes a 45 °C somente é estabelecido para moluscos bivalves, temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados, sendo este de $5,0 \times 10$ NMP g⁻¹, não existindo nesta legislação, limites estabelecidos para *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos bivalves *in natura*. Há apenas limites de *Vibrio parahaemolyticus* em pratos prontos à base de frutos do mar crus, que é $1,0 \times 10^3$ NMP g⁻¹.

Recentemente, em maio de 2012, foi publicada a Instrução normativa nº 7, do Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012), a qual estabelece o limite de número mais provável (NMP) para *Escherichia coli* em 100 gramas da parte comestível dos moluscos bivalves como um dos critérios para retirada liberada de moluscos bivalves das áreas de cultivo, sendo este limite < 230 NMP 100 g⁻¹.

Embora não sejam estabelecidos parâmetros de contagens para nenhuma espécie de vibrio em moluscos bivalves *in natura*, os padrões microbiológicos existentes para outros microrganismos consideram que estes moluscos *in natura* não sejam consumidos crus, o que deve ser reavaliado pelas autoridades da Vigilância Sanitária, visto que embora seja microbiologicamente mais seguro não consumi-los crus, este é o

principal modo de consumo em várias regiões, e deve ser considerado para que os limites microbiológicos estabelecidos estejam adequados às características do alimento que chega à mesa do consumidor (RAMOS, 2007).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão que estabelece a classificação e normatiza os parâmetros de qualidade da água, segundo seu uso preponderante, determina que em águas salobras (salinidade de 0,5 a 30 ppm) ou salinas (salinidade igual ou superior a 30 ppm) para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica da densidade de coliformes a 45 °C, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes a 45 °C por 100 mililitros. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de cinco amostras. A *Escherichia coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro de coliformes a 45 °C de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005).

1.5. VIBRIOS MARINHOS PATOGÊNICOS: IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS DE ORIGEM MARINHA

O gênero *Vibrio* inclui mais de 30 espécies, e pelo menos 12 são patogênicas para o homem, e/ou têm sido associadas a doenças transmitidas por alimentos, entre estas espécies, *Vibrio cholerae*, sorogrupos O1 e O139, são os mais importantes, uma vez que são associados com surtos de epidemias e pandemias de diarreia em várias partes do mundo (DALMASSO et al., 2009; PRUZZO et al., 2005). No entanto, outras espécies de vibrios são capazes de causar doenças diarreicas em humanos, e têm recebido maior atenção na última década, estes incluem *Vibrio parahaemolyticus*, a principal causa de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Japão e na Coreia (LEE et al., 2001), *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio metschnikovii* e *Vibrio mimicus* (ALTEKRUSE et al., 2000; HØI et al., 1997).

Membros do gênero *Vibrio* são bacilos Gram negativos, curvos ou retos, não formadores de esporos, mesófilos, que medem entre 0,5 – 1,0 µm de largura e entre 1,4 – 3,0 µm de comprimento (MCLAUGHLIN, 1995; THOMPSON; SWINGS, 2006). Quando inoculados em meios de cultura em laboratório, frequentemente

apresentam características morfológicas de bacilos retos (ATLAS, 1997). São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, móveis, devido à presença de um único flagelo polar. A maioria das espécies produz as enzimas oxidase e catalase, e fermentam a glicose sem produzir gás.

Duas espécies em particular são importantes patógenos humanos transmitidos pelo consumo de produtos de origem marinha, como moluscos bivalves. *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* ocorrem naturalmente em ambientes marinhos ou estuários (DRAKE et al., 2007; LISTON, 1990; OLIVER, 2005; STROM; PARANJPYE, 2000; YEUNG e BOOR, 2004).

O consumo destes produtos crus ou mal cozidos, especialmente de moluscos bivalves, contaminados com *Vibrio parahaemolyticus*, pode levar ao desenvolvimento de uma gastroenterite aguda, caracterizada por diarreia, dor de cabeça, vômitos, náuseas, dor abdominal e febre baixa, sendo reconhecida como a principal causa de gastroenterite associada ao consumo de produtos de origem marinha nos Estados Unidos e em outras partes do mundo (KAYSNER; DE PAOLA, 2001; SU; LIU, 2007).

A distribuição de *Vibrio parahaemolyticus* nas águas está associada à temperatura da mesma, sendo raramente detectado em temperaturas inferiores a 15 °C, e nos meses quentes, quando a temperatura das águas está em torno de 25 °C tem sua incidência aumentada em produtos de origem marinha, da mesma forma que o número de surtos de gastroenterites por *Vibrio parahaemolyticus* (SU; LIU, 2007).

A maioria das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas do ambiente e de produtos de origem marinha não é patogênica (SU; LIU, 2007; USFDA, 2005), sendo que no hemisfério norte as cepas clínicas de *Vibrio parahaemolyticus* são diferenciadas das cepas ambientais por sua capacidade de produzir a enzima hemolisina TDH (thermostable direct hemolysin), que fenotipicamente produz hemólise de hemáceas em ágar sangue Wagatsuma, sendo este o principal fator de virulência do *Vibrio parahaemolyticus*, conhecido como fenômeno de Kanagawa. Além deste, sua presença está relacionada à produção de enzima hemolisina TRH (thermostable related hemolysin), a qual também tem sido observada em isolados clínicos, sendo, portanto, outro fator de virulência. Uma proteína termolábel, produzida por uma cepa que não apresentava nem a hemolisina TDH nem a hemolisina TRH, também foi identificada como um potencial fator de virulência (LEE et al., 2002).

A hidrólise da ureia também tem sido proposta como um marcador de virulência adicional para algumas cepas de *Vibrio*

parahaemolyticus patogênicas, com uma forte correlação entre presença do gene *trh* e produção de urease (YEUNG; BOOR, 2004).

Vibrio vulnificus representa um risco significativo para saúde pública, principalmente para pessoas com baixa imunidade, tanto considerando o grupo de pessoas que consomem alimentos de origem marinha, crus ou mal cozidos, ou aquelas que adquirem infecções de pele quando realizam atividades aquáticas em águas estuárias ou costeiras. Pode causar três diferentes tipos de infecções humanas, sendo a gastroenterite e a septicemia primária geralmente causadas pelo consumo de moluscos crus ou mal cozidos, enquanto as infecções de pele são causadas pelo contato direto com moluscos bivalves e águas marinhas onde o microrganismo está presente (STROM; PARANJPYE, 2000; OLIVER, 2005).

A gastroenterite é a forma menos significativa, enquanto a septicemia primária, a forma mais grave, devido à elevada taxa de mortalidade, cerca de 60%. Mais de 90% dos casos de septicemia ocorrem devido ao consumo de ostras cruas ou mal cozidas por pessoas imunodeprimidas, com doenças crônicas ou idosas. Os principais sintomas são febre, náusea e hipotensão, com posterior desenvolvimento de lesões secundárias. A bactéria é isolada do sangue dos pacientes em mais de 90% dos casos (HØI et al, 1997; OLIVER, 2005).

Estes microrganismos são frequentemente isolados de águas com temperaturas entre 8 e 31°C, e salinidades baixas a moderadas, entre 1 e 34 ppm. *Vibrio vulnificus* é observado em maiores concentrações em águas com temperaturas acima de 20°C e salinidades entre 15 e 25 ppm (HØI et al, 1997; KASPAR; TAMPLIN, 1993; STROM; PARANJPYE, 2000).

As cepas de *Vibrio vulnificus* são classificadas por biotipagem, uma técnica baseada na combinação de diferentes características fenotípicas, sorológicas e de alterações causadas no hospedeiro. O biotipo 1 pode ser encontrado em águas marinhas, e é associado a colonização de moluscos bivalves e infecção humana, apresentam diferentes tipos de lipopolissacarídeos (LPS) distintos imunologicamente. As cepas de *Vibrio vulnificus* do biotipo 2 têm sido relacionadas a infecções em animais marinhos vertebrados, particularmente no cultivo de larvas, podendo também causar infecções oportunistas em humanos. Em 1999 o biotipo 3 foi descrito pela primeira vez e foi associado a um surto envolvendo 62 pacientes israelenses com infecção de pele ou septicemia, eles foram contaminados através de lesões na pele causadas por tilápias, não tendo

este biotipo relação com a ingestão de alimentos (HØI et al., 1997; OLIVER, 2005; STROM; PARANJPYE, 2000).

De todos os fatores de virulência conhecidos para *Vibrio vulnificus*, o mais documentado é a presença de uma cápsula de polissacarídeo, que é essencial na habilidade de *Vibrio vulnificus* invadir a célula hospedeira por fagocitose, e assim iniciar a infecção. O fator de virulência responsável pelo choque e morte é a presença de lipopolissacarídeo celular (LPS ou endotoxina). Uma grande variedade de outros fatores, incluindo hidrofobicidade, aderência a células humanas, produção de exoproteína e plasmídeos têm sido examinados e propostos como tendo um papel no processo de patogênese de *Vibrio vulnificus* (OLIVER, 2005; PRUZZO et al., 2005).

Embora a espécie *Vibrio cholerae* compreenda mais de 200 sorogrupos baseados no antígeno O, apenas o sorogrupo O1 e O139, são conhecidos por causar epidemias de cólera. O sorogrupo O1 pode ser dividido em dois biótipos, O1 "Eltor" e O1 "clássico", determinados pelas propriedades fisiológicas, tais como, resistência a polimixina B, número de genes codificadores de enterotoxina produzida pelo *Vibrio cholerae* (CT), atividade de hemolisina, e a presença de uma hemoaglutinina manose-sensível (MSHA), cada biotipo pode ter três diferentes sorotipos denominados "Inaba", "Ogawa," e "Hikojima" (KAPER et al., 1995; PRUZZO et al., 2005).

A espécie *Vibrio cholerae* é excretada em grande quantidade nas fezes de pacientes com cólera e convalescentes. A doença é transmitida principalmente pela via fecal-oral, ou de forma indireta através de água contaminada. Em vários países os surtos de cólera ocorrem devido ao consumo de produtos de origem marinha crus, mal cozidos, contaminados, ou recontaminados. Evidências sugerem que o *Vibrio cholerae* O1 é um componente da flora autóctone de águas salinas e estuárias, em zonas costeiras temperadas, o que pode representar um perigo permanente para a saúde pública (KAYSNER; DEPAOLA, JR, 2001).

A enterotoxina CT é o principal fator de virulência da doença da cólera. A ilha de patogenicidade genética designada VPI (*Vibrio* pathogenicity island) contém a maioria dos genes necessários para causar cólera, regulam o gene da CT. A maioria das cepas de *Vibrio cholerae* recuperadas de epidemias de cólera contém um antígeno somático comum e incluem sorogrupo O1 (KAYSNER; DEPAOLA, JR, 2001).

Estirpes de *Vibrio cholerae* idênticas ou muito semelhantes às clínicas nas características bioquímicas, mas que não conseguem

aglutinar nem no anti-soro O1 nem no anti-soro O139 são referidos como *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139, são abundantes em ambientes estuários, e podem, esporadicamente, estar envolvidas com doença diarreica. Algumas cepas não-O1/não-O139 também são invasoras, produzem uma toxina termoestável, e tem causado infecções sépticas em indivíduos susceptíveis. No entanto a maioria das cepas não produz CT, sendo esta a principal diferença entre estas cepas e as cepas de *Vibrio cholerae* O1/O139, que causam epidemias (KAPER et al., 1995; KAYSNER; DEPAOLA, JR, 2001; PRUZZO et al., 2005).

1.6. CONSUMO DE MOLUSCOS BIVALVES: VIBRIOS X SAÚDE PÚBLICA

Bactérias patogênicas como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Aeromonas* spp e *Plesiomonas* spp têm sido frequentemente isoladas de moluscos comercializados vivos, e *Vibrio parahaemolyticus* tem emergido como a maior causa de surtos de doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves ao redor do mundo (TEPLITSKI et al., 2009).

Segundo o “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC, 2011), entre os anos de 2000 e 2009, foram confirmados nos Estados Unidos 19 surtos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo a ingestão de ostras contaminadas por bactérias patogênicas. Destes, 79,0% (15) foram causados por *Vibrio parahaemolyticus*, 10,6% (2) por *Vibrio cholerae*, 5,2% (1) por *Salmonella* Typhi, da mesma maneira que *Campylobacter jejuni*, 5,2% (1), envolvendo um total de, aproximadamente, 472 pessoas. A prevalência de resistência antimicrobiana entre patógenos de origem alimentar tem aumentado durante as últimas décadas e com *Vibrio* spp. tem se observado uma prevalência dinâmica, que varia com as condições ambientais (DARAMOLA et al., 2009).

A importância dos alimentos de origem marinha como veículo de doenças de origem alimentar está condicionada a fatores como a dieta da população consumidora, os cuidados após a coleta de moluscos ou despesca de pescados, e o modo tradicional de preparo do alimento. Em consequência, a proporção de surtos envolvendo alimentos de origem marinha é significativamente mais alta no Japão, devido ao alto consumo de pescado *in natura* quando comparado a outros países como Canadá e Estados Unidos (HUSS et al., 2000). No Brasil os dados referentes a surtos não estão disponíveis no sistema de saúde.

Gastroenterites e infecções de pele têm sido associadas a diferentes espécies de *Vibrio*, e o número de casos têm aumentado nos últimos anos. Espécies de vibrios relacionadas a moluscos bivalves têm sido isoladas em 75% das doenças transmitidas por produtos marinhos (TEPLITSKI et al., 2009). A tetraciclina é o antibiótico recomendado para o tratamento de infecções severas causadas por *Vibrio* (HAN et al, 2007; MORRIS JR et al., 1985), e tratamentos alternativos podem utilizar combinações com cefalosporinas de longo espectro e doxiciclinas ou uma fluoroquinolona sozinha (HAN et al, 2007; TANG et al., 2002). No Brasil é proibido o uso da tetraciclina em cultivos e tanques, sendo o seu uso permitido apenas para o tratamento de infecções humanas.

Embora existam poucas referências sobre a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em infecções intestinais (HOFFER, 1983; MAGALHÃES et al., 1991) e infecções de pele (RODRIGUES et al., 2001) no Brasil, a detecção de *Vibrio parahaemolyticus* com potencial de virulência de clone pandêmico a partir de dois surtos e vários casos isolados de gastroenterite na região nordeste do Brasil, apontam para a necessidade de inclusão deste microrganismo na rotina brasileira de monitoramento de casos de diarreia (LEAL et al., 2008), particularmente em áreas costeiras e quando há histórico de paciente que manuseou ou consumiu produtos de origem marinha..

Archer e Moretto, (1994), estudaram a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões de banco natural do litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil, encontrando um índice de contaminação de 52,5% das amostras analisadas.

Em pesquisa realizada por Pereira et al. (2006), que avaliou a qualidade microbiológica de ostras *Crassostrea gigas*, cultivadas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis, não foi encontrada contaminação por *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* em nenhuma das 90 amostras analisadas.

Estudo realizado por Ramos et al. (2010), monitorando a qualidade higiênico-sanitária de ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas provenientes de fazendas marinhas da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, através de microrganismos indicadores, durante o período de um ano, classificou todas as áreas monitoradas como aptas para o cultivo de moluscos bivalves, por atenderem a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005). Da mesma forma, neste mesmo estudo os moluscos cultivados também atenderam a legislação vigente, RDC 12 – ANVISA (BRASIL, 2001). No entanto, a presença de diferentes espécies de vibrios, entre elas *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*

e *Vibrio vulnificus* foi observada nas ostras cultivadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, especialmente nos meses de verão, enfatizando a necessidade da caracterização das espécies presentes neste ambiente, assim como do potencial de patogenicidade das mesmas (RAMOS, 2007).

1.7. PREVENÇÃO E CONTROLE DE VIBRIOS EM ALIMENTOS

A natureza ubíqua das espécies de *Vibrio* em ambientes marinhos e estuários tornam impossível obter frutos do mar livres destas bactérias (SU; LIU, 2007). Para limitar o crescimento de vibrios em ostras contaminadas o Programa Nacional de Sanitização de moluscos dos Estados Unidos estabeleceu limites de tempo-temperatura, limitando o tempo máximo de exposição das ostras a temperaturas elevadas. Os moluscos cultivados para o consumo sem cocção necessitam ser resfriados a temperaturas inferiores a 10 °C, com intervalos máximos de até 10, 12 e 36 h de coleta, quando a média mensal de temperatura máxima do ar é ≥ 27 °C, entre 19 e 26 °C e < 18 °C, respectivamente (NSSP, 2003).

Em estudo realizado por Nordstrom et al., (2004), foi observado que devido à exposição das ostras nos cultivos durante a maré baixa, especialmente nos meses quentes, a densidade de *Vibrio parahaemolyticus* pode aumentar nos animais, sugerindo uma modificação nesta prática de cultivo.

Nas últimas décadas vários métodos de processamento de moluscos bivalves, com objetivo de garantir a qualidade microbiológica destes produtos, estão sendo estudados e desenvolvidos, estes métodos têm sido o principal fator na redução das doenças relacionadas ao consumo de moluscos. Entre as técnicas mais efetivas estão o cozimento, a transposição, a depuração e a alta pressão hidrostática, sendo praticadas em vários países europeus, bem como nos Estados Unidos e Canadá (BARARDI et al., 2006).

Segundo Cook e Ruple (1992), o aquecimento de ostras a 50 °C em água por 10 minutos foi adequado para reduzir a população de *Vibrio vulnificus* a níveis não detectáveis. Da mesma maneira, *Vibrio parahaemolyticus* é sensível ao calor, sendo possível observar uma redução maior que sete ciclos logarítmicos na contagem de células viáveis quando aquecido a 55 °C por 2 minutos (YEUNG; BOOR, 2004). Embora esse processo de aquecimento seja adequado na eliminação de diferentes espécies de *Vibrio* e de outros microrganismos potencialmente patogênicos, ele provoca modificações sensoriais nas

ostras, fazendo com que muitos consumidores não aceitem o produto. O processo de cocção, incluindo pasteurização e envasamento, aumenta a validade do produto, e a pasteurização é praticada em moluscos desconchados que serão vendidos congelados (BARARDI et al., 2006).

O tratamento com alta pressão hidrostática é um processo não-térmico que pode ser usado para destruir microrganismos patogênicos em alimentos, aumentando a vida de prateleira destes produtos, sem causar alterações no valor nutricional, aparência e sabor original do produto. (BARARDI et al., 2006; OLIVER, 2005; SU; LIU, 2007). Este tipo de tratamento tem demonstrado ser efetivo na eliminação de espécies potencialmente patogênicas de *Vibrio* em ostras, no entanto, causa a morte dos animais (COOK, 2003; HE et al., 2001), o que para ostras é uma grande desvantagem.

Outros processos térmicos, como estocagem a frio, congelamento e pasteurização a baixas temperaturas têm sido relatados como capazes de reduzir as contagens de espécies de vibrios em ostras. A irradiação é outro processo não térmico capaz de destruir patógenos em alimentos e, estudos têm mostrado que baixas dosagens de irradiação (< 3 KGy) não matam ou afetam a qualidade sensorial de ostras, e parece ser um meio efetivo para eliminar *Vibrio parahaemolyticus* em ostras, embora os alimentos irradiados não tenham uma boa aceitabilidade pelos consumidores (JAKABI et al., 2003).

Os métodos de purificação que são amplamente utilizados e que mantêm os moluscos bivalves vivos são a transposição e a depuração, ambos baseiam-se na capacidade de filtração dos moluscos, considerando que os microrganismos serão naturalmente eliminados de seus tecidos (BARARDI et al., 2006).

A transposição visa garantir a eliminação de microrganismos patogênicos de moluscos bivalves através da transferência das lanternas ou cordas de cultivo para áreas comprovadamente livres de contaminação, onde os moluscos passariam por um processo de depuração natural (BARARDI et al., 2006; SU; LIU, 2007; YEUNG; BOOR, 2004).

A depuração consiste em manter os moluscos bivalves por um tempo pré-estabelecido em água marinha tratada, livre de microrganismos ou, ao menos, em concentrações não patogênicas destes. Durante este tempo, os moluscos permanecem em água depurada filtrando e, conseqüentemente, eliminando os microrganismos patogênicos que possam ter sido acumulados em seu interior (SUPLICY, 1998). Para desinfetar a água, recorre-se a vários métodos

tais como luz ultravioleta (UV), cloro, iodóforos, ozônio e oxigênio ativado (HUSS, 1997). A depuração visa garantir a salubridade dos moluscos bivalves para consumo humano, sendo esta operação obrigatória num certo número de países.

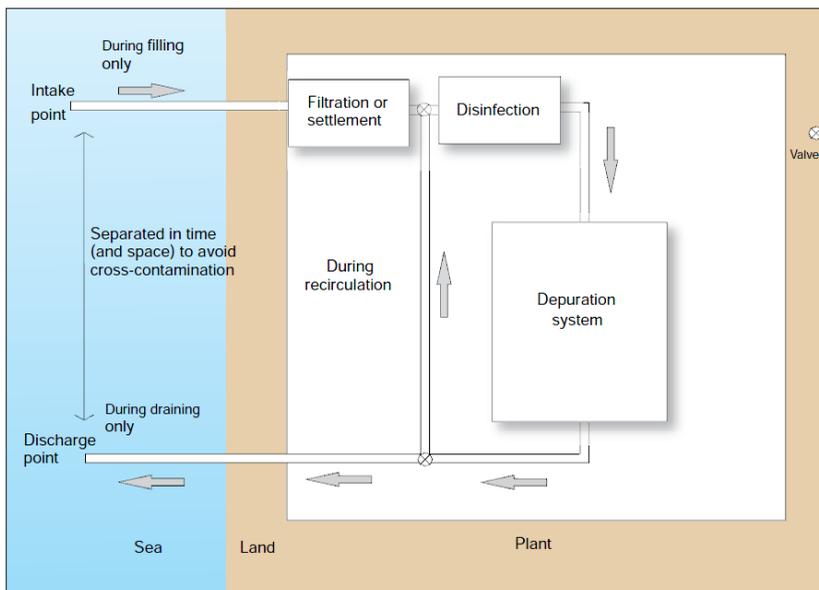
A depuração é um método que reduz os níveis de bactérias presentes na carne dos moluscos, diminuindo assim o potencial para infecções causadas pelo consumo de moluscos bivalves contaminados (CORRÊA et al., 2007). Geralmente é realizada por exigência de legislação local, regional ou nacional, mas também pode ser aplicada a critério da indústria para proteger os seus clientes, demonstrar o devido cuidado no processo produtivo, ou ainda para satisfazer os requisitos de legislação em outras regiões, a fim de conquistar mercado externo (LEE et al., 2008).

Existem basicamente três tipos de sistemas de depuração: os tanques de depuração que funcionam com água limpa e fresca injetada continuamente através de uma bomba (sistema de fluxo contínuo), os tanques onde a água pode ser substituída em intervalos determinados (*Batch-process*) ou ainda tanques com água recirculada (sistema fechado de circulação) (RICHARDS, 2003).

Os principais aspectos a serem considerados na escolha do sistema são o custo de implantação, custo operacional, facilidade e custo de manutenção, eficiência, efeitos residuais e tempo de contato necessário (SUPLICY, 1998). Com a diminuição da qualidade das águas costeiras, os sistemas de fluxo contínuo e *batch-process* são mais raros, sendo, portanto, o sistema de recirculação (figura 3) o mais utilizado atualmente (RICHARDS, 2003).

