

## OCORRÊNCIA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*, *ESCHERICHIA COLI* E DE BACTÉRIAS MESÓFILAS EM OSTRAS \*

Dilma Scala GELLI \*\*

Takako TACHIBANA \*\*

Harumi SAKUMA \*\*

RIALA6/476

GELLI, D. S.; TACHIBANA, T. & SAKUMA, H. — Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em ostras. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(1):61-66, 1979.

**RESUMO:** Foram analisados 30 lotes de ostras não depuradas procedentes da região litorânea do sul do Estado de São Paulo e do norte do Paraná, no período de Janeiro a Novembro de 1975. Os resultados da contagem total de bactérias mesófilas (contagem padrão em placa) variaram entre um mínimo de 520 até acima de 3.000.000 de bactérias/g de ostra; a variação quantitativa de *Escherichia coli* foi de menos de 3 até um número maior ou igual a 24.000/g e a do *V. parahaemolyticus*, de 9,1 a 3.900.000/g de ostra. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que há influência sazonal na incidência numérica dos microrganismos pesquisados. Em vista dos resultados obtidos, discute-se o padrão de qualidade microbiológica assim como os parâmetros estabelecidos para tal, tanto no nosso como em outros países, para os moluscos bivalvos e também os aspectos sanitários relacionados com as determinações microbiológicas realizadas.

**DESCRITORES:** ostras, contaminantes microbianos; *Escherichia coli* em ostras; *Vibrio parahaemolyticus* em ostras; bactérias mesófilas em ostras.

### INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalvos, tais como as ostras e mariscos, são alimentos de importância nutricional. Estes organismos de vida sedentária e fixos em substratos marinhos, captam o alimento por sistema de filtração de água, o que permite a concentração dos microrganismos dispersos na água do mar em seus corpos. Os resultados dos exames microbiológicos, portanto, são indicativos da flora microbiana do ambiente marinho e da presença de contaminantes, inclusive patogênicos. Além de sentinelas das condições sanitárias do ambiente ma-

rinho, os exames microbiológicos desses moluscos também estão relacionados com a Saúde Pública, pois o seu consumo pode provocar tóxi-infecções alimentares.

Entre os contaminantes passíveis de serem transmitidos pelas ostras, os de maior incidência e importância pelo risco potencial que apresentam à saúde são a *Salmonella typhi* e o vírus da hepatite infecciosa. Este vírus tem se revelado um dos maiores problemas sanitários desta última década, em virtude do consumo de ostras cruas<sup>5</sup>. As toxi-infecções pelo *Vibrio cholerae* e pelo *V. parahaemolyticus* são

\* Realizado na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

\*\* Da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz.

esporadicamente causadas pelo consumo desse alimento<sup>3, 5, 7</sup>.

No Japão, onde são frequentes as toxi-infecções alimentares pelo *V. parahaemolyticus*, esse agente é veiculado principalmente pelo consumo de peixe, enquanto nos Estados Unidos é veiculado predominantemente pelo camarão<sup>3, 5, 7</sup>.

Pelas pesquisas realizadas no Japão e nos Estados Unidos, a incidência quantitativa do *V. parahaemolyticus*, assim como as decorrentes toxi-infecções, são marcadamente sazonais: comuns no verão e ausentes no inverno. No Japão, as análises efetuadas com água do mar revelaram que o número desse microrganismo é de 93/100 ml no verão e de 2/100 ml no inverno. As análises efetuadas com ostras, nos Estados Unidos, demonstraram que o número desse agente é de 70.000/g no verão e de 10.000/g no inverno<sup>2, 6, 8</sup>.