Na Europa, há um longo histórico do uso do processo de depuração para superar os problemas causados por contaminação fecal em áreas de cultivo de moluscos bivalves, devido ao grande número de pessoas que vivem em áreas costeiras e à pecuária extensiva. Embora os Estados Unidos também tenham um histórico na utilização de processos de depuração, a presença de grandes extensões de águas costeiras, relativamente intocadas, têm permitido que seja dada maior atenção nas práticas de colheita destes moluscos bivalves, ao invés da eliminação da contaminação pós-colheita. A depuração também tem sido extensivamente praticada na Austrália e no Japão. Em geral, moluscos bivalves comercializados em diversas outras partes do mundo não apresentam legislação higiênico-sanitárias específicas e, portanto, a depuração não tem sido praticada nessas áreas (LEE et al., 2008).

Figura 3 - Esquema de um sistema de depuração com recirculação de água marinha.



No Brasil, desde 2005 estava em fase de elaboração o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), o qual foi publicado recentemente, em 09 de maio de 2012, através da Instrução Normativa Interministerial nº 7, a qual instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves - PNCMB, com a finalidade de estabelecer os requisitos mínimos necessários para a garantia da inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar o atendimento destes requisitos (BRASIL, 2012).

Esta instrução normativa regulamenta o controle higiênico-sanitário de toda a cadeia produtiva de moluscos bivalves (como ostras e mexilhões) no país, desde a produção até a comercialização. A criação e implantação do programa dá início a uma nova etapa para a maricultura no Brasil. O PNCMB é fundamental para que a maricultura se desenvolva de forma sustentável no país, com atenção para todas as fases da cadeia produtiva visando à proteção da saúde da população e a criação de mecanismos seguros para o comércio nacional e internacional (SEAP, 2007).

O processo de depuração foi incluído no PNCMB, visto que até este momento não havia nenhuma regulamentação a este respeito no país. De acordo com o PNCMB a depuração será realizada quando necessário, dependendo da espécie de bivalve a ser processada e das condições sanitárias dos locais de retirada e deve ser efetuada nas dependências de processamento situadas na área limpa do estabelecimento industrial. Os processos deverão ser detalhados e validados, além da necessidade de atender a parâmetros de qualidade descritos na instrução normativa (BRASIL, 2012).

O processo de depuração tem um longo histórico como um tratamento pós-cultivo efetivo para reduzir diversas populações bacterianas em moluscos bivalves, no entanto o processo é conhecido também por seu efeito limitado na redução de contaminação por *Vibrio*, quando conduzido a temperatura ambiente (CHAE et al, 2009).

Em estudo recente, avaliando os efeitos da temperatura na depuração de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em ostras americanas (*Crassostrea virginica*), a temperatura em que o processo de depuração foi mais eficiente foi a 15 °C, tanto em relação à maior temperatura (22 °C) como às temperaturas menores (5 e 10 °C), reduzindo cerca de 2,1 e 2,9 log NMP/g, respectivamente (CHAE et al, 2009). Estas reduções podem ser significativas ou não, dependendo análise de risco da região em que as ostras são cultivadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTEKRUSE, S.F. et al. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region—the role of raw oysters. **Epidemiology and Infection**, v. 124, p. 489–495, 2000.

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, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v.10 (3). p. 379-386, 1994.

ATLAS, R. M. **Bacterial diversity**. In: Fishback, J.E. (ed.). Principles of microbiology. Boston: Wm. C. Brown Publishers. 1997.

BARARDI, C.R.M.; SINCERO, T.C.M.; CORREA, A.A. **Contaminação de moluscos bivalves por patógenos humanos**. In:

SILVA-SOUZA (org.). Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. Maringá: Abrapoa, p. 95-117, 2006.

BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 4 ed. São Paulo: Livraria Roca, 1990. 1179 p.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de março de 2005. **Diário Oficial**. Brasília 18 março de 2005.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Instrução Normativa Interministerial No- 7, de 8 de maio de 2012. **Diário Oficial**. Brasília 09 de maio de 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Brasília, 1 de janeiro de 2001.

CECA/FNMA, **Uma cidade numa ilha: relatório sobre os problemas socioambientais**. Florianópolis: Ed Insular, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2011. NATIONAL OUTBREAK REPORTING SYSTEM (NORS): Foodborne Outbreak Response online database. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>> Acesso em 24/01/2012.

CHAE, M. J.; CHENEY, D.; SU, Y.C. Temperature Effects on the Depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American Oyster (*Crassostrea virginica*). **Journal of Food and Science**. v. 74(2), p.62-66, 2009.

COELHO C. et al. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.507-511, 2003.

COOK, D. W. Sensitivity of *Vibrio* species in phosphate-buffered saline and in oysters to high-pressure processing. **Journal of Food Protection**. v. 66. p. 2276-2282, 2003.

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

CORRÊA, A. A. et al. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research**. v. 63. p. 479-489, 2007.

DALMASSO, A.; CIVERA, T.; BOTTERO, M.T. Multiplex primer-extension assay for identification of six pathogenic vibrios. **International Journal of Food Microbiology**. v.129, p. 21-25, 2009.

DARAMOLA, B.A; WILLIAMS, R.; DIXON R. In vitro antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources in Northern England. **International journal of antimicrobial agents**. v. 34 (5), p. 499-500, 2009.

DRAKE, S.; DEPAOLA, A.; JAYKUS, L. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. V.6, p.120-144, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Hatchery culture of bivalve molluscs**. Fisheries Technical Report, Rome, n. 471, 2004. 177 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2008. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*. Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome, 2008. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en Acesso em 26/01/2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, FAO. 2010. 197p. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf> Acesso em 20/01/2012.

FELDHUSEN, F. T. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, 2000.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M.; SILVESTRI, F. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. **Infopesca Internacional**, v. 28, p. 34-41, 2006.

FURLAN, E.F. **Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUTIÉRREZ, J.M.; MARTOS, P.G. Vibrios de origen marino en patología humana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.15, p. 383-388, 1997.

HAN, F.; WALKER, R. D.; JANES, M. E.; PRINYAWIWATKUL, W.; GE B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73. p. 7096-7098, 2007.

HE, H. et al. The use of high hydrostatic pressure to shuck oysters and extend shelf-life. **Journal of Shellfish Research**. v. 20. p. 1299-1300, 2001.

HOFER, E The first isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from human gastrointestinal infection in Brazil. **Revista de Microbiologia**. v. 14 (3). p. 174-178, 1983.

HØI, L. et al. Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for characterization of *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1674-1678, 1997.

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

HUSS, H.H; REILLY, A; EMBAREK, P.K.B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, v.11, p.149-156, 2000.

IMAI, T. **The evolution of oyster culture**. In: IMAI, T. Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture. Rotterdam: A. A. Balkema, 1982. 615p.

JAKABI, M. et al. Inactivation by ionizing radiation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis*, and *Vibrio parahaemolyticus* in oyster (*Crassostrea brasiliana*). **Journal of Food Protection**. v.66, p. 1025–1029, 2003.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6° edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711p.

KAPER, J.B.; MORRIS, G.J.; LEVINE, M.M. Cholera. **Clinical microbiology reviews**. v. 8. p. 48-86, 1995.

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**. v. 59(8). p. 2425–2429, 1993.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, JR. A. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp. in US Food and Drug Administration/ Center for Food Safety & Applied Nutrition (US FDA/CFSAN). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 9, revisad May 2004. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov) Acesso em 10/07/2008.

LEAL, N.C. et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105(3). p. 691-697, 2008.

LEE, C. Y.; CHENG, M. F.; YU, M. S.; PAN, M. J. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 209. p. 31-37, 2002.

LEE, R.; LOVATELLI, A.; ABABOUCHE, L. Bivalve Depuration: Fundamental and Practical Aspects. FAO Fisheries Technical Paper 511:139, 2008.

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

LEE, W.C. et al. Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 899–902, 2001.

LISTON, J. Microbial hazards of seafood consumption. **Food Technology**. v. 44, p. 56-62, 1990.

MACHADO, M. **Maricultura como base produtiva geradora de emprego e renda: estudo de caso para o distrito de Ribeirão da Ilha no município de Florianópolis – SC – Brasil**. 2002. 206 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MAGALHÃES, V. et al. Gastroenterites humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 33(1). p. 64-68, 1991.

MCLAUGHLIN, J.C. *Vibrio*. In: JOBARON, E. et al (ed). *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. V. 35. p 465–76, 1995.

MIOSSEC, L.; LE DEUFF, R-M.; GOULLETQUER, P. **Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster)**. ICES Cooperative Research Report, Copenhagen, n. 299, 2009. 42 p.

MOLLERI, G.S.F.; BONETTI, J. Caracterização morfo-sedimentar da Baía Sul/SC com base em um sistema de informações geográficas. **Revista Discente Expressões Geográficas**. Florianópolis, n.2, p. 175, 2005.

MORRIS JR, J G.; TENNEY, J. H.; DRUSANO, G L. In vitro susceptibility of pathogenic *Vibrio* species to norfloxacin and six other antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.28. p.442-445, 1985.

NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM (NSSP). **Guide for the control of Molluscan Shellfish, 2003**. Disponível em:

<http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat/nssp2003.pdf> Acesso em 05/06/2006.

NORDSTROM, J.L. et al. Effect of intertidal exposure on *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific Northwest oysters. **Journal of Food Protection**. v.67, p. 2178–2182, 2004.

OLIVEIRA NETO, F.M. **Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) no estado de Santa Catarina em 2006** – Epagri/Cedap. Florianópolis, 2007. Disponível em <<http://www.epagri.rct-sc.br/>> Acesso em 05/05/2007.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In: BELKIN, S.S.; COLWELL, R.R. Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. New York: Springer. 2005. p. 253-275.

PEREIRA, M.A. et al. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis-Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37. p. 159-163, 2006.

POLI, C.R. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*, 1852). In: POLI, C.R. et al. (Org.) **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Ed. Multitarefa, 2004. p. 251-266.

POWELL, E.; KLINCK, J.; HOFMANN, E.; BOCHENEK, E. Food quality and feeding strategies in hatchery rearing of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae: a modelling approach. **Journal of Shellfish Research**, v.1, p.604, 2000.

PRUZZO, C. et al. **Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environment**. In: BELKIN, S.S.; COLWELL, R.R. Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. New York: Springer. 2005. p. 217-252.

RAMOS, R. J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e ostras (*Crassostrea Gigas*) em áreas de cultivo na baía Sul da Ilha de Santa Catarina**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina.

RAMOS R. J. et al. Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 69(1). p. 29-37, 2010.

RICHARDS, G. P. **The evolution of molluscan shellfish safety**. In: VILLALBA, A. (Eds.) Molluscan Shellfish Safety. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2003. p. 221-322.

RODRIGUES, S. M. A. et al. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34 (5). p. 407-411, 2001.

RUPP, G.S. **Introdução à biologia das ostras**. In: FERREIRA, J.F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Florianópolis 1999. p. 15-24.

SAMAIN, J.F. et al. Genetically based resistance to summermortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. **Aquaculture**, v. 268, p. 227–243, 2007.

SANTOS, A. A. et al. **Síntese informativa da maricultura 2010 (mexilhões, ostras e vieiras)**. Epagri/Cedap. Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://www.epagri.rct-sc.br/> Acesso em 10/10/2011.

SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA – SEAP/PR. 2007. **Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves**. Disponível em: [http://200.198.202.145/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico\(MoluscosBivalves\).html](http://200.198.202.145/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico(MoluscosBivalves).html). Acesso em 20/03/2007.

SILVA, F.C. da. **Cultivo**. In: FERREIRA, J.F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos. 1999. p. 25-41.

SILVA, L.F. **Identificação de sub-ambientes na Baía Sul (SC) com base na análise de variáveis oceanografico-sedimentares**. 2002. 105

f. Dissertação (Mestrado em Geografia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

SOUZA FILHO, J. **Custo de produção da ostra cultivada**. Florianópolis: Instituto Cepa/SC. Cadernos de indicadores agrícolas. 2003. 23 p.

STROM, M. S.; PARANJPYE, R. N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes Infection**. v. 2, p. 177-188, 2000.

SUPLICY, F. M. **Ensaio sobre a depuração do mexilhão *Perna perna* (L., 1758)**. 1998. 81 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **Food microbiology**. v. 24, p. 549-558, 2007.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USFDA). **Quantitative risk Assessment on the public health Impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vpra-toc.html> Acesso em: 05/10/2007.

TANG, H. J.; CHANG, M. C.; KO, W. C.; HUANG, K. Y.; LEE, C. L.; CHUANG, Y. C. In vitro and in vivo activities of newer fluoroquinolones against *Vibrio vulnificus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 46. p.3580–3584, 2002.

TEPLITSKI, M.; WRIGHT, A.C.; LORCA, G. Biological approaches for controlling shellfish-associated pathogens. **Current opinion in Biotechnology**, v.20, p.1-6, 2009.

THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. **Taxonomy of the Vibrions**. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Eds.). *The Biology of Vibrions*. Whashington: American Society for Microbiology. 2006, p. 29-43.

YEUNG, P. S. M.; BOOR, K. J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. **Foodborne pathogens and disease**. v. 1(2), p. 74-88, 2004.

CAPÍTULO II

Ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos nas águas marinhas e ostras (*Crassostrea gigas*) da Baía Sul de Santa Catarina, Brasil

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo identificar e quantificar vibrios marinhos potencialmente patogênicos em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas marinhas provenientes de diferentes regiões de cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil, e correlacionar a incidência destes microrganismos com os parâmetros físico-químicos das águas marinhas destas regiões. As amostras foram coletadas entre outubro de 2008 e abril de 2009. Das 60 amostras de ostras analisadas, 29 (48,3%) estavam contaminadas por uma ou mais espécies de vibrios. As espécies mais frequentemente isoladas foram *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*. As contagens de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas amostras variaram entre $< 0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} (não detectável) a $2,3 \log_{10}$ NMP g^{-1} de ostra, e $< 0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} (não detectável) a $2,1 \log_{10}$ NMP g^{-1} de ostra, respectivamente. Das 60 amostras de água do mar analisadas, 44 (73,3%) estavam contaminadas por uma ou mais espécies de vibrios. As espécies mais frequentemente isoladas em águas do mar foram *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio vulnificus*. As contagens de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas amostras variaram entre $< 0,3 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} (não detectável) a $1,7 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} de água marinha, e $< 0,3 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} (não detectável) a $2,0 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} de água marinha, respectivamente. Quatro das 48 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram *tdh* positivo e 31 cepas foram *trh* positivo nas análises de PCR multiplex, embora nenhuma amostra tenha produzido halos de beta-hemólise em ágar Wagatsuma. Foi observada uma correlação positiva entre as contagens de *Vibrio vulnificus* e a temperatura da água do mar, e correlação negativa entre as contagens de *Vibrio parahaemolyticus* e salinidade. Os resultados deste estudo sugerem a necessidade de melhorar as estratégias para prevenir a ocorrência de doenças transmitidas pelo consumo de moluscos bivalves contaminados com vibrios patogênicos no Brasil.

Palavras-chave: Ostras. *Crassostrea gigas*. *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio vulnificus*. Moluscos bivalves.

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the incidence and level of contamination for *Vibrio* spp. in seawater and oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in Southern Brazil, from October 2008 through April 2009. Of the 60 oysters' samples analyzed, 29 (48.3%) contained one or more species vibrios. The most frequently isolated species were *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. The counts of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the samples ranged between $< 0.5 \log_{10} \text{MPN g}^{-1}$ (no detectable) to $2.3 \log_{10} \text{MPN g}^{-1}$ of oyster, and $< 0.5 \log_{10} \text{MPN g}^{-1}$ (no detectable) to $2.1 \log_{10} \text{MPN g}^{-1}$ of oyster, respectively. Of the 60 seawater samples analyzed, 44 (73.3%) contained one or more species vibrios. The most frequently isolated species in seawaters were *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio vulnificus*. The counts of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the samples ranged between $< 0.3 \log_{10} \text{MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$ (no detectable) to $1.7 \log_{10} \text{MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$ of seawater, and $< 0.3 \log_{10} \text{MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$ (no detectable) to $2.0 \log_{10} \text{MPN } 100 \text{ mL}^{-1}$ of seawater, respectively. Four of the 48 *Vibrio parahaemolyticus* strains were *tdh*-positive and 31 strains were *trh*-positive on multiplex PCR, but neither produced β -hemolysis halos in Wagatsuma agar. Positive correlation was found between the counts of *Vibrio vulnificus* and seawater temperature, and negative correlation between counts *Vibrio parahaemolyticus* and salinity. The results of this study suggest the need to improve strategies to prevent the occurrence of diseases transmitted by consumption of bivalve mollusks contaminated with pathogenic vibrios in Brazil.

Key words: Oyster. *Crassostrea gigas*. *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio vulnificus*. Bivalve mollusks.

1. INTRODUÇÃO

Face ao grande declínio dos recursos pesqueiros costeiros, ocasionado principalmente pela intensa exploração, aliada a degradação ambiental, os mexilhões e as ostras garantem a subsistência de parte da população ligada à pesca artesanal, tanto em termos de consumo como de comércio, em vários estados litorâneos brasileiros (VALLE; PROENÇA, 2000).

No Brasil, a produção de moluscos bivalves ocorre principalmente no estado de Santa Catarina, na região sul do Brasil, devido às excelentes condições geográficas desta área para o cultivo de organismos marinhos, como a presença de um grande número de baías, que facilita o estabelecimento de fazendas marinhas (COELHO et al., 2003; CORREA et al., 2007; OLIVEIRA NETO, 2007). Em 2010, cerca de 15.600 toneladas de moluscos foram comercializadas no Estado de Santa Catarina, e a maior produção de ostras (*Crassostrea gigas*) ocorre em fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina (SANTOS et al., 2011).

Essa considerável produção vem sendo comercializada para diferentes regiões do Brasil e, para que possa ganhar novos mercados é indispensável um controle sanitário eficiente, incluindo monitoramento constante das águas de cultivo e dos moluscos cultivados, principalmente devido à característica filtradora dos moluscos bivalves, os quais se alimentam através de filtração branquial da água do mar, de onde retiram seu alimento (RUPP, 1999).

As bactérias patogênicas relacionadas a alimentos marinhos podem ser divididas em três grupos, aquelas que são componentes naturais de ambientes marinho ou estuário (*Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Aeromonas hydrophila*); bactérias entéricas que estão presentes neste ambiente devido a contaminação fecal; e aquelas que contaminam os alimentos durante o processamento (FELDHUSEN, 2000; JAKSIC et al., 2002).

Além dos indicadores de contaminação fecal, os quais são amplamente utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de moluscos bivalves, diferentes espécies do gênero *Vibrio* ocorrem naturalmente em ambientes marinhos, costeiros e estuários, sendo que algumas espécies, como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae* são potencialmente patogênicas para o homem, e podem estar presentes nos pescados e moluscos crus ou parcialmente submetidos à cocção (THOMPSON et al., 2004).

A possibilidade de consumidores de alimentos de origem marinha serem infectados por vibrios patogênicos através da ingestão de ostras depende tanto da qualidade microbiológica do habitat marinho, quanto das práticas de manuseio e processamento destes moluscos (VIEIRA et al., 2011). A ocorrência destas bactérias não está relacionada com as contagens de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes, e são os principais responsáveis por gastroenterites relacionadas ao consumo de alimentos de origem marinha (MARTINEZ-MANZARES et al., 1991; OLIVER 2006; PEREIRA, 2002).

Infecções causadas por *Vibrio parahaemolyticus* têm sido reportadas em diversos países na Ásia (KUBOTA et al., 2008; LEE et al., 2001; PAN et al., 1997; SU et al., 2005), Estados Unidos (CDC, 1998; CDC, 1999; CDC, 2006; DRAKE et al., 2007; MCLAUGHLIN et al., 2005), alguns países europeus como Espanha (LOZANO-LEON et al., 2003) e Itália (OTTAVIANI et al., 2008), e alguns países da América do Sul como Chile (CABELLO et al., 2007; FUENZALIDA et al., 2006; HARTH et al., 2009), Peru (GIL et al., 2007; MARTINEZ-URTAZA et al., 2008) e Brasil (LEAL et al., 2008) também têm reportado surtos.

No hemisfério norte as cepas patogênicas de *Vibrio parahaemolyticus* podem ser diferenciadas de cepas não patogênicas a partir da sua capacidade de produzir hemolisina termoestável (TDH), cuja produção é denominada Fenômeno de Kanagawa. Em países tropicais, são isoladas muitas cepas ambientais TDH positivas. Além deste, a produção de enzima hemolisina TRH (thermostable related hemolysin) também tem sido observada em cepas de isolados clínicos, sendo, portanto, outro fator de virulência. A patogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus* está associada com a presença dos genes *tdh* e *trh* em ostras (NISHIBUCHI; KAPER, 1995). As infecções causadas por *Vibrio vulnificus* mostram diferentes apresentações clínicas, das quais a septicemia primária, as infecções em ferimentos, e as gastroenterites são as mais importantes (OLIVER, 2006). Infecções causadas por *Vibrio vulnificus* são, geralmente, graves e parecem ser raras no Brasil, embora existam poucas informações disponíveis sobre a real incidência destas infecções. O primeiro caso relatado de infecção por *Vibrio vulnificus* no Brasil foi de um paciente com história de pancreatite crônica, que havia consumido ostras e moluscos (ARAÚJO et al., 2004).

A concentração tanto de *Vibrio parahaemolyticus*, quanto de *Vibrio vulnificus* em ostras está diretamente relacionada à temperatura da água, com uma maior concentração estando presente quando as ostras estão em água acima de 20 °C. Devido a isso, estes microrganismos são

raramente isolados quando a temperatura das águas está abaixo de 15 °C. (PRUZZO et al., 2005; SU; LIU, 2007). No Brasil a temperatura das águas marinhas se encontra acima de 20 °C na maior parte do ano, favorecendo a ocorrência destes microrganismos nas diferentes estações.

Esta pesquisa teve por objetivo identificar e quantificar vibrios marinhos potencialmente patogênicos nas ostras (*Crassostrea gigas*) e águas marinhas provenientes de diferentes regiões de cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil, e correlacionar a incidência destes microrganismos com os parâmetros físico-químicos das águas marinhas destas regiões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ÁREA DE ESTUDO

Este trabalho foi realizado na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina em seis diferentes regiões geográficas, localizadas na parte insular da baía. As regiões selecionadas concentram o maior número de cultivos de ostras *Crassostrea gigas* da Grande Florianópolis.

Os seis pontos estudados, localizados no Distrito do Ribeirão da Ilha: Caieira da Barra do Sul (A), Tapera do Ribeirão (B), Costeira do Ribeirão (C), Freguesia do Ribeirão (D), Barro Vermelho (E) e Tapera da Base Aérea (F), são apresentados na figura 4.

Figura 4 - Pontos de coleta nas seis diferentes regiões da Baía Sul Insular



A eleição dos pontos de coleta dentro de cada região geográfica foi determinada observando-se o local onde se concentrava o maior número de espinheis (*long-line*) e/ou mesas, de maneira que obtivéssemos o ponto que melhor representasse as características dos cultivos dentro daquela região. Esses pontos foram geo-referenciados através de posicionamento por satélites (GPS- Global Position System), utilizando um aparelho GPS portátil Garmim 12.

A área de estudo recebe a influencia de rios, mangues, estuários e possui uma costa bem recortada, o que torna os pontos de estudo bastante distintos entre si. As coordenadas geográficas dos pontos geo-referenciados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de amostras

| Região Geográfica | Coordenadas Geográficas |
|--------------------------|--------------------------------|
| A | 27°48'84,9"S/48°33'98,1"O |
| B | 27°46'98,9"S/48°34'31,8"O |
| C | 27°44'35,0"S/ 48°33'89,0"O |
| D | 27°43'17,4"S/48°33'57,8"O |
| E | 27°42'11,1"S/ 48°33'33,7"O |
| F | 27°41'39,7"S/48°34'23,0"O |

2.2. COLETA DE AMOSTRAS

2.2.1. Ostras

Foram coletadas 60 amostras de ostras frescas, de tamanho médio de 10 cm, sendo que 12 ostras constituíram cada amostra, conforme o método analítico descrito no BAM/FDA por Kaysner e DePaola, (2001), totalizando 720 ostras analisadas.

As ostras foram retiradas aleatoriamente dos compartimentos das lanternas de cultivo, em cada um dos seis diferentes pontos de coleta previamente identificados em cada região. As coletas foram realizadas entre outubro de 2008 e abril de 2009, totalizando 10 coletas em cada ponto.

Após a coleta, as ostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo potável embalado, para serem transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFSC. As amostras começaram a ser analisadas em até três horas após a coleta.

2.2.2. Águas marinhas provenientes de regiões de cultivo de ostras

As coletas de água do mar proveniente dos locais de cultivo foram realizadas a 50 cm de profundidade, a partir da superfície, no sentido contrario a correnteza, em frascos estéreis com capacidade de 1L de água, sem haver contato do frasco aberto com a superfície do mar.

As coletas de amostras de água marinha foram realizadas concomitantemente com as amostras de ostras. Foram coletadas cinco amostras em cada ano, nos seis diferentes pontos de coleta da Baía Sul, totalizando 10 amostras de cada ponto, perfazendo um total de 60 amostras de água provenientes das áreas de cultivo de moluscos bivalves.

Após a coleta, os frascos contendo as amostras foram imediatamente acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo potável embalado, para serem transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFSC. As amostras começaram a ser analisadas em até três horas após a coleta.

2.3. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS ÁGUAS MARINHAS

Os parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e transparência da água do mar foram verificados “in loco”, sendo que a temperatura e o oxigênio dissolvido foram verificados utilizando um equipamento YSI-550A (YSI Incorporated), a salinidade, um refratômetro tipo salinômetro (Alfakit, 211), e a transparência através do disco de Secchi, enquanto o pH da água foi medido em laboratório

usando um medidor de pH digital (Quimis ® Q-400). As medidas foram realizadas em triplicata.

2.4. PREPARO E DILUIÇÕES DAS AMOSTRAS DE OSTRAS

As amostras de ostras foram lavadas imediatamente após chegada ao Laboratório, com escova sob água potável corrente. Todo o material aderido às conchas foi raspado e retirado, para então serem secas ao ar livre, em bandejas plásticas previamente desinfetadas com álcool 70%. Após, as 12 ostras de cada amostra foram abertas com faca estéril, específica para abertura de ostras e, o líquido intervalar e a carne transferidos assepticamente para saco estéril de preparo de amostras, constituindo o “pool” de cada amostra.

Para as ensaios microbiológicos foi pesada uma amostra de 50g proveniente do “pool” para análise de *Vibrio* spp. A amostra foi diluída em 450 mL de Tampão Fosfato Salina (PBS-Oxoid) e posteriormente desintegrada e homogeneizada.

2.5. DETERMINAÇÃO DO PH DA CARNE DAS OSTRAS

A determinação do pH da carne das ostras foi verificado imediatamente após a retirada da amostra de 50g, no “pool” remanescente de cada amostra, utilizando medidor digital de pH da marca Quimis modelo D-400A. As medições foram realizadas em triplicata.

2.6. ACUMULADO PLUVIOMÉTRICO

Foi verificado o acumulado pluviométrico mensal e o acumulado pluviométrico na semana anterior a cada coleta, na Grande Florianópolis, durante todo o período do estudo, através do acompanhamento dos dados recebidos mensalmente do Centro de Informações de Recursos Ambientais e Hidrometeorologia (CIRAM) da Epagri, provenientes da Estação 2027- ETE/ Insular, em Florianópolis, que fica próximo ao Terminal Rita Maria (27°36'00"S/48°33'21"O), a uma altura de 5m.

2.7. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os ensaios microbiológicos de *Vibrio* spp foram realizados segundo o método descrito no BAM/FDA por Kaysner e DePaola, (2001), sendo que as análises realizadas em amostras de água seguiram a técnica dos cinco tubos múltiplos, de acordo com as recomendações do Standarts Methods for the Examination of Water and Wastewater – APHA/AWWA/WEF, (APHA, 2005).

2.7.1. Ostras

Foram preparadas diluições decimais até 10^{-4} em Tampão fosfato salina (PBS), e foi semeado 1 mL de cada diluição em séries de três tubos de água peptonada alcalina (APW-Oxoid), suplementada com NaCl a 3%, incubando-os a 35 °C (± 1 °C) por 18 horas, para enumeração de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*. A partir de cada tubo com turvação, o conteúdo foi semeado por esgotamento, em placas de ágar tiossulfato citrato bile sacarose (TCBS-Oxoid) que foram incubadas a 35 °C (± 1 °C) de 18 a 24 horas. Foram selecionadas no mínimo três colônias suspeitas, tanto colônias sacarose-positivas (colônias amarelas no TCBS), as quais podem ser tanto de *Vibrio cholerae*, como de *Vibrio alginolyticus*, quanto colônias sacarose-negativas (colônias verdes no TCBS) que podem ser tanto de *Vibrio vulnificus*, como de *Vibrio parahaemolyticus*. As colônias suspeitas foram repicadas para ágar triptona sal com 3% de NaCl (T1N3).

As colônias foram submetidas ao teste de motilidade, em ágar sulfeto indol motilidade (SIM-Oxoid), teste da oxidase, utilizando tiras de oxidase (Newprov), teste de crescimento na presença a diferentes concentrações (0%, 1% e 3% NaCl), e coloração de Gram para estudo da morfologia bacteriana.

As cepas suspeitas nestes testes, ou seja, bastonetes móveis, oxidases positivas, Gram negativos, com reação típica na presença de diferentes concentrações de NaCl, foram submetidas à identificação taxonômica das espécies através da utilização do kit API 20E (Biomérieux), utilizando uma suspensão bacteriana preparada a partir de uma colônia isolada de uma cultura de 24h de incubação em 5 mL de solução salina contendo 0,85% NaCl. A população total de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas ostras foi determinada convertendo o número de tubos de APW positivos para cada

microrganismo, para NMP g^{-1} (número mais provável por grama), através da utilização da Tabela do número mais provável (NMP). Enquanto para *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus* foi analisada apenas a presença ou ausência.

2.7.2. Águas marinhas provenientes de cultivos de ostras

Foi empregada a técnica de cinco tubos múltiplos, na qual se utilizou uma série de cinco tubos com água peptonada alcalina (APW-Oxoid), duplamente concentrada suplementada com NaCl a 3%, seguida de duas séries de cinco tubos com APW em concentração normal, adicionando-se em cada série de cinco tubos 10,0, 1,0 e 0,1 mL da amostra de água marinha proveniente do cultivo, respectivamente. Os tubos foram incubados a 35 °C ($\pm 1^\circ$ C) “overnight”, e aqueles que apresentaram turvação, o conteúdo foi semeado, por esgotamento, em placas de ágar tiossulfato citrato bile sacarose (TCBS-Oxoid) e as placas foram incubadas a 35 °C ($\pm 1^\circ$ C) de 18 a 24 horas. Foram selecionadas no mínimo três colônias suspeitas, tanto colônias sacarose-positivas (colônias amarelas no TCBS), as quais podem ser tanto de *Vibrio cholerae*, como de *Vibrio alginolyticus*, quanto colônias sacarose-negativas (colônias verdes no TCBS) que podem ser tanto de *Vibrio vulnificus*, como de *Vibrio parahaemolyticus*. As colônias suspeitas foram repicadas para ágar tripton sal com 3% de NaCl (T1N3).

As colônias foram submetidas ao teste de motilidade, em ágar sulfeto indol motilidade (SIM-Oxoid), teste da oxidase, utilizando tiras de oxidase (Newprov), teste de crescimento na presença a diferentes concentrações (0%, 1% e 3% NaCl), e coloração de Gram para estudo da morfologia bacteriana.

As cepas suspeitas nestes testes, ou seja, bastonetes móveis, oxidases positivas, Gram negativos, com reação típica na presença de diferentes concentrações de NaCl, foram submetidas à identificação taxonômica das espécies através da utilização do kit API 20E (Biomérieux), utilizando uma suspensão bacteriana preparada a partir de uma colônia isolada de uma cultura de 24h de incubação em 5 mL de solução salina contendo 0,85% NaCl. A população total de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas águas marinhas foi determinada convertendo o número de tubos de APW positivos para cada microrganismo, para NMP 100 ml^{-1} (número mais provável por 100 ml), através da utilização da Tabela do número mais provável (NMP), para séries de cinco tubos por diluição (10,0 mL, 1,0 mL e 0,1 mL)

(APHA, 2005). Enquanto para *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus* foi analisada apenas a presença ou ausência.

2.8. DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS CEPAS DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Todas as cepas de *Vibrio parahaemolyticus* previamente isoladas nos ensaios microbiológicos foram inoculadas em Ágar Luria Bertami a 3% de NaCl e incubados a 35 °C por 18 a 24 horas, e posteriormente enviadas ao Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), para determinação genotípica e fenotípica da patogenicidade, conforme descrito no BAM/FDA por Kaysner e DePaola, (2001) em sua última atualização online. As cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram avaliadas fenotipicamente quanto à produção de urease em Agar Uréia de Christensen (Oxoid) e hemólise total em Agar Wagatsuma, designado teste de Kanagawa.

A confirmação genotípica da patogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus* foi desenvolvida por reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex através da detecção simultânea dos genes *tdh* (thermostable direct hemolysin) e *trh* (thermostable direct hemolysin-related hemolysin). Foram utilizados os iniciadores L-*tdh*: 5'-gta aag gtc tct gac ttt tgg ac-3' e R-*tdh*: 5'-tgg aat aga acc ttc atc ttc acc-3' para o gene *tdh* e L-*trh*: 5'-ttg gct tgg ata ttt tca gta tct-3' e R-*trh*: 5'-cat aac aaa cat atg ccc att tcc g-3' para o gene *trh*, além da pesquisa do gene *tlh* (thermolabile hemolysin), que é um marcador espécie-específico para *Vibrio parahaemolyticus*, que foi desenvolvido utilizando os iniciadores L-*tl*: 5'-aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg-3' e R-*tl*: 5'-gct act ttc tag cat cat ttt ctc tgc-3'.

A extração do DNA foi feita a partir de culturas overnight a 35 ± 2 °C em caldo TSB-2% NaCl. Um mL de cada cultura foi centrifugado em um tubo de microcentrifuga por 3 minutos a 15.000 x g, o pellet foi lavado por duas vezes com solução salina 0,9%, e ressuscitado em um mL de água deionizada. Posteriormente foi fervido por 10 minutos e congelado a -20 °C antes de proceder às análises.

As ampliações do DNA foram feitas em termociclador, programado para 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C para a desnaturação do DNA, 1 minuto a 60 °C para anelamento dos iniciadores e 2 minutos a 72 °C, para o alongamento ou síntese de DNA, terminando por uma etapa de 3 minutos a 72 °C para alongamento final das fitas.

Dez microlitros dos produtos das ampliações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, no tampão TBE, a 100V e 200mA. O gel foi corado com Brometo de etídio, sendo o DNA visualizado em sistema de foto documentação Image Quant 300 (GE).

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados dos ensaios microbiológicos foram transformados em \log_{10} para realizar as análises estatísticas, utilizando o programa Statistica 7.0[®].

Para comparação dos parâmetros físico-químicos, e das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas diferentes regiões de cultivo, os resultados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA, utilizando um nível de significância de 5%. Havendo diferença entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey para compará-las.

A influência dos parâmetros físico-químicos nas contagens microbiológicas de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas amostras de água marinha foi avaliada utilizando o teste não paramétrico de Correlação de *Spearman*, enquanto a correlação entre os parâmetros físico-químicos e a incidência de *Vibrio* spp. foi avaliada através da correlação de *Pearson*. A análise de Regressão linear foi utilizada para avaliar a influência dos acumulados pluviométricos nas contagens dos diferentes microrganismos analisados.

Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos na tabela do NMP foram $<3,0 \text{ NMP g}^{-1}$ ou $<1,8 \text{ NMP } 100 \text{ ml}^{-1}$, estes resultados foram substituídos pelo número imediatamente inferior, ou seja: $2,0 \text{ NMP g}^{-1}$ e $1,7 \text{ NMP } 100 \text{ ml}^{-1}$, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

As coletas foram realizadas nos meses de outubro a março, compreendendo, portanto, as estações de primavera e verão nas quais a temperatura da água do mar variou de 20 °C a 29 °C, e a temperatura média das seis regiões geográficas estudadas foi de $24,3 \text{ °C} \pm 2,2 \text{ °C}$.

A temperatura média foi similar na maioria das regiões, exceto entre as temperaturas das regiões A e F (tabela 2), o que provavelmente

ocorreu devido ao fato das coletas acontecerem no início da manhã na região A e por volta das 12h na região F, quando as temperaturas das águas já sofreram elevação que ocorre normalmente no decorrer do dia. A temperatura média de 24,3°C nas águas das seis regiões de estudo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina foi favorável para a multiplicação de vibrios, visto que vibrios patogênicos são frequentemente isolados de ambientes aquáticos com temperaturas variando entre 10 e 30°C (MATTE et al., 1994). De acordo com Strom e Paranjpye (2000), *Vibrio vulnificus* se prolifera em áreas ou durante os meses em que a temperatura da água excede os 18 °C, condição em que todas as amostras deste estudo foram coletadas, já que, a menor temperatura registrada foi de 20 °C.

Em estudo realizado por Silveira Jr et al. (2008^a), as medições realizadas na Costeira do Ribeirão, durante o período de setembro de 2001 a dezembro de 2007, revelaram a temperatura média da água de 22,0 ± 3,5 °C neste período.

A salinidade média das seis regiões analisadas foi de 30,1 ± 4,6 ppm, sendo a máxima de 36,0 ppm e a mínima medição detectada de 12,0 ppm no mês de dezembro de 2008, logo após grandes volumes de precipitação que incidiu sobre a bacia de captação da Baía Sul. Não foi observada diferença estatística entre as médias de salinidade nas diferentes regiões de cultivo, $p > 0,05$.

De acordo com as definições da Resolução Conama 357 (BRASIL, 2005), as águas são consideradas salinas quando apresentam salinidade igual ou superior a 30 ppm, estando portanto, a maior parte das amostras deste estudo (76,7%) nesta classe.

Os resultados de Silveira Jr et al. (2008^b), durante um ano de monitoramento diário da salinidade no Ribeirão da Ilha, apontaram a salinidade média de 33,7 ± 2,9 ppm (tabela 2), sendo que a mínima foi de 10,0 ppm e a máxima 37,0 ppm.

A amplitude de pH observada nas águas das seis regiões de cultivo da Baía Sul foi de 7,6 a 8,6, e a média encontrada foi de 8,2 ± 0,1. Valores muito próximos aos observados por Curtius et al. (2003), que encontraram um pH em torno de 8,0 na região do Ribeirão da Ilha.

De acordo com a Resolução Conama 357 (BRASIL, 2005), as águas salinas de classe I, que são aquelas que podem ser destinadas a recreação, a proteção das comunidades aquáticas ou a aquicultura e atividades de pesca, devem ter pH entre 6,5 - 8,5 não devendo ultrapassar 0,2 unidades. Não foi observada diferença estatística entre as médias de pH nas diferentes regiões de cultivo, $p > 0,05$.

O valor médio de oxigênio dissolvido nas águas foi de $6,9 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$. Não foi observada diferença estatística entre as médias de oxigênio dissolvido nas diferentes regiões de cultivo ($p > 0,05$). Bessen (2005) observou entre os anos de 1999 a 2001, nas águas do Ribeirão da Ilha uma média de $6,7 \pm 1,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ de oxigênio dissolvido, valores muito próximos aos observados neste estudo. De acordo com Resolução Conama 357 (BRASIL, 2005) as águas salinas de classe I devem apresentar em qualquer amostra, oxigênio dissolvido não inferior a $6,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$, neste estudo sete amostras (11,7%) apresentaram quantidade de oxigênio dissolvido pouco abaixo deste valor.

A transparência média das águas nas seis regiões de cultivo foi de $1,5 \pm 0,4 \text{ m}$, com máxima de $2,6 \text{ m}$ e mínima de $0,8 \text{ m}$. Não foi observada diferença estatística entre as transparências médias nas diferentes regiões de cultivo ($p > 0,05$). Quanto mais material em suspensão na água, maior a turbidez e, conseqüentemente, menor a transparência.

Os valores de pH das ostras das diferentes regiões variou entre 5,9 e 6,8, e o pH médio observado foi $6,3 \pm 0,2$. No Brasil não existe legislação que estabeleça limites de pH para moluscos, no entanto, segundo Cook (1991), pH acima de 6,0 para a carne de ostra é considerado bom, e pH de 6,5 é comumente apresentado pela ostra *Crassostrea gigas* viva. Neste estudo apenas uma amostra (1,7%) apresentou pH ligeiramente abaixo de 6,0.

3.2. ACUMULADO PLUVIOMÉTRICO

Os dados pluviométricos da região da Grande Florianópolis foram fornecidos mensalmente pelo CIRAM-EPAGRI. Na figura 5 é possível observar que no mês de novembro de 2008 foi registrado o maior volume de precipitação durante o período de estudo, totalizando $586,2 \text{ mm}^3$. Durante a estação da primavera, que compreende os meses de outubro, novembro e dezembro ocorreram períodos de chuvas mais intensas. Em relação ao acumulado pluviométrico da semana anterior às coletas (figura 6), os maiores picos ocorreram nos meses de novembro e dezembro de 2008 e abril de 2009, segundo dados da CIRAM-EPAGRI.

De acordo com a análise de regressão linear, a salinidade das águas da Baía Sul foi negativamente influenciada pelo acumulado pluviométrico da semana anterior à coleta nas regiões de cultivo ($\beta = -0,8$ e $p < 0,05$).

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras de águas salinas analisadas nas seis diferentes regiões geográficas da Baía Sul.

| PARÂMETROS | REGIÃO A | REGIÃO B | REGIÃO C | REGIÃO D | REGIÃO E | REGIÃO F |
|------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Temperatura (°C) | 22,9±2,0* | 23,3 ± 1,9 | 24,6 ± 2,0 | 24,9 ± 1,9 | 24,9 ± 2,0 | 25,2 ± 2,3* |
| pH água | 8,1 ± 0,2 | 8,2 ± 0,1 | 8,2 ± 0,1 | 8,2 ± 0,1 | 8,1 ± 0,2 | 8,3 ± 0,2 |
| Oxigênio dissolvido (mg L⁻¹ O₂) | 6,9 ± 0,6 | 6,8 ± 0,6 | 6,8 ± 0,9 | 6,9 ± 1,1 | 6,7 ± 0,8 | 7,2 ± 1,0 |
| Salinidade (ppm) | 33,9 ± 3,6 | 33,3 ± 3,3 | 32,8 ± 3,5 | 32,5 ± 3,5 | 30,7 ± 6,5 | 31,2 ± 4,0 |
| Transparência (m) | 1,7 ± 0,8 | 1,4 ± 0,4 | 1,6 ± 0,3 | 1,4 ± 0,4 | 1,6 ± 0,5 | 1,3 ± 0,4 |
| pH carne ostra | 6,1 ± 0,1 | 6,1 ± 0,1 | 6,1 ± 0,0 | 6,2 ± 0,0 | 6,3 ± 0,1 | 6,1 ± 0,1 |

*Médias apresentam diferença estatística $p < 0,05$

Figura 5 - Acumulado pluviométrico mensal na região da Grande Florianópolis durante o período de estudo

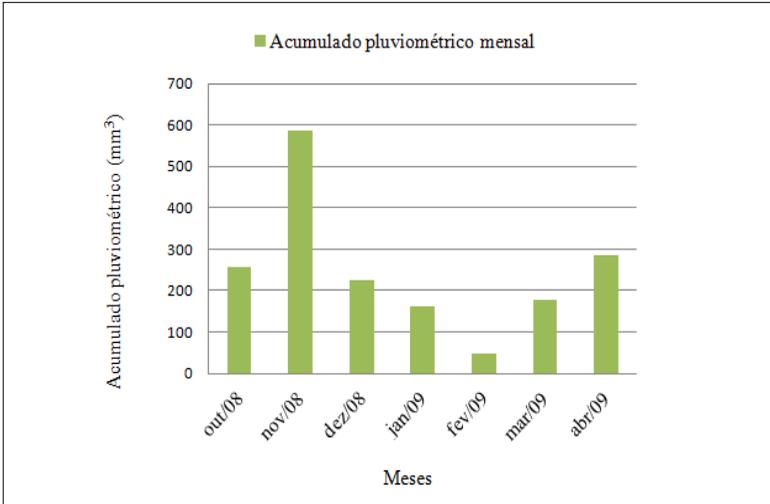
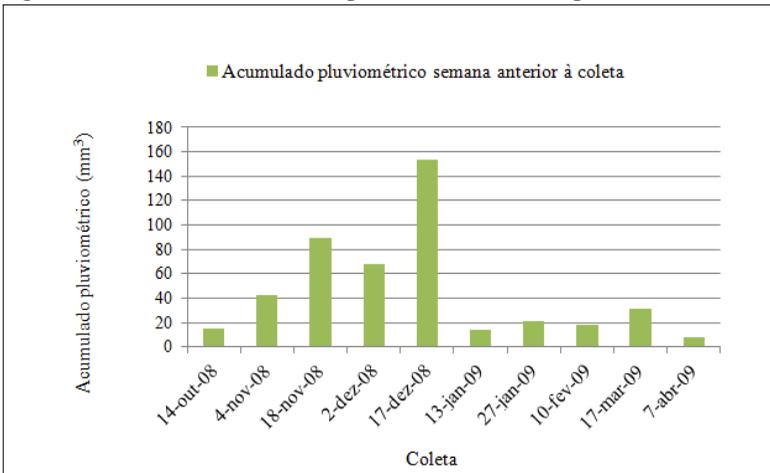


Figura 6 - Acumulado pluviométrico da semana anterior às coletas na região da Grande Florianópolis durante o período de estudo.



3.3. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

3.3.1. Ostras

Das 60 amostras analisadas, 29 (48,3%) apresentaram contaminação por uma ou mais espécies de vibrio potencialmente patogênico. A espécie isolada com maior frequência nas amostras de ostras foi *Vibrio parahaemolyticus* (21 isolados, 35,0%), seguida de *Vibrio vulnificus* (6 isolados, 10%) e *Vibrio alginolyticus* (4 isolados, 6,7%), enquanto *Vibrio cholerae* não foi isolado em nenhuma das 60 amostras analisadas e *Vibrio fluvialis* foi isolado em apenas uma amostra.

As contagens de *Vibrio parahaemolyticus* variaram de $<0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} (não detectável) a $2,3 \log_{10}$ NMP g^{-1} de ostra, tendo sido a contagem média nas amostras de $1,2 \log_{10}$ NMP g^{-1} , enquanto as contagens de *Vibrio vulnificus* variaram de $<0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} (não detectável) a $2,1 \log_{10}$ NMP g^{-1} , tendo sido a contagem média de $0,8 \log_{10}$ NMP g^{-1} . Em dezembro e janeiro, meses de verão no Brasil, foram observadas as maiores populações de *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras de ostras. Duas espécies de *Vibrio* coexistiram em três amostras de ostras (*Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*), conforme pode ser observado na tabela 3.

No presente estudo, a incidência e população de *Vibrio parahaemolyticus* foram inferiores a de estudos realizados no Sudeste do Brasil (COSTA SOBRINHO et al, 2010; COSTA SOBRINHO et al, 2011; RISTORI et al, 2007). Durante todo o monitoramento foram isoladas 32 cepas de vibrios das amostras de ostras, sendo a maior incidência na região C, e menor incidência na região D (tabela 4).

Tabela 3 - Prevalência de *Vibrio* sp. em amostras de ostras e águas marinhas provenientes de seis áreas de cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009.

| Amostras (n) | Microrganismos | Amostras positivas | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|------|
| | | Nº | % |
| Ostras (60) | <i>Vibrio</i> sp. | 29 | 48,3 |
| | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 18 | 30,0 |
| | <i>Vibrio vulnificus</i> | 6 | 10,0 |
| | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio alginolyticus</i> | 3 | 5,0 |
| | <i>Vibrio alginolyticus</i> | 1 | 1,7 |
| | <i>Vibrio fluvialis</i> | 1 | 1,7 |
| | <i>Vibrio</i> sp. | 44 | 73,3 |
| Águas marinhas (60) | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 20 | 33,3 |
| | <i>Vibrio alginolyticus</i> | 10 | 16,7 |
| | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio alginolyticus</i> | 5 | 8,3 |
| | <i>Vibrio vulnificus</i> | 4 | 6,7 |
| | <i>Vibrio vulnificus</i> e <i>Vibrio alginolyticus</i> | 2 | 3,3 |
| | <i>Vibrio vulnificus</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 2 | 3,3 |
| | <i>Vibrio fluvialis</i> | 1 | 1,7 |

Tabela 4 - Número de isolados de diferentes espécies de vibrios isoladas de ostras provenientes das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009.

| Espécie | A | B | C | D | E | F | Total |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|-------|
| <i>V. alginolyticus</i> | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| <i>V. cholerae</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 1 | 5 | 7 | 1 | 4 | 3 | 21 |
| <i>V. vulnificus</i> | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 6 |
| <i>V. fluvialis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Total região | 4 | 7 | 9 | 2 | 5 | 5 | 32 |

Não foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na população média de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas ostras provenientes das seis diferentes regiões de cultivo da Baía Sul durante todo o estudo (tabela 5).

Tabela 5 - Média de contaminação de ostras provenientes de diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009.

| Região | <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>V. vulnificus</i> |
|--------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| | em ostras \log_{10} NMP g^{-1} Média \pm DP* | em ostras \log_{10} NMP g^{-1} Média \pm DP* |
| A | 0,36 \pm 0,17 ^a | 0,57 \pm 0,60 ^a |
| B | 0,78 \pm 0,67 ^a | 0,37 \pm 0,21 ^a |
| C | 0,88 \pm 0,60 ^a | 0,30 \pm 0,00 ^a |
| D | 0,44 \pm 0,30 ^a | 0,42 \pm 0,36 ^a |
| E | 0,74 \pm 0,66 ^a | 0,30 \pm 0,00 ^a |
| F | 0,80 \pm 0,70 ^a | 0,67 \pm 0,57 ^a |

Médias na mesma coluna, seguidas pela mesma letra, não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Em estudo realizado por Pereira et al., (2004), que analisaram 50 amostras de moluscos bivalves, sendo 40 amostras de ostras provenientes de restaurantes do Rio de Janeiro, e 10 amostras de mexilhões provenientes de banco natural de Niterói, foram isoladas 141 cepas de *Vibrio parahaemolyticus*.

Em estudo realizado por Archer e Moretto, (1994), foi pesquisada a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em quarenta amostras de mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) procedentes de banco natural da praia da Pinheira, município de Palhoça, Santa Catarina, durante um período de três meses, nas quais foi constatada a presença de *Vibrio parahaemolyticus*, em 52,5% das amostras, com níveis de contaminação entre $< 0,5$ e $2,0 \log_{10}$ NMP g^{-1} , estes resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo.

Ramos (2007), avaliando 90 amostras de ostras provenientes das mesmas regiões de cultivo descritas neste estudo, durante o período de um ano, entre 2006 e 2007, isolou 39 cepas de vibrios, sendo a espécie isolada com maior frequência *Vibrio alginolyticus*, seguida de *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus*, o inverso do observado neste estudo, onde mais da metade das cepas isoladas foram de *Vibrio parahaemolyticus*. Esta variabilidade na incidência de diferentes espécies de vibrios pode estar relacionada com o fato de este estudo ter sido realizado nas estações mais quentes, primavera e verão, enquanto

no outro estudo foram contempladas todas as estações do ano. Vieira et al, (2011), também observaram uma maior prevalência de *Vibrio parahaemolyticus* (30,3% dos isolados) nas amostras de ostras.

Em outro estudo, realizado por Sousa et al., (2004), investigando a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* em 12 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), provenientes de um criadouro natural, no estuário do rio Cocó, Fortaleza, Ceará – Brasil, foram confirmadas a presença de *Vibrio cholerae* em quatro amostras e *Vibrio parahaemolyticus* em apenas uma amostra. A presença de *Vibrio cholerae* coincidiu com a ocorrência de chuvas locais e redução nos níveis de salinidade do curso de água, o que não foi observado neste estudo.

No Brasil, o controle microbiológico para o cultivo de moluscos é baseado em parâmetros de qualidade bacteriológica das águas marinhas provenientes de áreas destinadas à aquicultura, que é avaliada através de ensaios microbiológicos de coliformes a 45 °C ou *Escherichia coli* (Brasil, 2005), enquanto para os moluscos comercializados são seguidos os parâmetros estabelecidos através da Resolução 12/2001, do Departamento de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001), a qual não estabelece limites para *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em moluscos bivalves *in natura*. O nível máximo de *Vibrio parahaemolyticus* é estabelecido apenas para pratos prontos a base de frutos do mar crus, sendo este de $1,0 \times 10^3$ NMP g⁻¹. Embora as ostras não sejam mencionadas explicitamente neste parágrafo, elas podem ser consideradas frutos do mar crus, visto que são tradicionalmente consumidas *in natura*. Considerando esta legislação como parâmetro para comparação dos resultados observados em nosso estudo, as contagens de *Vibrio parahaemolyticus* apresentaram resultados muito inferiores ao limite máximo permitido.

O FDA/US (Food and Drug Administration/ United States), através do Shellfish Sanitation Program - Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2009 estabelece um limite de atenção para contaminação por *Vibrio parahaemolyticus*, sendo este nível de contaminação igual ou superior a 10^4 NMP g⁻¹, Kanagawa positivo ou negativo, e embora recomende atenção especial a *Vibrio vulnificus*, não estabelece limites para este microrganismo, devendo ser analisado caso a caso (UNITED STATES, 2009).

3.3.2. Águas marinhas

Das 60 amostras de água marinha analisadas, 44 (73,3%) apresentaram a presença de uma ou mais espécies de vibrios. A espécie isolada com maior frequência foi *Vibrio parahaemolyticus* (27 isolados, 45,0%), *Vibrio alginolyticus* (17 isolados, 28,3%), *Vibrio vulnificus* (oito isolados, 13,3%) e *Vibrio fluvialis* foi isolado de apenas uma amostra, enquanto *Vibrio cholerae* não foi isolado de nenhuma das 60 amostras analisadas.

As contagens de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras de água marinha variaram de $< 0,3 \log_{10}$ NMP 100 mL⁻¹ (não detectável) a $1,7 \log_{10}$ NMP 100 mL⁻¹ de água marinha, e o nível médio de contaminação por *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras de água marinha foi $0,8 \log_{10}$ NMP 100 mL⁻¹, enquanto as contagens de *Vibrio vulnificus* variaram de $< 0,3 \log_{10}$ NMP 100 mL⁻¹ (não detectável) a $2,0 \log_{10}$ NMP 100 mL⁻¹ de água marinha, e o nível médio de contaminação por *Vibrio vulnificus* foi $0,6 \log_{10}$ NMP 100 mL⁻¹. Duas espécies de vibrios coexistiram em nove amostras (*Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus* em cinco amostras; *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* em duas amostras e *Vibrio vulnificus* e *Vibrio alginolyticus* em uma amostra, tabela 3).

Embora as contagens de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* observadas nas águas possam ser consideradas baixas, é importante ressaltar que em moluscos filtradores, como as ostras e os mexilhões, estes microrganismos são concentrados no seu intestino e em outros tecidos, podendo atingir até 10^6 bactérias por grama de molusco (STROM; PARANJPYE, 2000).

Não foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na densidade média de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas amostras de águas marinhas provenientes das seis diferentes regiões de cultivo da Baía Sul (tabela 6).

Em trabalho realizado por Høi et al, (1998), avaliando a presença de *Vibrio vulnificus* em 115 amostras águas marinhas, provenientes de regiões de cultivo de moluscos marinhos na Dinamarca, foram encontradas 39 (33,9%) amostras positivas, um percentual bem maior que o observado neste estudo. No entanto, embora apenas oito amostras de águas marinhas (13,3%) tenham sido positivas para *Vibrio vulnificus* neste estudo, ainda que em baixas concentrações, estes dados devem servir de alerta para a necessidade de um constante monitoramento desta espécie em regiões de cultivo de moluscos bivalves, devido à habilidade deste microrganismo em causar infecções graves e muitas vezes fatais (STROM; PARANJPYE, 2000).

Tabela 6 - Média de contaminação de águas marinhas provenientes de diferentes regiões de cultivo de moluscos bivalves da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, entre os anos de 2008 e 2009.

| Região | <i>V. parahaemolyticus</i> em água salina \log_{10} NMP 100 mL ⁻¹ | <i>V. vulnificus</i> em água salina \log_{10} NMP 100 mL ⁻¹ |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| | Média \pm DP* | Média \pm DP* |
| A | 0,46 \pm 0,41 ^a | 0,32 \pm 0,19 ^a |
| B | 0,38 \pm 0,34 ^a | 0,34 \pm 0,22 ^a |
| C | 0,63 \pm 0,46 ^a | 0,29 \pm 0,19 ^a |
| D | 0,53 \pm 0,39 ^a | 0,40 \pm 0,55 ^a |
| E | 0,75 \pm 0,42 ^a | 0,23 \pm 0,00 ^a |
| F | 0,52 \pm 0,50 ^a | 0,37 \pm 0,43 ^a |

Médias na mesma coluna, seguidas pela mesma letra, não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Vários estudos têm sugerido uma forte influência da temperatura na concentração de vibrios marinhos nas águas (CHAE et al, 2009; DEEPANJALI et al, 2005; DEPAOLA et al, 2003; WANG et al, 2010), neste estudo não foi possível estabelecer esta correlação para *Vibrio parahaemolyticus* (Spearman R: 0,14; $p > 0,05$), devido às coletas terem sido realizadas durante os meses da primavera e verão, período em que a temperatura das águas se manteve em média próxima a 24 °C, permitindo detecção constante de diferentes espécies de vibrios.

Foi observada uma correlação significativa entre as contagens de *Vibrio vulnificus* (Spearman R: 0,30; $p < 0,05$) e a temperatura da água, corroborando com os resultados observados em outros estudos (BLACKWELL; OLIVER, 2008; HØI et al, 1998; LHAFI; KUHNE, 2007). Segundo Strom e Paranjpye (2000), *Vibrio vulnificus* se prolifera em áreas onde a temperatura excede os 18 °C, condição em que todas as amostras deste estudo foram coletadas, já que, a menor temperatura registrada nesta região foi de 20 °C. Normanno et al. (2006), avaliando a incidência de vibrios em mexilhões da região da Puglia, na Itália, durante o período de um ano, não observou diferença estatística nos meses de verão em relação aos outros meses do ano.

Diversos fatores estão envolvidos na distribuição e sobrevivência de microrganismos em ecossistemas estuários, como os parâmetros bióticos e abióticos das águas, tais como temperatura, salinidade, pH e turbidez (RIPPEY 1994; STROM; RISTORI et al, 2007; PARANJPYE, 2000). A concentração de *Vibrio parahaemolyticus* aumenta nas águas marinhas com o aumento da temperatura e está

correlacionada com o aumento sazonal na ocorrência de casos esporádicos de infecções nos meses mais quentes (HLADY; KLONTZ 1996).

De acordo com o Center for Disease Control (CDC, 1999), responsável pelo controle de doenças nos Estados Unidos, surtos de infecções causadas por *Vibrio parahaemolyticus* no Noroeste do Pacífico e no Texas ocorrem durante os meses de verão. No entanto, no presente estudo, não houve correlação entre as contagens de *Vibrio parahaemolyticus* nas ostras e águas e a temperatura da água, provavelmente porque todas as coletas foram realizadas durante os meses de primavera e verão, com uma temperatura média da água de 24,3 °C, permitindo o isolamento de vibrios durante todo o período de estudo.

Audemard et al (2011), sugerem a utilização de um processamento pós coleta para eliminar *Vibrio vulnificus* de ostras, que utiliza água com elevadas concentrações de sal, sendo esta uma alternativa estratégica, uma vez que a elevada salinidade afeta negativamente a sobrevivência de *Vibrio vulnificus*. No entanto neste estudo esta correlação negativa com a salinidade da água foi observada apenas para *Vibrio parahaemolyticus* (Spearman R: - 0,33; $p < 0,05$), enquanto não foi observada nenhuma correlação entre salinidade e *Vibrio vulnificus* (Spearman R: - 0,03; $p > 0,05$), resultado que está de acordo com resultados obtidos por outros estudos realizados em áreas de cultivo de moluscos na costa brasileira (RAMOS 2007; RISTORI et al, 2007) e em outras partes do mundo (BLACKWELL; OLIVER, 2008; HØI et al, 1998; PARVEEN et al, 2008).

Os parâmetros de transparência, oxigênio dissolvido e pH das águas não apresentaram correlação com a densidade, nem de *Vibrio parahaemolyticus* ($p > 0,05$), nem de *Vibrio vulnificus* ($p > 0,05$). A incidência de diferentes espécies de vibrios marinhos nas águas não apresentou correlação com nenhum parâmetro físico-químico avaliado ($p > 0,05$).

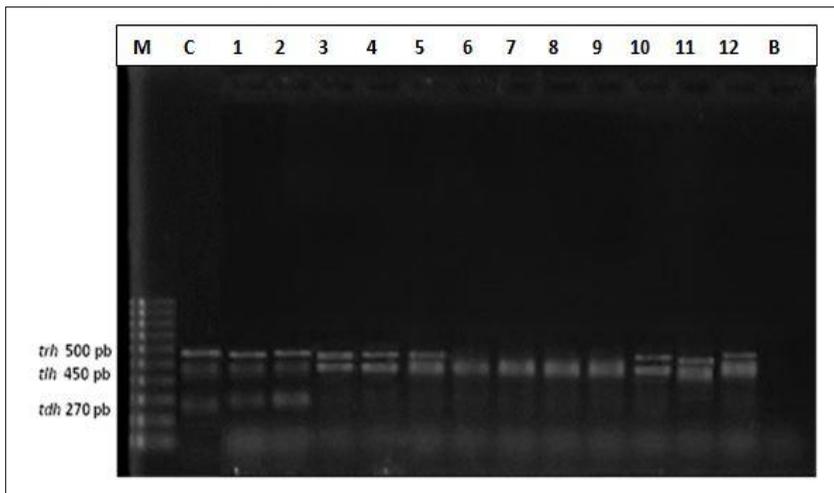
O acumulado pluviométrico na semana anterior à coleta apresentou uma correlação positiva com as contagens de *Vibrio parahaemolyticus* nas águas da Baía Sul (beta = 0,38; $p < 0,05$), enquanto para as contagens de *Vibrio vulnificus* foi observada uma correlação positiva com o acumulado pluviométrico mensal (beta = 0,30; $p < 0,05$).

3.3.3. Determinação de patogenicidade

Apenas uma das 48 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (isoladas de amostras de ostras e águas marinhas) confirmadas pela detecção do gene *tl* (espécie-específico) foi urease positiva, mas nenhuma das cepas produziram beta hemólise em ágar Wagatsuma. A única cepa urease positiva, também apresentou o gene *trh*, resultado já observado por outros autores (SUTHIENKUL et al., 1995; VIEIRA et al., 2011). De acordo com estes autores a positividade para urease é por si só um fator de virulência, devido a esta forte correlação que tem sido observada entre a presença do gene *trh* e a produção de urease.

O gene *tdh* foi detectado em quatro (8,3%) cepas e o gene *trh* foi detectado em 23 cepas (47,9%), ambos relacionados à patogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus* (Fig. 7).

Figura 7 - Foto gel de agarose PCR multiplex *Vibrio parahaemolyticus*



M- marcador PM 100 bp; C- *V.parahaemolyticus* controle +genes *trh* e *tdh*; B- controle negativo; positivo-genes *trh* e *tdh*: 1, 2; positivo gene *trh* 3, 4, 5, 10, 11, 12; positivo gene espécie específica *tlh*- 1 a 12.

Matté et al., (1994) avaliando a distribuição de vibrios em mexilhões cultivados em três diferentes locais de amostragem na cidade de Ubatuba, no litoral norte de São Paulo, Brasil, observaram uma incidência maior de *Vibrio alginolyticus*, seguido de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fuvialis*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio furnissii*,

Vibrio mimicus e *Vibrio cholerae* non-01, com 0,51% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas, positivas no teste de Kanagawa, diferentemente do observado neste estudo, onde nenhuma cepa foi Kanagawa positiva.

Estudo conduzido por Costa Sobrinho et al. (2010), avaliando a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* totais e patogênicos em 123 amostras de ostras (*Crassostrea brasiliana*) coletadas de um estuário localizado no estado de São Paulo, na região sudeste do Brasil, detectou *Vibrio parahaemolyticus* em 99,2% das amostras, com densidades variando de $< 0,5 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$ a $5,0 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$ e apenas uma amostra de ostra (0,8%) foi Kanagawa e *tdh* positivos.

Da mesma forma Ristori et al. (2007) avaliando amostras de ostras e água do estuário da Cananéia, na costa sul do estado de São Paulo, Brasil, observaram *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa negativos em 100% das amostras de ostras e de água do estuário, e sua concentração variou de $0,6 \text{ NMP g}^{-1}$ a $\geq 3,4 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$.

Em estudo realizado por Vieira et al. (2011), avaliando cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de ostras frescas no nordeste do Brasil, 3,6% das cepas Kanagawa negativas apresentaram os genes *tdh* e *trh*. Cepas Kanagawa negativas portadoras do gene *tdh* podem produzir TDH e são, portanto, potencialmente toxigênicas.

4. CONCLUSÕES

O isolamento de diferentes espécies de vibrios tanto nas amostras de ostras, quanto nas amostras de água, com maior incidência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, que são as principais espécies de vibrios relacionadas a doenças transmitidas pelo consumo de moluscos bivalves, deve servir de alerta para necessidade de monitoramento constante destes microrganismos. Embora as contagens observadas não sejam elevadas, a detecção destes microrganismos por si só requer atenção, visto que a exposição deste produto a temperaturas inadequadas, seja durante o transporte, comercialização, manipulação ou distribuição, vai favorecer a multiplicação destes microrganismos, que podem atingir contagens elevadas. O fato de terem sido isoladas cepas que apresentavam os genes específicos de patogenicidade reforça a necessidade de monitoramento constante. A correlação observada entre a incidência destes microrganismos com os parâmetros de temperatura e salinidade, para *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus*,

respectivamente, pode ser utilizada como ferramenta de apoio no controle destes microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA).
AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION - AWWA, WATER ENVIRONMENT FEDERATION - WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21 ed, Ed. Washington, 1336p., 2005.

ARAÚJO, M. R. E. et al. Infecção por *Vibrio vulnificus* em São Paulo, Brasil; Relato de caso. In: Congresso Brasileiro de Patologia Clínica, 38, 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2004.

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, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.10, n.3, p. 379-386, jul/set, 1994.

AUDEMARD, C. et al. High salinity relay as a postharvest processing strategy to reduce *Vibrio vulnificus* levels in Chesapeake Bay oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Food Protection**, v. 74, p.1902-1907, 2011.

BESSEN, K. **Avaliação comparada de variações temporais de características físico-químicas da água do mar em áreas de produção de moluscos de Santa Catarina - Brasil**. 2005. 45 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

BLACKWELL, K. D.; OLIVER, J. D. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina estuaries. **Journal of Microbiology**, v. 46, p.146-153, 2008.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de março de 2005. **Diário Oficial**. Brasília 18 março de 2005.

BRASIL. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e

padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. **Diário Oficial**. Brasília, 1 de janeiro de 2001.

CABELLO, F. C. et al. *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Epidemic diarrhea, Chile, 2005. **Emerging infectious diseases**, v.13, p.655-656, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and Clams Harvested from Long Island Sound -- Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. **Morbidity And Mortality Weekly Report**, v. 48, n.3, p.48-51, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters - Pacific Northwest, 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 47, n. 22, p.457-462, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw shellfish - three states, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.55, p.854-856, 2006.

CHAE, M. J.; CHENEY, D.; SU, Y.C. Temperature Effects on the Depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American Oyster (*Crassostrea virginica*). **Journal of Food and Science**. v. 74(2), p.62-66, 2009.

COELHO C. et al. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.507-511, 2003.

COOK, D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: Ward, D.R.; Hackney, C.(eds). **Microbiology of marine food products**. New York: Van Nostrand Reinhold, USA, cap.2, p. 19-34, 1991.

CORRÊA, A. A. et al. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research**. v. 63. p. 479-489, 2007.

COSTA SOBRINHO, O. S. et al. Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of São Paulo state, Brazil. **Applied and environmental microbiology**, v.76, p.1290 – 1293, 2010.

COSTA SOBRINHO, O. S. et al. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p.137–140, 2011.

CURTIUS, A. J. et al. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura. Resultados parciais de um estudo de caso realizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Quimica Nova**, v. 26, p. 44-52, 2003.

DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.; KARUNASAGAR, I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.3575–3580, 2005.

DEPAOLA, A. et al. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p. 2299-2302, 2003.

DRAKE, S. L., DEPAOLA, A., JAYKUS, L. A. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 6, p.120 -144, 2007.

FELDHUSEN, F. T. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, 2000.

FUENZALIDA, L. et al. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. **Environmental microbiology**, v. 8, p.675–683, 2006.

GIL, A. I. et al. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. **International journal of infectious diseases**, v. 11, p.324-328, 2007.

HARTH, E. et al. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. **Emerging infectious diseases**, v. 15, p.163-168, 2009.

HLADY, W.G.; KLONTZ, K.C. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, p. 1176-1183, 1996.

HØI, L. et al. Occurrence of *Vibrio vulnificus* Biotypes in Danish Marine Environments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 7-13, 1998.

JAKSIC, S. et al. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**. v. 13, p. 491-493, 2002

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, JR. A. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp. in US Food and Drug Administration/ Center for Food Safety & Applied Nutrition (US FDA/CFSAN). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 9, revisad May 2004. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov) Acesso em 10/07/2008.

KUBOTA, K. et al. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi prefecture, Japan. **Foodborne pathogens and disease**, v.5, p.641-648, 2008.

LHAFI, S. K.; KÜHNE, M. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p.297-300, 2007.

LEAL, N. C. et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. **Journal of applied microbiology**, v.105, p. 691-697, 2008.

LEE, W.C. et al. Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 899–902, 2001.

LOZANO-LEON, A. et al. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. **FEMS microbiology letters**, v. 226, p. 281-284, 2003.

MATTÉ, G. R. et al. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic Coast of Brazil. **The journal of applied microbiology**, v. 77, p. 201-207, 1994.

MCLAUGHLIN, J. B. et al. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. **The new England journal of medicine**, v.351, p.1463-1470, 2005.

MARTINEZ-MANZANARES, E. et al. Relation between classical indicators and several pathogenic microorganisms involved in shellfish-borne diseases. **Journal of Food Protection**, v.54, n.9, p.711-717, 1991.

MARTINEZ-URTAZA, J. et al. Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. **Epidemiology**, v.19, n. 6, p. 829-837, 2008.

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

NORMANNO, G. et al. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 219-222, 2006.

OLIVEIRA NETO, F.M. **Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) no estado de Santa Catarina em 2006** – Epagri/Cedap. Florianópolis, 2007. Disponível em <<http://www.epagri.rct-sc.br/>> Acesso em 05/05/2007.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (ed.) The biology of vibrios. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 349-366, 2006.

OTTAVIANI, D. et al. First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy. **[Journal of Clinical Microbiology](#)**, v. 46, p. 2144-2145, 2008.

PAN, T.M. et al. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.1260–1262, 1997.

PARVEEN, S. et al. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p.354-361, 2008.

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

PEREIRA, F. S. Methodologies to asses *Vibrio* spp. Virulence. **Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**, 2002. SPVC, Oeiras, p. 281-286, 2002.

PRUZZO, C. et al. **Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environment**. In: BELKIN, S.S.; COLWELL, R.R. Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. New York: Springer. 2005. p. 217-252.

RAMOS, R. J. Monitoramento bacteriológico de águas do mar e ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na baía Sul da Ilha de Santa Catarina. 2007. 86 p. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, 2007.

RIPPEY, S. R. Infections diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, p. 419-425, 1994.

RISTORI, C. A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International journal of environmental health research**, v. 17, p. 259-269, 2007.

RUPP, G.S. **Introdução à biologia das ostras**. In: FERREIRA, J.F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Florianópolis 1999. p. 15-24.

SANTOS, A. A. et al. **Síntese informativa da maricultura 2010 (mexilhões, ostras e vieiras)**. Epagri/Cedap. Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://www.epagri.rct-sc.br/> Acesso em 10/10/2011.

SILVEIRA JR. N. et al. Variação da salinidade superficial do mar na Baía sul da ilha de Santa Catarina. In: **IV Simposio Brasileiro de Oceanografia**, São Paulo, 2008b.

SILVEIRA JR., N. et al. Temperatura superficial do mar na Baía sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil: 2001 a 2007. In: **III Congresso Brasileiro de Oceanografia**, Fortaleza, 2008 a.

SOUSA, O. V et al. Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* em ostras, *Crassostrea rhizophorae*, coletadas em um criadouro natural no estuário do rio Cocó, Fortaleza, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 2, 2004.

STROM, M. S.; PARANJPYE, R. N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes Infection**. v. 2, p. 177-188, 2000.

SU, H. P. et al. Bacterial food-borne illness outbreaks in northern Taiwan, 1995 e 2001. **Journal of infection and chemotherapy**, v.11, p.146-151, 2005.

SUTHIENKUL, O. et al. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. **The Journal of infectious diseases**, v. 172, p.1405–1408, 1995.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **Food microbiology**. v. 24, p. 549-558, 2007.

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

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USFDA). **National Shellfish Sanitation Program model ordinance 2009**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/Seafo>

[od/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram](#). Acesso em 05/06/2010.

VALLE, R.P., PROENÇA, C.E.M. **Evolução e perspectivas da aquicultura no Brasil**. In: VALENTI, W. C. et al. Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. c. 13. p. 383-398. Brasília: CNPq / Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 399p.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. Kanagawa-Negative, tdh- and trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. **Current Microbiology**, v. 63, p. 126-130, 2011.

WANG, D. et al. Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. **International journal of food microbiology**, v.137, p. 76–80, 2010.

CAPÍTULO III

**Patogenicidade e resistência a antibióticos de cepas de vibrios marinhos
isolados de ostras e águas salinas da Baía Sul de Santa Catarina**

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo avaliar a patogenicidade de cepas de vibrios marinhos potencialmente patogênicos isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) e águas marinhas provenientes de regiões de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, e testar a susceptibilidade destas cepas frente a diferentes antibióticos. Foram utilizadas 120 cepas de *Vibrio* spp. As cepas de *V. parahaemolyticus* foram submetidas à tipificação sorológica. As cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* foram submetidas à análise de PCR para avaliar a presença de genes de patogenicidade, e as cepas de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* foram avaliadas quanto a diferentes características fenotípicas. Todas as cepas foram testadas, pelo método de difusão em disco, frente a dez diferentes antibióticos: amoxicilina + clavulanato, ampicilina, gentamicina, tetraciclina, cefazolina, cloranfenicol, ciprofloxacina, cefuroxima, cefoxitina, cefotaxima. Das 120 cepas enviadas para tipificação, 14 não apresentaram crescimento, sendo avaliadas as características das 106 cepas reativadas, 83 (78,3%) foram previamente identificadas como *V. parahaemolyticus*, 20 (18,9%) como *V. vulnificus*, três (2,8%) como *V. cholerae*. Foram caracterizados 20 sorotipos diferentes de *V. parahaemolyticus*, assim distribuídos: O1:K1 (5), O1:K25, O1:K41, O1:K69, O1:KUT, O2:K3 (3), O2:K28 (7), O3:K6 (6), O3:K30, O4:K34, O4:K63, O5:K61, O6:K4 (2), O6:K6 (2), O6:K18 (2), O6:K46, O7:K7, O7:K19 (2), O8:K20, O8:K39, (KUT = não tipável). Das 83 cepas de *V. parahaemolyticus* avaliadas neste estudo, 31 (37,3%) cepas foram positivas para o gene *trh*, e quatro (4,8%) cepas foram positivas para o gene *tdh*. Os genes *tdh* e *trh* ocorreram simultaneamente em uma (4,3%) amostra de ostras e em três (5%) amostras de água marinha. Das três cepas de *V. cholerae* analisadas, duas foram positivas para os genes *ctxAB* e *ompW*, sendo uma destas positiva também para o gene *rfb*. Apenas uma das 83 cepas de *V. parahaemolyticus* foi urease positiva, mas nenhuma das cepas produziram beta hemólise em ágar Wagatsuma. Todas as 20 cepas de *V. vulnificus* foram indol positivas, enquanto em relação à presença da enzima ornitina descarboxilase foi observada uma grande variabilidade, 80% (16/20) das cepas de *V. vulnificus* foram classificadas como presuntivamente patogênicas, devido à característica mucóide da colônia. A resistência à gentamicina e cefuroxima foi observada em 84,3% das cepas testadas para ambos antibióticos, e a resistência a ampicilina foi observada em 80,0% das cepas de *Vibrio* spp. O cloranfenicol foi o antibiótico ao qual as cepas de *Vibrio* spp. foram mais sensíveis, no entanto esta sensibilidade foi observada com

maior frequência apenas para *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*. A tetraciclina foi o segundo antibiótico ao qual as cepas de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* foram mais sensíveis, diferente do observado para *V. cholerae* que apresentaram maior sensibilidade a Amoxicilina + clavulanato. Os resultados desta pesquisa servem de subsídio para estudos de análise de risco de vibrios potencialmente patogênicos em ostras na região sul do Brasil.

Palavras-chave: Ostras. Água marinha. Vibrios. Patogenicidade. Antibióticos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the pathogenicity of strains of potentially pathogenic marine vibrios isolated from oysters (*Crassostrea gigas*) and sea water from growing regions in the South Bay of Island of Santa Catarina, and test the susceptibility of these strains to different antibiotics. Were used 120 strains of *Vibrio* spp. The strains of *V. parahaemolyticus* were subjected to serological typing. The strains of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* were subjected to PCR analysis for the presence of pathogenic genes, and strains of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* were evaluated for different phenotypic characteristics. All strains were tested by disk diffusion method, compared to ten different antibiotics: amoxicillin + clavulanate, ampicillin, gentamicin, tetracycline, cefazolin, chloramphenicol, ciprofloxacin, cefuroxime, cefoxitin, cefotaxime. Of the 120 strains sent for typing, 14 did not grow, and therefore were evaluated the characteristics of the 106 reactivated strains, 83 (78.3%) were previously identified as *V. parahaemolyticus*, 20 (18.9%) as *V. vulnificus*, three (2.8%) and *V. cholerae*. We characterized 20 different serotypes of *V. parahaemolyticus*, as follows: O1: K1 (5), O1: K25, O1: K41, O1: K69, O1: KUT, O2: K3 (3), O2: K28 (7), O3: K6 (6), O3 : K30, O4: K34, O4: K63, O5: K61, O6: K4 (2), O6: K6 (2), O6: K18 (2), O6: K46, O7: K7, O7: K19 (2) , O8: K20, O8: K39, (KUT = nontypeable). Of the 83 strains of *V. parahaemolyticus* evaluated in this study, 31 (37.3%) strains were positive for the *trh* gene, and four (4.8%) strains were positive for the *tdh* gene. The *tdh* and *trh* genes occurred simultaneously in one (4.3%) sample of oysters and three (5%) samples of seawater. Of the three strains of *V. cholerae* analyzed, two were positive for the *ctxAB* and *ompW* gene, among them is also positive for the *rfb* gene. Only one of 83 strains of *V. parahaemolyticus* was urease positive, but none of the strains produced beta hemolysis on Wagatsuma agar. All 20 strains of *V. vulnificus* were indole positive, while for the presence of the enzyme ornithine decarboxylase has been observed a large variability, 80% (16/20) strains of *V. vulnificus* were classified as presumptive pathogens, due to the characteristic mucoid colony. The gentamycin and cefuroxime resistance was observed in 84.3% of the strains to both antibiotics, and the ampicillin resistance was observed in 80.0% of the strains of *Vibrio* spp. Chloramphenicol is the antibiotic to which the strains of *Vibrio* spp. were more susceptible, however, this susceptibility was observed more frequently only *V. parahaemolyticus*

and *V. vulnificus*. The tetracycline antibiotic was the second to which the strains of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were more susceptible than the observed for *V. cholerae* that showed greater susceptibility to amoxicillin + clavulanate. These results serve as input for risk analysis studies of potentially pathogenic vibrios in oysters in southern Brazil.

Key words: Oysters. Seawater. Vibrios. Pathogenicity. Antibiotics

1. INTRODUÇÃO

Os vibrios ocorrem naturalmente em ambientes marinhos e estuários, incluindo locais destinados a atividades aquícolas em todo o mundo (FERRINI et al, 2008). A densidade de *Vibrio* spp. no ambiente aquático e nos produtos de origem marinha apresenta uma grande variabilidade de acordo com o local, estação do ano, o tipo de amostra e a metodologia analítica empregada (DEPAULA et al, 1990; PARVEEN et al, 2008; RISTORI et al, 2007).

Algumas espécies de *Vibrio* spp. patogênicas ao homem, especialmente *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, são as principais causas de doenças e mortes associadas ao consumo de produtos de origem marinha nos Estados Unidos e em várias outras partes do mundo (HAN et al, 2007; OLIVER, 2006). É alarmante a incidência de infecções causadas por *Vibrio* devido ao consumo de ostras cruas ou mal cozidas, as quais vêm aumentando significativamente desde 2000 (CDC, 2007).

A virulência das cepas patogênicas de *Vibrio parahaemolyticus* se distingue das não patogênicas pela produção de uma hemolisina termoestável (TDH), a qual é codificada pelo gene *tdh*, que está de alguma forma, associada à gastroenterite causada pelo microrganismo. Das cepas isoladas de pacientes com infecção intestinal causada por *Vibrio parahaemolyticus*, 95% produzem hemolisina e são designadas Kanagawa positivas, enquanto das cepas isoladas de amostras ambientais 99%, são Kanagawa negativas (ICMSF, 2005).

A maioria das cepas de *Vibrio cholerae* recuperadas de casos de epidemia de cólera contém um antígeno comum somático e incluem sorogrupo O1 (KAPER et al., 1995). Até pouco tempo atrás, apenas o sorogrupo O1 era associado a epidemias de cólera, no entanto, em 1993, um grande surto de cólera ocorreu em Bangladesh na Índia, a partir de um novo sorogrupo até então desconhecido, o sorogrupo O139 (ALBERT, 1994).

A patogenicidade de *Vibrio vulnificus* é considerada elevada, pois apresenta capacidade de causar septicemia com taxas de mortalidade superiores a 50%, particularmente em indivíduos portadores de doenças crônico-degenerativas, cuja condição de elevados níveis séricos representa o maior risco epidemiológico deste patógeno (NASCIMENTO et al., 2001). A caracterização de cepas de *Vibrio vulnificus* levou a subdivisão da espécie em três biotipos que diferem fenotipicamente e sorologicamente (HOI et al., 1998). Os três biotipos

são patogênicos para humanos, sendo que o biotipo 1 exibe diversos lipopolissacarídeos (LPS) imunologicamente distintos, e são indol e ornitina descarboxilase positivos, e o biotipo 2 além de ser indol e ornitina descarboxilase negativo, não fermentam o manitol e são homogêneas quanto ao tipo de lipolissacarídeo, já o biotipo 3, foi isolado pela primeira vez em 1999, em Israel, e diferem dos outros biotipos por algumas características fenotípicas, tais como, são citrato negativo e não fermentam a lactose, celobiose e salicina (OLIVER, 2005).

Tradicionalmente, *Vibrio* spp. são considerados altamente suscetíveis a maioria dos antimicrobianos (OLIVER, 2006). No entanto, nas últimas décadas a resistência a antimicrobianos emergiu e envolveu diversos gêneros de bactérias, devido ao excessivo uso de antimicrobianos em humanos, na agricultura e também em sistemas aquícolas (CABELLO, 2006; HAN, 2007). Os poucos estudos recentes que examinaram a susceptibilidade antimicrobiana de *Vibrio* spp. e outras bactérias aquáticas foram conduzidos em outros países, sendo necessário portanto, conhecer a susceptibilidade antimicrobiana de cepas isoladas de ostras e águas salinas provenientes de regiões representativas no cultivo de moluscos bivalves no Brasil, como é o caso da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.

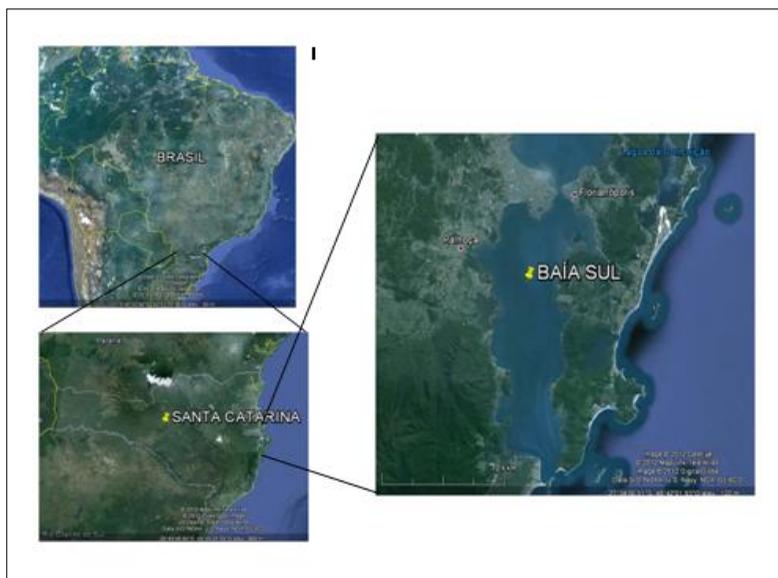
Este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade de cepas de vibrios marinhos potencialmente patogênicos isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) e águas marinhas provenientes de regiões de cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, e testar a susceptibilidade destas cepas frente a diferentes antimicrobianos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CEPAS DE VIBRIOS

Para realização dos ensaios de tipificação sorológica, ensaios genotípicos e fenotípicos e ensaios de sensibilidade a antibióticos foram utilizadas 120 cepas de vibrios previamente isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas provenientes de fazendas marinhas localizadas do lado insular e continental da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina (figura 8), as quais foram identificadas bioquimicamente através dos métodos descritos no BAM/FDA por Kaysner e DePaola (2001).

Figura 8 - Região de onde as cepas de vibrios foram isoladas na Baía Sul de Santa Catarina, Brasil.



2.2. TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA

Todas as cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram caracterizadas antigenicamente para identificação do sorotipo. Essa prova foi realizada em placa de vidro para observação da aglutinação das cepas frente aos antissoros poli e monovalentes (Denka Seiken Co Ltda, Tóquio, Japão).

O antígeno H é comum a todas as cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, tendo, portanto pouca importância na sorotipagem. Para sorotipagem do antígeno O, o antígeno capsular K, foi removido das bactérias por aquecimento a 100 °C por 1 a 2 horas, uma vez que este mascara o antígeno somático O. Este processo expõe o antígeno somático O, que é termoestável.

As cepas de *Vibrio cholerae* não foram submetidas à caracterização antigênica, porque as colônias apresentavam característica rugosa.

2.3. PATOGENICIDADE

2.3.1. Ensaios genotípicos

As análises genotípicas foram realizadas por análise de PCR (Polymerase Chain Reaction), no Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foram utilizados iniciadores específicos de patogenicidade para *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*, os quais são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Fator de patogenicidade, gene, seqüências de nucleotídeos e tamanho dos produtos da PCR utilizados na análise de patogenicidade.

| Fator de patogenicidade | Gene | Sequencia de oligonucleotídeos (5' - 3') | Tamanho do produto amplificado (pb) | Referência |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Cholera toxin (CT) | <i>ctx</i> <i>AB</i> | GCC GGG TTG TGG GAA TGC TCC AAG | 536 | GOEL et al, 2007 |
| | | GCC ATA CTA ATT GCG GCA ATC GCA TG | | |
| Zonula occludens toxin (ZOT) | <i>zot</i> | TCG CTT AAC GAT GGC GCG TTT T | 947 | SINGH et al, 2001 |
| | | AAC CCC GTT TCA CTT CTA CCC A | | |
| Toxin-coregulated pilus (TCP) | <i>tcp</i> | CGT TGG CGG TCA GTC TTG CGG GCT TTC TTC TTG TTC G | 805 | GOEL et al, 2007 |
| Somatic antigen | <i>rfbO1</i> | TCT ATG TGC TGC GAT TGG TG | 638 | GOEL et al, 2007 |
| | | CCC CGA AAA CCT AAT GTC AG | | |
| Outer membrane protein (OMP) | <i>Omp</i> <i>W</i> | CAC CAA GAA GGT GAC TTT ATT GTG | 304 | NANDI et al, 2000 |
| | | GGT TTG TCG AAT TAG CTT CAC C | | |
| Thermostable direct hemolysin (TDH) (Kanagawa hemolysin) | <i>tdh</i> | CCA TCT GTC CCT TTT CCT GCC CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC | 424 | KAYSNER ; DePAULA, 2001 |
| | | CCA TCT GTC CCT TTT CCT GCC CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC | | |
| Thermostable related hemolysin (TRH) | <i>trh</i> | CCA TCT GTC CCT TTT CCT GCC CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC | 500 | KAYSNER ; DePAULA, 2001 |

A confirmação genotípica da patogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus* foi realizada por PCR multiplex, ou seja, através da detecção simultânea dos genes *tdh* (thermostable direct hemolysin) e *trh* (thermostable direct hemolysin-related hemolysin), conforme descrito por Kaysner e DePaula, (2001). A especificidade da PCR foi confirmada pela utilização de uma cepa de referência do banco de cepas da FIOCRUZ. Todos os ensaios foram repetidos por duas vezes.

A extração do DNA foi feita a partir de culturas overnight a 35 ± 2 °C em caldo TSB-2% NaCl. Um mL de cada cultura foi centrifugado em um tubo de microcentrífuga por 3 minutos a $15.000 \times g$, o pellet foi lavado por duas vezes com solução salina 0,9%, e ressuspendido em um mL de água deionizada. Posteriormente foi fervido por 10 minutos e congelado a -20 °C antes de proceder às análises.

As amplificações do DNA foram feitas em termociclador, programado para 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C para a desnaturação do DNA, 1 minuto a 60 °C para anelamento dos iniciadores e 2 minutos a 72 °C, para o alongamento ou síntese de DNA, terminando por uma etapa de 3 minutos a 72 °C para alongamento final das fitas.

Dez microlitros dos produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, no tampão TBE, a 100V e 200mA. O gel foi corado com Brometo de etídio, sendo o DNA visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado em Polaroid.

A confirmação genotípica da patogenicidade das cepas de *Vibrio cholerae* também foi realizada por PCR multiplex, através da detecção simultânea de cinco genes específicos: *ctxAB*, *zot*, *tcp*, *rfbO1*, *ompW*, de acordo com método descrito por Goel et al., (2007).

Para realizar os ensaios da PCR, foram feitas suspensões bacterianas diretamente em água deionizada, as quais foram utilizadas como molde para amplificação. A especificidade da PCR multiplex foi determinada pela utilização de outras bactérias homólogas (*Vibrio parahaemolyticus*).

As amplificações do DNA foram feitas em termociclador, programado para 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C para a desnaturação do DNA, 1 minuto a 59 °C para anelamento dos iniciadores e 2 minutos a 72 °C, para o alongamento ou síntese de DNA. Antes do início do primeiro ciclo, a mistura da reação foi aquecida a 94 °C por 10 minutos, para permitir a desnaturação completa dos moldes e extração do DNA das células bacterianas. Após o último ciclo, a mistura da reação foi submetida a 72 °C por 10 minutos para assegurar a extensão final. Foi

realizada uma reação controle (branco), onde a água deionizada foi colocada no lugar da cultura bacteriana.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, o gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), para revelar os produtos amplificados. Foi utilizado um marcador de peso molecular padrão de 100 pb.

2.3.2. Ensaios fenotípicos

Além dos ensaios genotípicos as cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* foram avaliadas quanto a algumas características fenotípicas.

As cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram avaliadas quanto à produção de urease, em Ágar Uréia de Christensen (Oxoid), e quanto ao fenômeno de Kanagawa em ágar Wagatsuma, através da hemólise total dos eritrócitos humanos, sendo o diferencial deste teste hemolítico, a necessidade de utilizar 5% de sangue humano ou de carneiro fresco. Estes ensaios foram realizados no laboratório de Enterobactérias da FIOCUZ.

As cepas de *Vibrio vulnificus* foram avaliadas quanto a produção de indol e quanto a presença da enzima ornitina descarboxilase, com objetivo de diferenciar os biotipos em 1 ou 2. Também foram avaliadas quanto ao aspecto das colônias em mucóides e não mucóides. As colônias com características mucóides foram consideradas potencialmente patogênicas, visto que esta característica está associada à presença de cápsula, que é um importante fator de virulência de *Vibrio vulnificus*.

2.4. SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Todas as cepas isoladas de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae* foram submetidas a testes de sensibilidade a antibióticos, através do método de difusão de disco, conhecido como Método de Kirby-Bauer, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute no manual CLSI M45 – A2 (CLSI, 2010). Foi utilizado o caldo Miller Hinton para ativação das cepas e ágar Miller Hinton para realizar os antibiogramas.

Para a realização dos testes de susceptibilidade a concentração de cada estirpe foi previamente ajustada a $1,5 \times 10^8$ células por mililitro.

O ajuste de concentração foi realizado a partir da suspensão de cada estirpe em solução salina a 0,85% até ajuste da turvação à escala McFarland 0,5. As suspensões ajustadas foram inoculadas de forma homogênea em toda a placa de ágar Miller Hinton. Os discos de antibióticos (OXOID) foram colocados sobre as placas previamente inoculadas, que foram incubadas a 35 °C (± 2 °C) por 24h. A leitura dos resultados foi feita através da observação do aparecimento de uma zona clara ao redor do disco, indicando a inibição do crescimento do microrganismo. O resultado foi expresso de acordo com o diâmetro do halo de inibição, que classifica a bactéria como Resistente, Intermidiária ou Sensível ao agente antimicrobiano em questão, a partir dos parâmetros descritos no Manual CLSI M45-A2 (CLSI, 2010).

Os agentes antimicrobianos testados foram: Amoxicilina + Clavulanato (AMC) (20/10 µg), Ampicilina (AMP) 10 µg, Gentamicina (GEN) 10 µg, Tetraciclina (TET) 30 µg, Cefazolina (CFZ) 30 µg, Cloranfenicol (CLO) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Cefuroxima (CRX) 30 µg, cefoxitina(CFO) 30 µg, cefotaxima(CTX) 30 µg.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO E TIPIFICAÇÃO SOROLÓGICA DAS CEPAS

Das 120 cepas enviadas a FIOCRUZ para tipificação, 14 não apresentaram crescimento, sendo avaliadas as características das 106 cepas reativadas, 83 (78,3%) foram previamente identificadas como *Vibrio parahaemolyticus*, 20 (18,9%) como *Vibrio vulnificus*, três (2,8%) como *Vibrio cholerae*. Quanto à origem das amostras, 24 (22,6%) cepas foram isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*), e 82 (77,4%) cepas eram provenientes de amostras de água marinha de regiões de cultivo de ostras localizadas na Baía Sul de Santa Catarina (figura 8).

Das 83 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* avaliadas no presente estudo, 43 (51,8%) apresentaram-se rugosas impossibilitando sua caracterização antigênica, destas dez eram provenientes de amostras de ostras e 33 eram provenientes de amostras de águas marinhas. Foram caracterizados 20 sorotipos diferentes, assim distribuídos: O1:K1 (5), O1:K25, O1:K41, O1:K69, O1:KUT, O2:K3 (3), O2:K28 (7), O3:K6 (6), O3:K30, O4:K34, O4:K63, O5:K61, O6:K4 (2), O6:K6 (2), O6:K18

(2), O6:K46, O7:K7, O7:K19 (2), O8:K20, O8:K39, (KUT = não tipável).

Entre estes sorotipos destaca-se O3:K6, isolado primariamente em surto na Índia em 1996, e desde então reconhecido como uma cepa pandêmica em diversas regiões do mundo, incluindo países da América Latina (CABANILLAS-BELTRAN et al. 2006; GIL et al. 2007; SU; LIU, 2007). No Chile, o sorotipo O3:K6 foi predominante em três diferentes surtos de gastroenterite causados por *Vibrio parahaemolyticus*, desde 1998 (HEITMANN et al, 2005). Neste estudo o sorotipo O3:K6 foi o segundo sorotipo mais frequente, identificado em seis cepas, sendo cinco cepas isoladas de amostras de água marinha e uma cepa isolada de amostra de ostras. Das seis cepas com sorotipo O3:K6, quatro apresentavam o gene de patogenicidade *trh*, nenhuma apresentou o gene *tdh* e todas eram urease negativas, diferente do observado por Leal et al (2008), que das 11 cepas identificadas com o sorotipo O3:K6 nenhuma apresentou o gene *trh*, e dez apresentaram o gene *tdh*.

No Brasil o primeiro relato de identificação deste sorotipo ocorreu em 1997, a partir de uma única cepa proveniente de uma amostra de ostras (PEREIRA et al., 2004), em outro estudo avaliando cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de mexilhões comercializados no Rio de Janeiro este sorotipo também foi identificado em uma única cepa (PEREIRA et al., 2007a). Leal et al. (2008), avaliando 18 cepas de isolados clínicos de *Vibrio parahaemolyticus*, no nordeste do Brasil, confirmou a identificação do sorotipo O3:K6 em 10 cepas, sendo sete de um mesmo episódio de doença transmitida por alimentos (DTAs), ocorrido em Fortaleza, no Ceará, no ano de 2002, e três cepas de casos isolados de pacientes com diarreia, sendo dois de Alagoas e um de Pernambuco.

Segundo Magalhães et al. (1991), os sorotipos mais comumente identificados no Brasil, nas últimas décadas foram O2:K28, O3:K5, O10:K52, O5:K17 e O4:K12. Destes o único sorotipo isolado neste estudo foi o O2:K28, o qual foi o sorotipo mais frequente neste estudo, sendo identificado em sete cepas, este sorotipo também foi confirmados em outros estudos realizados no Brasil (PEREIRA et al., 2004; 2007b). O sorotipo O1:KUT, juntamente com os sorotipos O3:K6 e O4:K68, foram responsáveis por infecção pandêmica causada por *Vibrio parahaemolyticus* nos Estados Unidos (CHOWDHURY et al., 2000).

3.2. PATOGENICIDADE

3.2.1. Ensaios genotípicos

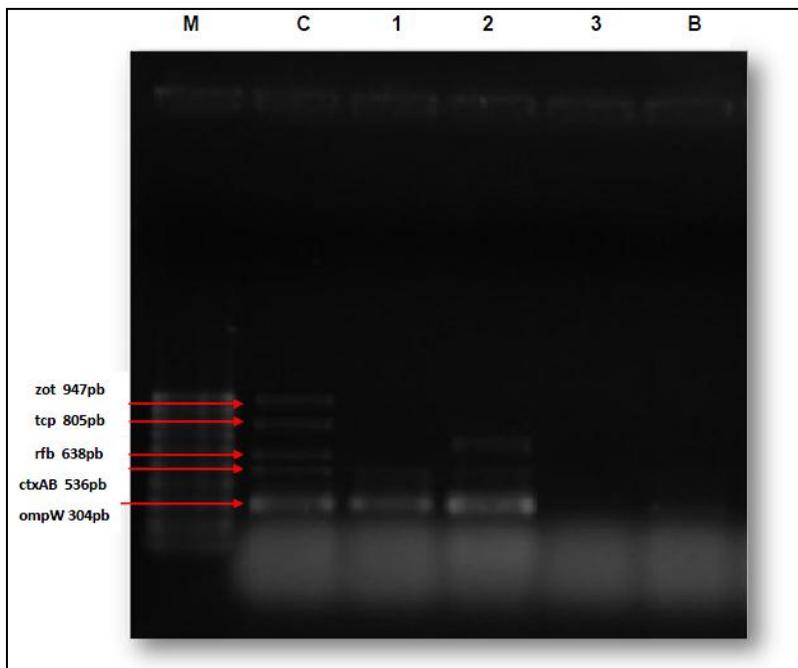
Das 83 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* avaliadas neste estudo, 31 (37,3%) cepas foram positivas para o gene *trh*, e quatro (4,8%) cepas foram positivas para o gene *tdh*, das cepas *trh* positivas, nove eram provenientes de amostras de ostras, e 22 eram provenientes de amostras de água marinha, das cepas *tdh* positivas apenas uma era proveniente de uma amostra de ostras.

Estes resultados diferem dos resultados observados por Costa Sobrinho et al. (2011), que não observaram a presença dos genes *tdh* e *trh* em nenhum dos 1943 isolados de *Vibrio parahaemolyticus* provenientes de amostras de ostras comercializadas em São Paulo, na região sudeste do Brasil, enquanto Rojas et al. (2011), avaliando 23 cepas isoladas de moluscos bivalves também em São Paulo, observaram duas (10,5%) cepas de *Vibrio parahaemolyticus* positivas para o gene *tdh*, e nenhuma cepa positiva para o gene *trh*. Vieira et al (2011) avaliando ostras frescas comercializadas em Fortaleza, na região nordeste do Brasil, observaram duas (11,8%) de 17 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* positivas para os genes *tdh* e *trh*.

Os genes *tdh* e *trh* ocorreram simultaneamente em uma (4,3%) amostra de ostras e em três (5%) amostras de água marinha. A maior incidência de cepas contendo o gene *trh* do que cepas de contendo o gene *tdh*, através do método de PCR está de acordo com os resultados descritos por outros autores, em diferentes partes do mundo, como na Índia (DEEPANJALI et al., 2005) e nos Estados Unidos (PARVEEN et al., 2008).

Das três cepas de *Vibrio cholerae* analisadas, duas foram positivas para os genes *ctxAB* e *ompW*, sendo uma destas positiva também para o gene *rfb*, e a terceira cepa foi negativa para todos os genes de patogenicidade avaliados, todas foram isoladas de amostras de água marinha (figura 9). A presença do gene *ctx* é essencial para causar cólera, no entanto apenas cepas de *Vibrio cholerae* O1 e O139 contendo este gene são capazes de causar epidemias (GOEL et al., 2007). Neste estudo devido à característica antigênica rugosa das cepas de *Vibrio cholerae*, não foi possível estabelecer o sorotipo das cepas.

Figura 9 - Foto gel de agarose PCR multiplex *Vibrio cholerae*



M - marcador PM 100 pb; C - *V.cholerae* controle positivo genes *zot*, *tcp*, *rfb*, *ctxAB*, *ompW*; B - controle negativo; 1 - *V. cholerae* não O1 não O139, positivo gene *ctxAB* e *ompW*; 2 - *V. cholerae* positivo gene *ctxAB*, *ompW* e *rfb*; 3 - *V. cholerae* negativo para genes de patogenicidade.

Segundo Nandi et al., (2000), a detecção simultânea dos genes *ctx* e *ompW*, que é um gene que codifica uma proteína de membrana externa, espécie-específico para *Vibrio cholerae*, podem caracterizar cepas toxigênicas de *Vibrio cholerae*. A presença do gene *rfbO1* em uma das cepas sugere que esta cepa seja do subgrupo O1 (KUMAR et al, 2009). Brazil et al. (2002), avaliando a presença de genes de patogenicidade em 58 isolados ambientais de *Vibrio cholerae* O1, provenientes de diferentes regiões do Brasil, observaram que 100% das cepas continham no mínimo um gene do elemento CTX.

3.2.2. Ensaios fenotípicos

Apenas uma das 83 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (isoladas de amostras de ostras e águas marinhas) foi urease positiva, mas nenhuma das cepas produziram beta hemólise em ágar Wagatsuma. A única cepa urease positiva, também apresentou o gene *trh*, resultado já observado por outros autores (SUTHIENKUL et al., 1995; VIEIRA et al., 2011). De acordo com estes autores a positividade para urease é por si só um fator de virulência, devido a esta forte correlação que tem sido observada entre a presença do gene *trh* e a produção de urease.

Todas as 20 cepas de *Vibrio vulnificus* avaliadas quando a capacidade de produção de indol foram positivas neste teste, tanto aquelas isoladas de águas salinas, quanto às isoladas de ostras. Enquanto em relação a presença da enzima ornitina descarboxilase foi observada uma grande variabilidade, visto as duas cepas isoladas de ostras foram positivas para esta enzima, podendo, desta forma sugerir que são pertencentes ao biotipo 1, e nove de 18 cepas isoladas de amostras de água foram positivas para esta enzima, podendo também ser enquadradas no biotipo 1, enquanto as outras nove cepas (isoladas de água), foram negativas para esta enzima, e portanto, precisam de testes adicionais para classificação do biotipo.

Em estudo realizado na Dinamarca, avaliando a presença de diferentes biotipos de *Vibrio vulnificus* em ambiente marinho, foi verificada a presença de apenas duas cepas do biotipo 2 em 325 cepas de *Vibrio vulnificus* isoladas de águas salinas (HOI, 1998). Contudo, pode-se afirmar que o biotipo 1 apresentou uma maior prevalência neste estudo, o qual é associado quase que exclusivamente a doenças humanas, sendo este o biotipo de maior preocupação (OLIVER, 2005). Cepas do biotipo 1 podem ser isoladas de diferentes fontes ambientais, enquanto as cepas do biotipo 2 são raramente encontradas no ambiente (HØI, 1998).

Através da avaliação do aspecto das colônias de *Vibrio vulnificus* foi possível classificá-las em mucóides e não mucóides, as duas (100%) cepas isoladas de amostras de ostras tinham característica mucóide, o que foi observado com menor frequência nas cepas isoladas de amostras de água marinha, onde 14 (77,8%) cepas apresentaram característica mucóide. Desta forma, é possível estabelecer que 80% (16/20) das cepas de *Vibrio vulnificus* avaliadas foram classificadas como presuntivamente patogênicas. Segundo Drake et al. (2007), a presença da cápsula, que está relacionada a opacidade da colônia

(mucóide), é provavelmente o melhor fator de virulência conhecido.

3.3. SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Para avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos foram utilizadas as 120 cepas de *Vibrio* isoladas de ostras e águas marinhas frente a dez diferentes antimicrobianos recomendados pelo CLSI especificamente para vibrios (CLSI, 2010).

Os resultados dos testes de sensibilidade pelo método de difusão em disco para as diferentes espécies de *Vibrio* sp. são apresentados na tabela 7. A resistência à gentamicina e cefuroxima foi observada em 84,3% das cepas testadas para ambos antibióticos, sendo que para resistência a gentamicina foi observada uma maior frequência para *Vibrio cholerae*, seguido de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, enquanto para resistência à cefuroxima foi observada uma maior frequência para *Vibrio parahaemolyticus* seguido de *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*.

Segundo CLSI (2010), a gentamicina, assim com a cefuroxima deve ser considerada apenas no tratamento de infecção por outros vibrios que não o *Vibrio cholerae*. Daramola et al. (2009), também observaram uma frequência elevada de resistência a gentamicina, atingindo 67,1% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas neste estudo, no norte da Inglaterra.

Tabela 8 - Resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos de 120 diferentes cepas de *Vibrio* spp. pelo método de difusão em disco.

| ANTIMICROBIANO | Percentual de cepas resistentes, intermediárias e sensíveis (n= número de cepas testadas) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|-------------------------------------|------|------|-------------------------------|------|------|----------------------------|------|------|
| | <i>Vibrio</i> spp. (n = 120) | | | <i>V. parahaemolyticus</i> (n = 86) | | | <i>V. vulnificus</i> (n = 31) | | | <i>V. cholerae</i> (n = 3) | | |
| | % R | % I | % S | % R | % I | % S | % R | % I | % S | % R | % I | % S |
| PENICILINAS E COMBINAÇÕES β-LACTÂMICO/INIBIDOR DA β-LACTAMASE | | | | | | | | | | | | |
| Ampicilina (AMP) | 81,0 | 5,0 | 14,0 | 88,5 | 3,5 | 8,0 | 58,0 | 6,5 | 32,5 | 66,5 | 33,5 | 0,0 |
| Amoxicilina + Clavulanato (AMC) | 38,0 | 32,2 | 29,8 | 44,8 | 35,6 | 19,5 | 16,1 | 22,6 | 61,3 | 0,0 | 33,3 | 66,7 |
| CEFENS | | | | | | | | | | | | |
| Cefazolina (CFZ) | 78,5 | 3,3 | 18,2 | 87,0 | 3,5 | 9,5 | 58,0 | 0,0 | 42,0 | 66,5 | 33,5 | 0,0 |
| Cefotaxima (CTX) | 26,0 | 55,5 | 18,5 | 27,6 | 62,1 | 10,3 | 23,5 | 40,0 | 36,5 | 0,0 | 33,5 | 66,5 |
| Cefoxitina (CFO) | 70,3 | 18,2 | 11,5 | 78,2 | 17,2 | 4,6 | 53,3 | 16,7 | 30,0 | 33,3 | 66,7 | 0,0 |
| Cefuroxima (CRX) | 84,3 | 6,6 | 9,1 | 93,2 | 3,4 | 3,4 | 61,3 | 12,9 | 25,8 | 66,7 | 33,3 | 0,0 |

R: resistente; I: intermediário; S: sensível;

Tabela 9 – Continuação.

| ANTIMICROBIANO | Percentual de cepas resistentes, intermediárias e sensíveis (n= número de cepas testadas) | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|-------------------------------------|------|------|-------------------------------|------|------|----------------------------|-------|------|
| | <i>Vibrio</i> spp. (n = 120) | | | <i>V. parahaemolyticus</i> (n = 86) | | | <i>V. vulnificus</i> (n = 31) | | | <i>V. cholerae</i> (n = 3) | | |
| | % R | % I | % S | % R | % I | % S | % R | % I | % S | % R | % I | % S |
| AMINOGLICOSÍDEOS | | | | | | | | | | | | |
| Gentamicina (GEN) | 84,0 | 7,5 | 8,5 | 92,0 | 4,5 | 3,5 | 61,5 | 16,0 | 22,5 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| TETRACICLINAS | | | | | | | | | | | | |
| Tetraciclina (TET) | 37,5 | 30,0 | 32,5 | 46,5 | 32,5 | 21,0 | 13,5 | 20,0 | 66,5 | 0,0 | 66,5 | 33,5 |
| QUINOLONAS | | | | | | | | | | | | |
| Ciprofloxacina (CIP) | 59,0 | 23,5 | 17,5 | 73,0 | 13,0 | 14,0 | 26,0 | 45,0 | 30,0 | 33,5 | 66,5 | 0,0 |
| FENICÓIS | | | | | | | | | | | | |
| Cloranfenicol (CLO) | 0,8 | 37,5 | 61,7 | 0,0 | 40,7 | 59,3 | 3,2 | 19,4 | 77,4 | 0,0 | 100,0 | 0,0 |

R: resistente; I: intermediário; S: sensível;

Também foi observada uma elevada frequência na resistência a ampicilina neste estudo, atingindo 80,0% das cepas de *Vibrio* spp. e um percentual ainda maior para *Vibrio parahaemolyticus* (88,5%), resultados estes que estão de acordo com os resultados observados na Índia por Vaseeharam et al. (2005), onde 100% das cepas de *Vibrio* spp. foram resistentes a ampicilina, na Itália por Ferrini et al. (2008), com resistência a ampicilina em 82% das cepas de *Vibrio* testadas, e quando considerado apenas *Vibrio parahaemolyticus*, a resistência a ampicilina foi observada em 81% das cepas, da mesma forma, na China, Chao et al. (2009), observaram uma resistência de 66,7% dos isolados de *Vibrio parahaemolyticus* a ampicilina, percentual muito próximo ao valor observado na Índia por Bhattacharya et al (2000), avaliando cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de camarão, que observaram uma resistência a ampicilina de cerca 63% das cepas, e Roque et al. (2001), avaliando cepas de vibrios isoladas de camarões no México, que observaram 68% dos isolados resistentes a ampicilina.

Em outro estudo realizado no Brasil, avaliando a susceptibilidade de cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, isoladas de moluscos bivalves, a diferentes antibióticos (ROJAS et al, 2011), também foi observado uma resistência a ampicilina em 93,65% das cepas avaliadas. Estes resultados são bem diferentes dos observados por Damarola et al (2009) na Inglaterra, avaliando a susceptibilidade de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* de origem ambiental a diferentes antibióticos, onde 98,7% das cepas foram sensíveis a ampicilina. Segundo Han et al. (2007), a reduzida susceptibilidade de *Vibrio parahaemolyticus* a ampicilina sugere que este antibiótico apresenta uma eficiência potencialmente baixa no tratamento empírico de infecções por este microrganismo.

O cloranfenicol foi o antibiótico ao qual as cepas de *Vibrio* spp. foram mais sensíveis, no entanto esta sensibilidade ao cloranfenicol foi observada com maior frequência apenas para *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus*, pois as três cepas de *Vibrio cholerae* avaliadas apresentaram uma resistência intermediária a este antibiótico. Estes resultados estão de acordo com os resultados observados por Daramola et al., (2009) e Chao et al. (2009), onde 100% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram sensíveis ao cloranfenicol, Ferrini et al. (2008), com 97% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* sensíveis ao cloranfenicol, Ottaviani et al. (2001), com 100% das cepas de *Vibrio* spp., incluindo *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* sensíveis ao cloranfenicol.

Heidemann et al. (2005) observaram 100% (99/99) das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* sensíveis tanto ao cloranfenicol como a ceftriaxona, seguido da tetraciclina, com 99% das cepas sensíveis. Em outros dois estudos, avaliando a resistência de cepas de *Vibrio cholerae* ao cloranfenicol, foi possível observar que menos de 10% das cepas avaliadas apresentavam resistência a este antibiótico (JAGADEESHAN et al., 2009; KINGSTON et al., 2009). Hofer et al. (1999), avaliando duas cepas de *Vibrio cholerae* isoladas no Ceará, Brasil, uma do subgrupo O:1, biotipo El Tor, e sorovar Inaba, e outra não O:1, ambas foram sensíveis ao cloranfenicol.

A tetraciclina foi o segundo antibiótico ao qual as cepas de *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* foram mais sensíveis, diferente do observado para *Vibrio cholerae* que apresentaram maior sensibilidade a Amoxicilina + clavulanato. Daramola et al. (2009), observaram a sensibilidade a tetraciclina em 80% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* avaliadas, enquanto Chao et al. (2009), observaram sensibilidade a tetraciclina em 100% das 120 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* analisadas.

Ferrini et al. (2008), encontraram apenas 3% de todas as cepas de *Vibrio* spp. testadas resistentes a tetraciclina. E Ottaviani et al. (2001), observaram 100% e 93,8% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* sensíveis a tetraciclina e cefotaxima, respectivamente.

Kingston et al. (2009), avaliando a susceptibilidade de cepas de *Vibrio cholerae* isoladas de surtos de cólera na Índia a diferentes antimicrobianos, observaram que todas as 51 cepas foram sensíveis a tetraciclina, enquanto neste estudo, das três cepas avaliadas, apenas uma foi sensível, as outras duas apresentaram uma resistência intermediária. Jagadeeshan et al. (2009), avaliando 36 cepas de *Vibrio cholerae* isolados na Índia, observaram resistência a cefotaxima e tetraciclina em 50% e 41,6% das cepas avaliadas, respectivamente. De acordo com Han et al. (2007), a primeira linha de drogas, incluindo tetraciclina e cefotaxima, manteve-se altamente efetivo sobre *Vibrio* spp., no entanto ao contrário do recomendado pelo CDC (2005), a ampicilina não deveria ser usada empiricamente no tratamento de infecções por *Vibrio parahaemolyticus*, visto a elevada resistência deste microrganismo a este antibiótico.

Das 120 cepas avaliadas, nenhuma das cepas foi resistente a todos os antibióticos testados, sendo que 20 (16,7%) cepas foram resistentes a nove dos dez antibióticos testados, destas 11 (9,2%) cepas

de *Vibrio parahaemolyticus* apresentaram uma resistência intermediária ao cloranfenicol e sete (5,8%) cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e duas (1,7%) cepas de *Vibrio vulnificus* foram sensíveis ao cloranfenicol.

Seis (5%) cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e duas (1,7%) de *Vibrio vulnificus* foram resistentes a oito dos 10 antibióticos testados, e seis (5%) cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram resistentes a sete dos dez antibióticos testados. Apenas uma (0,8%) cepa de *Vibrio parahaemolyticus* e uma (0,8%) cepa de *Vibrio vulnificus* foram sensíveis a todos os antibióticos testados, e duas (1,7%) cepas de *Vibrio vulnificus* foram resistentes a apenas um antibiótico. Duas (1,7%) cepas de *Vibrio vulnificus* não apresentaram resistência a nenhum antibiótico, sendo sensível a maioria deles, e apresentando resistência intermediária a alguns.

Das quatro cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que apresentavam a gene de patogenicidade *tdh*, três (75%) foram sensíveis ao cloranfenicol e duas (50%) foram resistentes a tetraciclina, que foram os antibióticos que apresentaram os melhores desempenhos para esta espécie de vibrio, considerando todas as cepas de *Vibrio parahaemolyticus* do estudo.

4. CONCLUSÕES

A confirmação genotípica de genes de patogenicidade de algumas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*, assim como a confirmação de sorotipos de *Vibrio parahaemolyticus* considerados de importância em diferentes episódios de surtos de doenças de origem alimentar, e a presença de característica fenotípica de patogenicidade de *Vibrio vulnificus* deve servir de subsídio para estudo de análise de risco destes microrganismos em ostras na região Sul do Brasil. O perfil de susceptibilidade e resistência a antibióticos está de acordo com os resultados observados em diferentes estudos. Embora no Brasil, o cultivo e consumo de moluscos bivalves ainda possa ser considerado uma atividade econômica recente, o desenvolvimento da atividade, e abertura do mercado internacional está diretamente ligado a garantia da qualidade do produto.

O isolamento e identificação de cepas de vibrios potencialmente patogênicas ao homem, deve servir de alerta as autoridades sanitárias no desenvolvimento de medidas de controle, legislação adequada e medidas educativas para que os consumidores de ostras possam vir a minimizar os riscos, através de medidas simples, como evitando o consumo de moluscos bivalves crus ou parcialmente cozidos, diminuindo assim o

risco de uma infecção alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, M. J. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, p. 2345-2349, 1994.

BHATTACHARYA, M.; CHOUDHURY, P.; KUMAR, R. Antibiotic- and Metal-Resistant Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Shrimps. **Microbial Drug Resistance.**, v. 6, n. 2, p. 171-172, 2000.

BRAZIL et al. Prevalence of virulence-associated genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 1999. **FEMS Microbiology Letters**, v. 215, p.15–21, 2002.

CABANILLAS-BELTRÁN, H. et al. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. **FEMS microbiology letters**, v. 265, p. 76–80, 2006.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental microbiology**, v. 8; p.1137-1144, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). 25 October 2005, posting date. *Vibrio vulnificus*. Disease listing. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibriovulnificus_g.htm. Acesso em 14/08/2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2006. **Morbidity And Mortality Weekly Report**, v. 56, p.336-339, 2007.

CHAO, G. et al. Serodiversity, pandemic O3:K6 clone, molecular typing, and antibiotic susceptibility of foodborne and clinical *Vibrio*

parahaemolyticus Isolates in Jiangsu, China. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.6, n. 8, p.1021-1028, 2009.

CHOWDHURY, N. R. et al. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. **Emerging infectious diseases**, v. 6, p. 631–636, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline. 2.** ed. CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.

COSTA SOBRINHO, O. S. et al. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p.137–140, 2011.

DARAMOLA, B.A; WILLIAMS, R.; DIXON R. In vitro antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources in Northern England. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 5, p. 499-500, 2009.

DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.; KARUNASAGAR, I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.3575–3580, 2005.

DEPAOLA, A. et al. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2299–2302, 1990.

DRAKE, S. L., DEPAOLA, A., JAYKUS, L. A. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 6, p.120 -144, 2007.

FERRINI, A. M. et al. Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. **Food Analytical Methods**, v.1, n. 3, p.164-170, 2008.

GIL, A.I. et al. O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru.

International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases, v. 11, p. 324–328, 2007.

GOEL, A. K. et al. Single multiplex polymerase chain reaction environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and Non- O1 *Vibrio cholerae*. **Folia microbiologica**, v. 52, n. 1, p. 81-85, 2007.

HAN, F. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. **Applied and environmental microbiology**, v.73, n. 21, p.7096–7098, 2007.

HEITMANN, I. G. et al. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectología**, v. 22, n. 2, p. 131-140, 2005.

HOFER, E. et al. Emergência da múltipla resistência a antimicrobianos em *Vibrio cholerae* isolados de pacientes com gastroenterite no Ceará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n.2, p. 151-156, 1999.

HØI, L. et al. Occurrence of *Vibrio vulnificus* Biotypes in Danish Marine Environments. **Applied and environmental microbiology**, v.64, p.7-13, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities**. 2. ed. , New York: Springer, 2005.

JAGADEESHAN, S. et al. Multiresistant *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 from waters in South India: resistance patterns and virulence-associated gene profiles. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 538–544, 2009.

KAPER, J. B.; MORRIS JR., J. G.; LEVINE, M. M. Cholera. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p. 48-86, 1995.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, JR. A. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp. in US Food and

Drug Administration/ Center for Food Safety & Applied Nutrition (US FDA/CFSAN). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 9, revisad May 2004. Disponível em: <[http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)> Acesso em 10/07/2008.

KINGSTON, J. J. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Vibrio cholerae* from cholera outbreaks in Chennai. 84 **Indian Journal of Microbiology** v. 49, p.84–88, 2009.

KUMAR, P. et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 234–238, 2009.

LEAL, N. C. et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n.3, p.691-697, 2008.

MAGALHÃES, V. et al. Human gastroenteritis associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 64–68, 1991.

NANDI et al. Rapid Method for Species-Specific Identification of *Vibrio cholerae* Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein OmpW. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4145-4151, 2000.

NASCIMENTO, S. M. M.; VIEIRA, R. H. S. F.; THEOPHILO, G. N. D. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 263-266, 2001.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In: BELKIN, S. and COLWELL, R. R. **Oceans and health: Pathogens in the Marine Environment**. 1. ed. Springer, 2005, p. 253-275.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (ed.), **The biology of vibrios**. 1. ed. Washington : Amer Society For Microbiology, 2006. p. 49-66.

OTTAVIANI, D. et al. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 135-140, 2001.

PARVEEN, S. et al. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. **International Journal Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p.354-361, 2008.

PEREIRA, C. S. et al. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 56-59, 2007.

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

_____. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, n. 4, p. 591-595, 2004.

RISTORI, C.A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal Environmental Health Research** v. 17, n. 4, p. 259-269, 2007.

ROJAS, M. V. R. et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 4, p. 201-205, 2011.

ROQUE, A. et al. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 17. p. 383-387, 2001.

SUTHIENKUL O. et al. Urease production correlates with possession of the trh gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. **Journal Infection Disease**, v. 172, p. 1405–1408, 1995.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **Food microbiology**. v. 24, p. 549-558, 2007.

VASEEHARAN, B. et al. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 285–291, 2005.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. Kanagawa-Negative, tdh- and trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. **Current Microbiology**, v. 63, p. 126-130, 2011.

CAPÍTULO IV

Depuração de ostras (*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* com luz UV e água marinha clorada

Artigo aceito para publicação no Journal of Food Protection em 07/03/2012.

RESUMO

A proposta do presente estudo foi avaliar a eficácia da depuração de ostras (*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* usando luz ultravioleta (UV) isoladamente e efeito sinérgico com cloro. As ostras foram contaminadas com um coquetel de cinco cepas de *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus* ao nível de 10^4 a 10^5 UFC mL⁻¹ de bioacumulação. A depuração foi realizada num sistema fechado, em que 350 L de água do mar foi recirculada durante 48 h. As contagens de *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* foram realizadas no tempo zero, 6, 18, 24 e 48 h. Três tratamentos foram realizados: T1 (controle), T2 (luz UV) e T3 (luz UV mais cloro). Após 48 h de depuração de *V. parahaemolyticus*, T3 reduziu 3,1 log NMP g⁻¹ e T2 reduziu 2,4 log NMP g⁻¹, enquanto T1 reduziu apenas 2,0 log NMP g⁻¹. Após 48 h de depuração de *V. vulnificus*, tanto T2, como T3 foram eficientes na redução das contagens, reduzindo a população em 2,5 e 2,4 log NMP g⁻¹, respectivamente, enquanto que T1 reduziu apenas 1,4 log NMP g⁻¹. O tratamento utilizando Luz UV mais cloro foi mais eficiente para controlar *V. parahaemolyticus* em ostras. Tanto o tratamento utilizando luz UV, como o tratamento utilizando luz UV mais cloro foram eficientes para reduzir as contagens de *V. vulnificus*. O presente estudo é o primeiro relato mostrando a eficácia dos sistemas de depuração para a descontaminação de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em ostras cultivadas na costa brasileira. Este estudo fornece informações que podem contribuir no controle e prevenção de tais microrganismos em ostras, para que, no futuro, possa ser usado como um efetivo tratamento pós-colheita, tanto por restaurantes, quanto por pequenos produtores de ostras na costa do Brasil.

Palavras-chave: Ostras cruas. Alimento seguro. Molusco bivalve. Tratamento pós-colheita. *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio vulnificus*.

ABSTRACT

The efficacy of depuration using UV light and chlorinated seawater for decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in oysters was investigated. Oysters were contaminated with five-strain cocktail of *V. parahaemolyticus* or *V. vulnificus* to level of 10^4 to 10^5 CFU mL⁻¹, for bioaccumulation. The depuration was conducted in a closed system, in which 350 L of seawater was recirculated for 48 h. Counts of *Vibrio parahaemolyticus* or *Vibrio vulnificus* were determined at zero, 6, 18, 24 and 48 h. Three treatments were conducted: T1 (control treatment); T2 (UV treatment); and T3 (UV plus chlorine treatment). After 48 h of depuration of *Vibrio parahaemolyticus*, T3 reduced 3.1 log MPN g⁻¹ and T2 reduced 2.4 log MPN g⁻¹, while T1 reduced only 2.0 log MPN g⁻¹. After 48 h of depuration of *Vibrio vulnificus*, T2 as well as T3 were efficient reducing counts in 2.5 and 2.4 log MPN g⁻¹, respectively; while T1 reduced only 1.4 log MPN g⁻¹. UV light plus chlorine treatment was more efficient for controlling *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. Both UV light and UV light plus chlorine were efficient for *Vibrio vulnificus*. The present study is the first report showing the efficacy of depuration systems for decontaminating *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in oysters cultivated in Brazilian coast. This study provides information that can contribute in controlling and preventing such microorganisms in oysters, for the future can be used as an effective postharvest treatment, by restaurants and small producers of oysters on the coast of Brazil.

Key words: Raw oysters. Food safety. Shellfish. Post harvest. *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio vulnificus*.

1. INTRODUÇÃO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor de moluscos bivalves do Brasil, devido as excelentes condições geográficas para o cultivo de organismos marinhos, especialmente o cultivo de moluscos bivalves, como ostras da espécie *Crassostrea gigas* (CORREA et al., 2007, SOUZA FILHO et al., 2003). A ostra *Crassostrea gigas* ocorre naturalmente no litoral do Japão, China e Coréia (IMAI, 1982) e, embora seja considerada uma espécie exótica no Brasil, o cultivo desta espécie tem aumentado consideravelmente na última década devido ao rápido crescimento da espécie, as suas características zootécnicas e a boa aceitação no mercado.

Os moluscos bivalves são organismos filtradores e podem acumular microrganismos, incluindo patógenos, provenientes das águas marinhas (COOK, 1991; MAFFEI et al., 2009; SOLIC et al., 1999). De fato, eles podem concentrar um número elevado de bactérias (MAFFEI et al., 2009; SOLIC et al., 1999). O tipo e número de microrganismos presente na água dependem de fatores climáticos, sazonais e antropogênicos.

Vibrio parahaemolyticus e *Vibrio vulnificus* são patógenos humanos que ocorrem naturalmente no ambiente marinho em todo o mundo (LEE et al., 2001; RISTORI et al., 2007). Enquanto *Vibrio parahaemolyticus* pode causar gastroenterite aguda (CHAE et al., 2009; LEVINE; GRIFFIN, 1993; SU; LIU, 2007), *Vibrio vulnificus* é capaz de causar gastroenterite, infecções de pele e septicemia fatal em pessoas imunodeprimidos (CDC, 2005; OLIVER, 2006). Estes patógenos são frequentemente isolados de alimentos de origem marinha crus, especialmente ostras e são as principais causas de diarreias bacterianas devido ao consumo de alimentos crus de origem marinha nos Estados Unidos, China e Japão (SU; LIU, 2007; WANG et al., 2010, WANG et al., 2007). No Brasil as informações sobre doenças transmitidas por alimentos (DTAs) causadas pelo consumo de alimentos marinhos consumidos crus não estão disponíveis no sistema de saúde.

O consumo de ostras cruas contaminadas com *V. parahaemolyticus* pode levar ao desenvolvimento de gastroenterite aguda (LEVINE; GRIFFIN, 1993; SU; LIU, 2007; CHAE et al., 2009), enquanto a infecção causada devido ao consumo de ostras contaminadas por *V. vulnificus* pode provocar um grave doença (septicemia) em pessoas imunodeprimidas (CDC 2005).

Diversos processos pós-colheita, incluindo pasteurização a baixas temperaturas, processamento de alta pressão, e irradiação têm

sido desenvolvidos para reduzir vibrios em ostras (ANDREWS, 2004). No entanto, estes processos requerem um investimento econômico inicial ou custo operacional significativo, e as ostras frequentemente morrem durante o processamento (CHAE et al., 2009).

Depuração é um processo de purificação controlado onde os moluscos bivalves são colocados em um tanque com água marinha desinfetada, em sistema de fluxo contínuo ou em sistema fechado com recirculação da água, em condições que permitam a atividade de filtração pelos moluscos, geralmente, durante 24 a 48 horas, os desinfetantes comumente usados na água de depuração são cloro, ozônio, e luz ultravioleta (DRAKE et al., 2007). Enquanto a depuração ainda não é uma prática estabelecida no Brasil, ela é usada em muitos outros países, como nos países europeus e também nos Estados Unidos de acordo com a classificação das áreas de cultivo, que é feita com base nos níveis de coliformes fecais em amostras de água marinha (CORRÊA et al., 2007).

A proposta do presente estudo foi avaliar a eficácia da depuração de ostras (*Crassostrea gigas*) contaminadas com *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* usando luz ultravioleta (UV) isoladamente e efeito sinérgico com cloro, controlando simultaneamente parâmetros físico-químicos da água de depuração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PREPARAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS

Foram utilizadas cinco cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que apresentavam genes específicos de patogenicidade *tdh* e/ou *trh* (IOC 20131, IOC 20136, IOC 20138, IOC 20142 e IOC 20141) e cinco cepas de *Vibrio vulnificus* (IOC 20126, IOC 20132, IOC 20145, IOC 20168 e IOC 20169). Estas cepas foram previamente isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas no estado de Santa Catarina, na região Sul do Brasil, entre outubro de 2008 e março de 2009. Cada cultura foi inoculada individualmente em 10 ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB-salt, Oxoid) suplementado com 1,5% de NaCl e incubada por 18 a 24h a 35 °C (± 2 °C). Os caldos com crescimento foram inoculados em placas de Tryptic Soy Agar (TSA-salt, Oxoid) suplementado com 1,5% de NaCl e incubadas por 18 a 24h a 35 °C (± 2 °C).

Uma única colônia de cada cultura foi repicada para um tubo de

10 ml de TSB-salt e foi incubado a 35 °C (± 2 °C) por 4h. As culturas de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* foram transferidas para um tubo estéril de centrifuga e centrifugados a 3000 x g por 15 minutos (HT-MCD-2000). O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso em 50 ml de solução salina (1%) para produzir um coquetel de cultura de aproximadamente 10^8 UFC ml⁻¹ de acordo com a escala padrão de McFarland (bioMérieux).

2.2. PREPARAÇÃO DAS OSTRAS

Foram coletadas ostras do pacífico (*Crassostrea gigas*) cultivadas na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina no sul do Brasil entre outubro de 2010 e abril de 2011, as ostras eram provenientes da mesma matriz, e apresentavam um tamanho médio de 10 cm. Foram coletadas diretamente na área de cultivo no primeiro dia de cada experimento e imediatamente transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado na Barra da Lagoa em Florianópolis, no estado de Santa Catarina. As ostras foram lavadas em água corrente para remover a lama das conchas e colocadas sobre cestas de plástico perfuradas, que ficaram suspensas a 90 mm acima do fundo do tanque. As 120 foram submetidas a um período de adaptação de 6 h em um tanque contendo 240 litros de água filtrada e esterilizada com luz UV. A salinidade ($35,0 \pm 1,0$), temperatura ($22,5 \pm 3,0$ °C), e saturação de oxigênio ($6,5 \pm 0,5$ mg L⁻¹) foram controladas (YSI-550A).

2.3. CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS OSTRAS

Após o período de seis horas de adaptação, a água marinha do tanque foi contaminada com o coquetel de *Vibrio parahaemolyticus* a uma concentração final de 10^4 a 10^5 UFC mL⁻¹. O mesmo experimento foi repetido usando o coquetel de *Vibrio vulnificus*. Foi mantida a aeração do tanque, com objetivo de manter os níveis de oxigênio dissolvido favoráveis na manutenção da filtração da água e captação dos vibrios pelas ostras por um período de 18 h.

Após este período, as ostras foram removidas do tanque, as conchas foram lavadas em água potável com 0,5% de cloro. As populações de *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* nas ostras foram analisadas pela técnica do número mais provável (NMP) utilizando três séries de tubos múltiplos (KAYSNER; DEPAOLA,

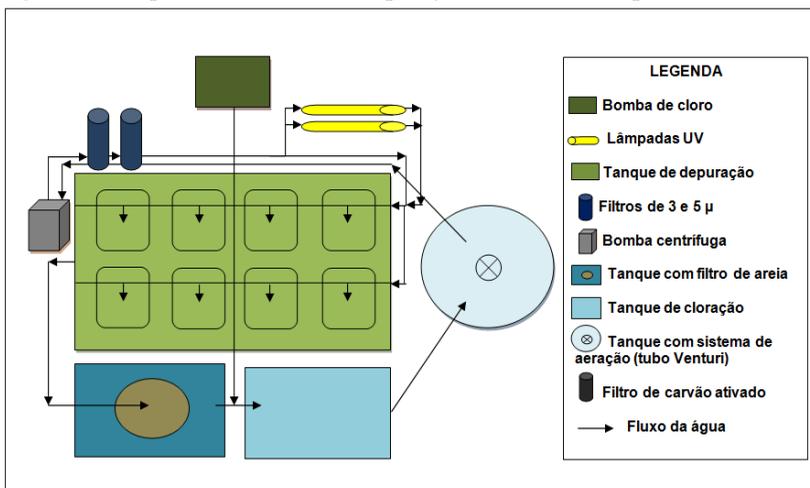
2001). Foram analisadas três amostras formadas por um *pool* de seis ostras cada, antes e após a contaminação. Um lote contendo 30 ostras foi coletado antes da contaminação para serem utilizadas como amostras controle.

2.4. DEPURAÇÃO DAS OSTRAS

Todas as 120 ostras, 90 ostras contaminadas mais as 30 ostras não contaminadas, foram colocadas no tanque de depuração contendo 350 L de água marinha filtrada e esterilizada com luz UV a temperatura ambiente. As ostras foram colocadas em cestas de plástico perfuradas, que ficaram suspensas a 90 mm acima do fundo do tanque, para minimizar a recontaminação. As amostras controle foram marcadas e misturadas com as amostras contaminadas nas cestas.

O sistema completo era composto por: tanque de depuração, bomba centrífuga, filtro de areia, tanque de cloração, sistema de aeriação (Venturi tube), filtros de polipropileno 3 e 5 μ (3M do Brasil), filtro de carvão ativado, bomba de cloro (Exxata mod EX00504) e sistema de lâmpadas UV (QUIMIS, mod Q884-23), o esquema do sistema é apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Esquema do sistema de depuração utilizado nos experimentos



A depuração foi conduzida com três diferentes tratamentos, incluindo um tratamento controle, como segue: T1, apenas filtros, sem

luz UV e sem cloro - tratamento controle; T2, com luz UV (2 lâmpadas de 16 W com uma vazão de 3,8 L/min ligadas em paralelo) e sem cloro; T3, com luz UV e cloro (solução hipoclorito de sódio com uma concentração final de 1-2 ppm). A depuração foi desenvolvida em sistema fechado, com recirculação de água a uma taxa de 7 Lmin⁻¹, em escala de experimento piloto.

As populações de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* das amostras de ostras e da água marinha de recirculação foram analisadas com zero, 6, 18, 24 e 48 h de depuração. Cada amostra de ostras foi colocada em um saco estéril, enquanto as amostras de água foram colocadas em garrafas estéreis de polipropileno com tampa de rosca com capacidade para 1 litro, e foram transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para manter a temperatura inferior a 10 °C.

A taxa de retenção de *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* nos diferentes tratamentos foi determinada durante 48h de depuração. A taxa de retenção foi calculada da seguinte forma: Taxa de retenção = (densidade bacteriana)/(densidade bacteriana após 18h de inoculação) x 100%.

Os parâmetros físico-químicos de temperatura, oxigênio dissolvido (YSI-550A) e salinidade (refractometer salinity, Alfakit) da água do sistema foram monitorados “in loco” durante todo o processo de depuração, e o pH da água (Quimis mod. D-400A) foi verificado no laboratório. No final de cada ensaio de depuração a água do sistema foi transferida para o tanque de cloração para descontaminação final, que foi realizada através da adição de hipoclorito de sódio 100 mg L⁻¹, o qual, após 20 minutos de ação, foi inativado por aeração. A concentração de cloro na água foi verificada pelo método colorimétrico com tiras de teste 0 - 0.5 - 1 - 2 - 5 - 10 - 20 mg L⁻¹ Cl₂ (Merckoquant). Cada tratamento foi realizado de forma que três amostras (cada uma com seis ostras artificialmente contaminadas) foram coletadas em cada tempo de amostragem, randomicamente.

2.5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

As populações de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em ostras foram analisadas pela técnica do número mais provável (NMP) utilizando séries de três tubos múltiplos, conforme descrito por Kaysner e DePaula (2001). Para as análises de amostras de água foi utilizado também o método do NMP, utilizando séries de cinco tubos

múltiplos. As conchas das ostras foram lavadas e escovadas para remover as sujidades, e posteriormente foram abertas utilizando faca estéril. A carne e o líquido intervalvar das seis ostras de cada amostra foram transferidos assepticamente para um saco estéril que foi homogeneizado por um minuto, formando um *pool*.

Deste *pool* foi retirada uma amostra de 50 g, a qual foi adicionada 450 mL de tampão fosfato salina (PBS, Oxoid), a mistura foi homogeneizada em homogeneizador BagMixer, a partir desta diluição 10^{-1} foram realizadas as diluições decimais subsequentes. Todas as diluições de amostras de ostras foram inoculadas individualmente em três tubos de água peptonada alcalina (APW, Oxoid).

As amostras de água foram inoculadas em três séries de cinco tubos de APW, sendo que a primeira série foi inoculada com 10,0 mL da amostra em tubos com APW duplamente concentrado, e as duas séries subsequentes de APW inoculadas com 1,0 e 0,1 mL de amostra, respectivamente. Os tubos de APW foram incubados a 35 °C (± 2 °C) por 16 a 18h. A partir de cada tubo com turvação, o conteúdo foi semeado por esgotamento, em placas de ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS, HiMedia) para *Vibrio parahaemolyticus*, ou em placas de ágar celobiose polimixina colistina modificado (mCPC, HiMedia) para *Vibrio vulnificus*. Todas as placas foram incubadas a 35 °C (± 1 °C) de 18 a 24 horas.

As colônias típicas foram submetidas ao teste de oxidase (tiras Newprov), teste de motilidade, em ágar sulfeto indol motilidade (SIM-Oxoid) e coloração de Gram para estudo da morfologia bacteriana, e posteriormente foram submetidas a testes bioquímicos utilizando o kit API 20E (Biomérieux). A população total de *Vibrio parahaemolyticus* ou *Vibrio vulnificus* foram determinadas convertendo o número de tubos de APW que foram positivos para *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* para NMP g^{-1} para amostras de ostras e NMP 100 mL^{-1} para amostras de água, usando a tabela do NMP.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios microbiológicos foram transformados em valores de log para realizar as análises estatísticas, as quais foram realizadas com auxílio do Programa Statistica® 7.0. Para avaliar a existência de diferença entre as populações bacterianas das ostras nos diferentes tempos de amostragem de cada tratamento, foi utilizada a análise de variância ANOVA, com um nível de significância de 5%.

Havendo diferença entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey para compará-las. A comparação dos diferentes tratamentos ao longo do tempo foi realizada através da comparação do coeficiente angular das retas de cada tratamento, e diferenças significativas entre as médias dos tratamentos foram estabelecidas com um valor $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OCORRÊNCIA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* E *VIBRIO VULNIFICUS* EM OSTRAS NATURALMENTE CONTAMINADAS

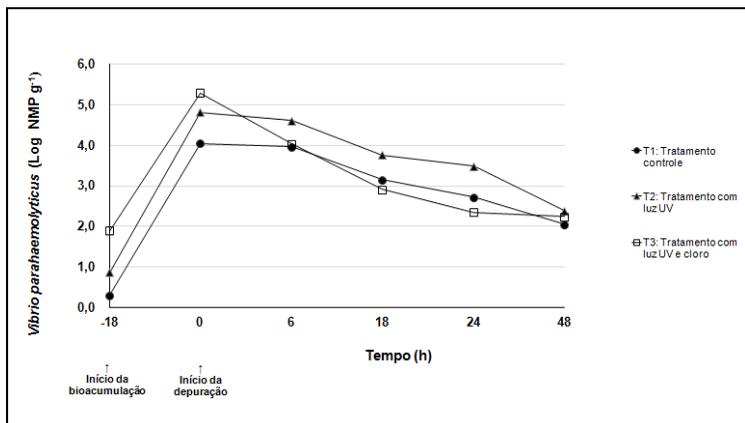
Nas amostras de ostras utilizadas para contaminação artificial a presença natural de *Vibrio parahaemolyticus* foi observada em baixas contagens, variando entre 0,9 a 1,9 \log_{10} NMP g^{-1} . A presença natural de *Vibrio vulnificus* foi observada para apenas uma amostra, com contagem de 1,0 \log_{10} NMP g^{-1} , as amostras remanescentes apresentaram contagens $< 0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} .

A ocorrência natural de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em ostras cruas, ainda que em baixas concentrações, deve-se provavelmente, ao período de coleta das ostras, na primavera e no verão, quando a temperatura da água está mais elevada. Diversos estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre temperatura da água e a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* (CHAE et al., 2009; DEEPANJALI et al., 2005; DEPAOLA et al., 2003; WANG et al., 2010). Ramos et al. (2010), avaliando a ocorrência e o nível de contaminação de *Vibrio* spp. em ostras (*Crassostrea gigas*) durante a primavera de 2008 e o verão de 2009 na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, no Sul do Brasil, reportaram a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em 36,7% e 10,0% das amostras respectivamente.

3.2. BIOACUMULAÇÃO DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* E *VIBRIO VULNIFICUS* EM OSTRAS

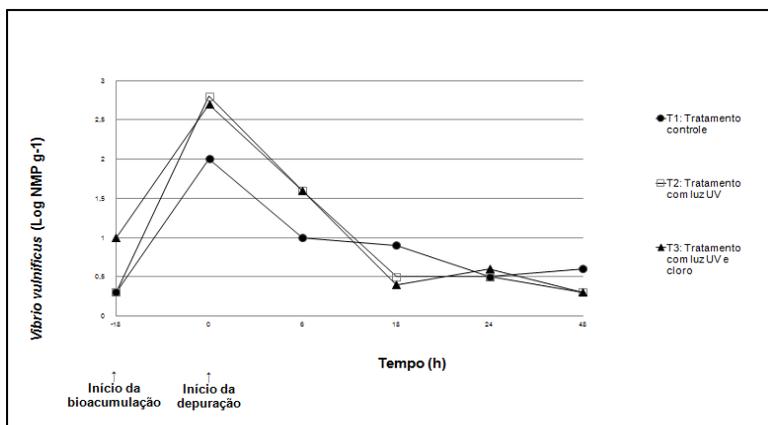
A população de *Vibrio parahaemolyticus* aumentou após 18h de bioacumulação, com contagens atingindo $1,1 \times 10^4$ NMP g^{-1} (aumento de 3,8 \log_{10}), $6,6 \times 10^4$ NMP g^{-1} (aumento de 4 \log_{10}) e $2,0 \times 10^5$ NMP g^{-1} (aumento de 3,4 \log_{10}) para T1, T2 e T3 respectivamente (Figura 11).

Figura 11 - Bioacumulação e depuração de *Vibrio parahaemolyticus* utilizando três diferentes tratamentos (T1: tratamento controle; T2: tratamento com luz UV; T3: tratamento com luz UV e cloro).



Foi observado um aumento menor nas contagens de *Vibrio vulnificus*, com contagens atingindo $1,1 \times 10^2$ NMP g⁻¹ (aumento de 1,7 log₁₀), $6,3 \times 10^2$ NMP g⁻¹ (aumento de 2,5 log₁₀), e 5×10^2 NMP g⁻¹ (aumento de 1,7 log₁₀), usando o mesmo protocolo de contaminação (Figura 12).

Figura 12 - Bioacumulação e depuração de *Vibrio vulnificus* utilizando três diferentes tratamentos (T1: tratamento controle; T2: tratamento com luz UV; T3: tratamento com luz UV e cloro).



3.3. MUDANÇAS NAS POPULAÇÕES DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* E *VIBRIO VULNIFICUS* EM OSTRAS NÃO CONTAMINADAS

Foi observado um aumento na população de *Vibrio parahaemolyticus* ($1,8 \log_{10}$ NMP g^{-1}) e de *Vibrio vulnificus* ($0,2 \log_{10}$ NMP g^{-1}) nas ostras não contaminadas, utilizadas como controle negativo, no início do processo de depuração. Após seis horas de depuração, as contagens médias de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, nas ostras não contaminadas aumentou, respectivamente, de $1,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} e $0,6 \log_{10}$ NMP g^{-1} , no início do processo, para $3,3 \log_{10}$ NMP g^{-1} e $0,8 \log_{10}$ NMP g^{-1} após seis horas de depuração. É possível que este aumento nas contagens de ambos os vibrios tenha ocorrido pelo aumento nas concentrações de vibrios na água do tanque de depuração, devido à eliminação de fezes e pseudofezes pelas ostras que foram artificialmente contaminadas, contaminando desta forma as ostras controle.

Posteriormente, uma diminuição nestas populações ($1,9 \log_{10}$ NMP g^{-1} para *Vibrio parahaemolyticus* e $0,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} para *Vibrio vulnificus*) foi observada, da mesma forma que para as ostras artificialmente contaminadas, a contagem média de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* nas ostras não contaminadas utilizadas como controle no final do processo de depuração foi de $1,4 \log_{10}$ NMP g^{-1} e $0,3 \log_{10}$ NMP g^{-1} , respectivamente.

3.4. MUDANÇAS NAS POPULAÇÕES DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* NAS OSTRAS DURANTE A DEPURAÇÃO

Foi observada uma diminuição nas populações de *Vibrio parahaemolyticus* em todos os tratamentos durante as 48 horas de depuração (Figura 11). A menor diminuição foi observada no tratamento controle ($2,0 \log_{10}$ NMP g^{-1}), que não continha nenhum agente bactericida. As populações de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras foram reduzidas em $2,4 \log_{10}$ NMP g^{-1} e $3,1 \log_{10}$ NMP g^{-1} após a depuração com luz UV e com luz UV mais cloro, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para nenhum tratamento ($p > 0,05$) na diminuição das populações de *Vibrio parahaemolyticus* entre 24 e 48h de depuração. A taxa de retenção deste patógeno em

ostras foi avaliada durante as 48h de depuração, e a maior redução foi observada para o tratamento utilizando luz UV e cloro (tabela 9).

Tabela 10 - Taxa de retenção de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras submetidas a diferentes tratamentos de depuração por até 48h.

| Tempo (h) | Tratamento controle (EP)* | Tratamento luz UV (EP)* | Tratamento luz UV mais cloro (EP)* |
|-----------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 6 | 83,8 (7,4) ^a | 64,4 (13,2) ^a | 5,9 (0,7) ^a |
| 18 | 12,4 (3,8) ^b | 8,7 (0,4) ^b | 0,5 (0,2) ^b |
| 24 | 5,0 (2,2) ^b | 5,0 (2,5) ^b | 0,1 (0,0) ^b |
| 48 | 1,0 (0,0) ^b | 0,4 (0,0) ^b | 0,1 (0,0) ^b |

* Média (Erro padrão); Média (n = 3) na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa (p < 0,05)

A depuração de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cultivadas no Brasil parece ter sido um efetivo tratamento pós-colheita na redução das contagens bacterianas, quando comparados a outros estudos desenvolvidos na Europa (CURTIUS et al., 2003) e nos Estados Unidos (CHAE et al., 2009; SU; LIU, 2007). O cultivo de moluscos bivalves, especialmente de ostras *Crassostrea gigas*, no Brasil, apresenta um padrão rápido de crescimento, devido às ótimas condições geográficas, assim como a temperatura da água, que está frequentemente entre 20,0 °C e 25,0 °C (CURTIUS et al., 2003).

É possível que a redução de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* tenha sido mais eficiente devido ao fato dos vibrios presentes em águas tropicais e subtropicais, como ocorre na costa brasileira, não sejam expostos a condições de temperaturas extremas e, portanto, apresentam um baixo nível de resistência a condições adversas, como a exposição a luz UV e a água marinha clorada. A combinação de luz UV e cloro aumentou a eficiência da desinfecção porque elas causam diferentes tipos de danos nos microrganismos. O tratamento com cloro danifica as membranas e parede celular, assim como o sistema enzimático e de transporte, enquanto a irradiação UV causa dano no DNA e danifica os mecanismos de reparo, causando a morte dos microrganismos (CORRÊA et al., 2007; KOIVUNEN; HEINONEN-TANSKI, 2004).

Diferente de outros estudos que reportam que a depuração eficiente de *Vibrio parahaemolyticus* do tecido das ostras não ocorre usando água marinha a temperatura ambiente (CHAE et al, 2009;

WANG et al., 2010), uma maior redução na população deste microrganismo usando luz UV e cloro foi observado neste estudo, sendo esta maior que $3,0 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$, enquanto Chae et al. (2009) observou uma redução de $1,2 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$ nas contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras após 48 h de depuração a 22°C , e Croci et al. (2002) mostraram uma redução de $1,0 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$ nas contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras, após 44h de depuração a $16-18^\circ\text{C}$. É possível que a alta salinidade, acima de 34 ppm durante este estudo, também tenha influenciado na redução das populações de vibrios em ostras. De acordo com Audemard et al. (2011), salinidades elevadas (≥ 30 ppm) parecem afetar significativamente a sobrevivência de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

3.5. MUDANÇAS NAS POPULAÇÕES DE *VIBRIO VULNIFICUS* NAS OSTRAS DURANTE A DEPURAÇÃO

A redução nas contagens das populações de *Vibrio vulnificus* foi menor do que as observadas para *Vibrio parahaemolyticus* para o T1 e T3, enquanto para o T2, a redução foi maior para *Vibrio vulnificus* (Figura 12). A menor redução foi observada para o tratamento controle ($1,4 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$). As populações de *Vibrio vulnificus* em ostras foram reduzidas em $2,5 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$ e $2,4 \log_{10} \text{ NMP g}^{-1}$ após a depuração utilizando luz UV e luz UV e cloro, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na redução de *Vibrio vulnificus* entre 18 e 48 h de depuração ($p > 0,05$). A taxa de retenção deste microrganismo em ostras foi avaliada durante 48 h de depuração, e a maior redução foi observada para o tratamento utilizando somente luz UV (tabela 10).

Tabela 11 - Taxa de retenção de *Vibrio vulnificus* em ostras submetidas a diferentes tratamentos de depuração por até 48h

| Tempo (h) | Tratamento controle (EP)* | Tratamento luz UV (EP)* | Tratamento luz UV mais cloro (EP)* |
|-----------|---------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 6 | 9,4 (0,9) ^a | 7,5 (2,9) ^a | 8,2 (1,4) ^a |
| 18 | 9,0 (4,5) ^a | 0,5 (0,1) ^b | 0,6 (0,1) ^b |
| 24 | 3,0 (0,7) ^a | 0,6 (0,2) ^b | 0,9 (0,4) ^b |
| 48 | 3,5 (1,1) ^a | 0,3 (0,1) ^b | 0,4 (0,1) ^b |

* Média (Erro padrão); Média (n = 3) na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

Diferente de estudos desenvolvidos nos Estados Unidos (CHAE et al., 2009), a bioacumulação e depuração de *Vibrio vulnificus* não foram tão eficientes quanto os resultados observados para *Vibrio parahaemolyticus*. Embora a depuração tenha reduzido as contagens em torno de $2,5 \log_{10}$ NMP g^{-1} em 48 h, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizando luz UV e luz UV mais cloro. É possível que isto tenha ocorrido, pois durante a realização dos tratamentos de depuração de *Vibrio vulnificus* nas ostras, a temperatura da água marinha no tanque estava mais elevada, chegando a temperaturas superiores a $27^{\circ}C$, o que pode ter diminuído a eficiência do processo, visto que em sistemas fechados de depuração, aumenta a possibilidade de multiplicação deste microrganismo, estimulado pela presença de nutrientes liberados pelo metabolismo das ostras associado à elevada temperatura da água (TAMPLIM; CAPERS, 1992).

3.6. EFICÁCIA DO TRATAMENTO UTILIZANDO LUZ UV E LUZ UV MAIS CLORO NA INATIVAÇÃO DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* E *VIBRIO VULNIFICUS* NA ÁGUA DE RECIRCULAÇÃO

Nem *Vibrio parahaemolyticus*, nem *Vibrio vulnificus* foram detectados na água de recirculação ($< 1,8$ NMP 100 mL^{-1}) após 48 h de depuração utilizando luz UV e luz UV mais cloro. Ambos os microrganismos, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* foram detectados na água de recirculação do tratamento controle após 48 h de depuração, a uma concentração média de $0,1 \log_{10}$ NMP 100 mL^{-1} para ambos microrganismos. Estes resultados estão de acordo com os resultados observados por Chae et al. (2009), sugerindo que o tratamento com luz UV é suficiente para inativação de células de *Vibrio* liberadas pelas ostras durante o processo de depuração.

3.7. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE RECIRCULAÇÃO

Como mostrado na Tabela 10, os parâmetros físico-químicos da água marinha de recirculação nos tratamentos de depuração de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em ostras foram adequados para manter a atividade de filtração da água pelas ostras, os parâmetros de oxigênio dissolvido, temperatura e salinidade, foram similares aos

observados em áreas de cultivos de ostras no sul do Brasil (CURTIUS et al., 2003) e recomendados pelo Food and Agriculture Organization of the United Nations para sistemas de depuração de ostras (LEE et al., 2008).

Tabela 12 - Parâmetros físico-químicos da água de recirculação nos tratamentos de depuração de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em ostras

| Tratamento | Salinidade | Temperatura | Oxigênio dissolvido | pH |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| | mg L ⁻¹ ± DP* | °C ± DP* | mg L ⁻¹ ± DP* | ± DP* |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | | | | |
| T1 (controle) | 35,0 ± 0,0 ^a | 20,9 ± 1,7 ^a | 6,2 ± 0,2 ^a | 8,9 ± 0,1 ^a |
| T2 (luz UV) | 34,0 ± 0,0 ^a | 21,6 ± 1,3 ^a | 6,8 ± 0,5 ^b | 9,0 ± 0,1 ^a |
| T3 (luz UV mais cloro) | 35,0 ± 0,0 ^a | 22,4 ± 1,2 ^a | 6,9 ± 0,2 ^b | 9,1 ± 0,1 ^a |
| <i>V. vulnificus</i> | | | | |
| T1 (controle) | 36,0 ± 0,0 ^b | 25,0 ± 2,1 ^{bc} | 6,5 ± 0,8 ^{cd} | 9,0 ± 0,1 ^b |
| T2 (luz UV) | 36,0 ± 0,0 ^b | 23,0 ± 1,1 ^b | 6,8 ± 0,2 ^c | 9,2 ± 0,2 ^b |
| T3 (luz UV mais cloro) | 35,0 ± 0,0 ^b | 27,0 ± 0,8 ^c | 6,1 ± 0,2 ^d | 9,1 ± 0,1 ^b |

* Média ± Desvio padrão; Média (n = 3) na mesma coluna para o mesmo microrganismo com diferentes sobrescritos apresentaram diferença estatística (p < 0,05).

4. CONCLUSÕES

Os sistemas fechados de depuração desenvolvidos neste estudo, utilizando luz UV ou luz UV mais cloro, foram eficientes na descontaminação de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em ostras cultivadas na costa brasileira. Este estudo disponibiliza informações que podem contribuir no controle e prevenção destes microrganismos em ostras comercializadas, especialmente para consumo *in natura*.

Estudos futuros devem testar um sistema de depuração em escala comercial, com vários andares, permitindo a depuração de uma quantidade maior de ostras, e diferentes parâmetros de temperatura da

água, buscando a temperatura em que o sistema seja mais eficiente com baixo custo. Estes estudos devem ter por objetivo aperfeiçoar este processo de depuração de vibrios em ostras cultivadas em águas temperadas e tropicais, como ocorre no Brasil, para que no futuro, possa ser utilizado como um efetivo tratamento pós-colheita por restaurantes e pequenos produtores de ostras na costa brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, L.S. Strategies to control Vibrios in molluscan shellfish. **Food Protection Trends**, v. 24, p. 70–76, 2004.

AUDEMARD, C. et al. High salinity delay as a postharvest processing strategy to reduce *Vibrio vulnificus* levels in Chesapeake bay oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Food Protection**, v. 74, p.1902-1907, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). 25 October 2005, posting date. ***Vibrio vulnificus***. Disease listing. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/vibriovulnificus_g.htm. Acesso em 14/08/2008.

CHAE, M.; CHENEY, D.; SU, Y. Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). **Journal of food science**, v. 74, p. M62–M66, 2009.

COOK, D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: WARD, D. R.; HACKNEY, C. (ed.), **Microbiology of marine food products**. New York: Van Nostrand Reinhold. 1991, p.19-34.

CORRÊA, A.A. et al. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine environmental research**, v. 63 p. 479-489, 2007.

CROCI, L. et al. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio*

parahaemolyticus. **Journal of applied microbiology**, v. 92: p. 460–465, 2002.

CURTIUS, A.J. et al. Evaluating trace element contamination in mariculture activities. Partial results of a case study carried out in the coastal region of Santa Catarina, Brazil **Quimica Nova**, v. 26, p.44-52, 2003.

DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.; KARUNASAGAR, I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, p. 3575–3580, 2005.

DEPAOLA, A. et al. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, p. 2299 -2302, 2003.

DRAKE, S.; DEPAOLA, A.; JAYKUS, L. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 6, p. 120-144, 2007.

IMAI, T. The evolution of oyster culture. In IMAI, T. (ed.), **Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture**. Rotterdam: A. A. Balkema. 1982, p. 115-262.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, JR. A. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp. in US Food and Drug Administration/ Center for Food Safety & Applied Nutrition (US FDA/CFSAN). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 9, revisad May 2004. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov) Acesso em 10/07/2008.

KOIVUNEN, J.; HEINONEN-TANSKI. H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. **Water Research**, v. 39, p. 1519-1526, 2004.

LEE, R., LOVATELLI, A.; ABABOUC, L. **Bivalve depuration: fundamental and practical aspects**. FAO Fisheries Technical Paper. Rome, 2008.

LEE, W.C. et al. Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 899-902, 2001.

LEVINE, W.C.; GRIFFIN, P. M. Vibrio infection on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance. **The Journal of infectious diseases**, v.167, p.479–483, 1993.

MAFFEI, M., P. et al. Depuration of Striped Venus Clam (*Chamelea gallina* L.): effects on microorganisms, sand content, and mortality. **Journal of food science**, v. 74, p. M1–M7, 2009.

NAPPIER, S. et al. Co-localized *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters differ in bioaccumulation, retention and depuration of microbial indicators and human enteropathogens. **Journal of applied microbiology**, v. 108, p. 736-744, 2009.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (ed.), **The biology of vibrios**. 1. ed. Washington : Amer Society For Microbiology, 2006, p. 349-366.

RAMOS, R. J. et al. Preliminary results of the incidence of *Vibrio* spp. in oysters harvested in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 73 (Sup), p.78, 2010.

RISTORI, C.A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal Environmental Health Research** v. 17, n. 4, p. 259-269, 2007.

SOLIC, M. et al. The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental condition. **Environment international**, v. 25, p. 991-1000, 1999.

SOUZA FILHO, J. **Custo de produção da ostra cultivada**. Florianópolis: Instituto Cepa/SC. Cadernos de indicadores agrícolas. 2003. 23 p.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **Food microbiology**. v. 24, p. 549-558, 2007.

TAMPLIM, M. L.; CAPERS, G. M. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast 3 oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. **Applied and environmental microbiology**, v. 4, n. 58, p.1506-1510, 1992.

WANG, D. et al. Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. **International journal of food microbiology**, v. 137, p.76–80, 2010.

WANG, S. et al. Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in 8 China between 1994 and 2005. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 51, p. 8–13, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa, sugerem a necessidade de melhorar as estratégias para prevenir a ocorrência de doenças transmitidas pelo consumo de moluscos bivalves contaminados com vibrios patogênicos, assim como o acompanhamento não apenas indicadores de contaminação fecal, tais como *Escherichia coli*, mas também de vibrios potencialmente patogênicos, especialmente nos meses mais quentes. Espera-se que a instituição do Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) seja um marco no desenvolvimento da maricultura no país, e junto com as instituições de pesquisa do país avaliem as necessidades de monitoramento e controle necessários a garantia da produção de um alimento microbiologicamente seguro, contribuindo para o crescimento e manutenção desta importante atividade econômica no estado de Santa Catarina, e especialmente a segurança alimentar dos consumidores de moluscos bivalves.

O isolamento e identificação de cepas de vibrios potencialmente patogênicas ao homem nesta pesquisa, reforçam o alerta as autoridades sanitárias no desenvolvimento de medidas de controle, legislação adequada e medidas educativas para que os consumidores de ostras possam vir a minimizar os riscos, através de medidas simples, como evitando o consumo de moluscos bivalves crus ou parcialmente cozidos, diminuindo assim o risco de uma infecção alimentar. O desenvolvimento de pesquisas voltadas a análise de risco de vibrios em ostras produzidas em Santa Catarina deve ser desenvolvido, neste momento utilizando os dados publicados nesta pesquisa, no entanto, para uma análise de risco efetiva, é recomendado um programa de monitoramento e controle de vibrios ininterrupto, que seja responsabilidade do governo, através do Ministério da Pesca e Aquicultura, como ocorre no modelo norte americano.

A partir dos resultados positivos da eficiência de depuração de vibrios isolados de ostras e águas brasileiras, torna-se eminente a necessidade de estudos futuros, avaliando um sistema de depuração em escala comercial, com vários andares, permitindo a depuração de uma quantidade maior de ostras, e diferentes parâmetros ambientais, buscando um sistema que seja mais eficiente, com baixo custo. Embora durante a realização deste estudo ainda não houvesse nenhuma norma estabelecida para plantas depuradoras no Brasil, o modelo utilizado está em acordo com as normas publicadas recentemente no PNCMB,

podendo servir de base para um modelo economicamente viável, que no futuro possa ser utilizado como um efetivo tratamento pós-colheita por restaurantes e pequenos produtores de ostras na costa brasileira.