O critério microbiológico usado para a elaboração de padrões legislativos para a caracterização da qualidade sanitária dos moluscos não consideram o *V. parahaemolyticus* como parâmetro dessa qualidade e sua pesquisa só é recomendada nas regiões onde são frequentes as toxi-infecções por esse agente, ou quando os exames efetuados para os demais agentes toxi-infeciosos forem negativos. Assim, nos Estados Unidos, considerando-se a relativa quantidade de ostras cruas que são consumidas e a inexistência de toxi-infecções humanas relacionadas com o seu consumo, o risco potencial de infecção para o consumidor é baixo<sup>5</sup>. Porém, como já foi assinalado, os casos humanos têm como causa principal o consumo de camarões e, portanto, um número de  $10^3$  *V. parahaemolyticus*/g desse crustáceo é considerado como sinal de risco potencial, dando motivos para maiores investigações<sup>7</sup>.

Os índices microbianos utilizados internacionalmente para o estabelecimento das condições higiênico-sanitárias dos moluscos bivalvos têm como parâmetros microbiológicos a contagem total de bactérias mesófilas (contagem padrão em placas), os coliformes totais, os coliformes fecais e/ou a *Escherichia coli* e as bactérias patogênicas, em especial as salmonelas. Ainda, em alguns países, o padrão microbiológico incide, também, na região marinha de onde são extraídos ou captados os moluscos, através do controle de análises periódicas da água do mar; além disso há a obrigatoriedade de processos de depuração das ostras, visando a sua descontaminação<sup>1, 5, 7</sup>.

A Alemanha, Coréia, Japão, Canadá e alguns estados dos Estados Unidos toleram uma contagem padrão em placas de até 500.000 bactérias mesófilas/g de ostra, enquanto a Dinamarca permite que essa contagem seja no máximo de 100.000/g do molusco. O Brasil ainda não estabeleceu limite para esse parâmetro<sup>2, 5, 7</sup>.

A República Federal da Alemanha estabeleceu que o número de coliformes totais não pode ser superior a 230/100 g do molusco.

A Dinamarca determinou padrões para a pesquisa de *E. coli*, que deve ser negativa em 10 ostras analisadas; a França tolera que o número de *E. coli* seja menor ou igual a 1 *E. coli*/g de ostra a ser consumida crua e, no máximo, 2 *E. coli*/g das que serão consumidas após cocção. Na Itália, os moluscos expostos à venda no comércio não podem apresentar um número superior a 600 *E. coli*/100g. O Brasil tolera que os moluscos apresentem até  $10^2$  coliformes fecais/g do molusco<sup>2, 5, 7</sup>. Note-se que o padrão para a *E. coli*, na legislação brasileira, expressa a tolerância por g de ostra, enquanto os padrões italianos, e os de outros países, expressam por 100 g. O padrão italiano significa 6 *E. coli*/g de ostra; em paralelo, o padrão brasileiro tolera 10.000 *E. coli*/100g do molusco.

Dentre os países que estabeleceram obrigatoriedade de pesquisa de bactérias patogênicas, estão a Alemanha e a Dinamarca. No Brasil, o padrão inclui os seguintes parâmetros: ausência de salmonelas em 25 g de ostra e tolerância de  $10^3$  *Staphylococcus aureus*/g do molusco<sup>2, 5, 7</sup>.

A Itália, Inglaterra e alguns estados dos Estados Unidos estabeleceram padrão para a água do mar da região de onde se extraem os moluscos. A Itália permite a exploração se, no espaço de um ano, 90% das amostras de água do mar apresentarem um número de *E. coli* máximo de 160/100 ml da amostra e, em 10% das amostras, um número máximo de 500/100 ml desse microrganismo. A Inglaterra, para o mesmo espaço de tempo, estabeleceu que 90% das amostras apresente um número de *E. coli* não superior a 200/100 ml, e os restantes 10%, de 200-500/100 ml<sup>5</sup>.

A determinação do número de *E. coli* da água do mar de onde se extraem os moluscos tem importância na indicação da presença de enterobactérias e de outros microrganismos entéricos patogênicos. No trabalho de ANDREWS *et alii*<sup>1</sup>, os resultados que foram obtidos demonstraram número de *E. coli* que indica presença de salmonelas; um número maior ou igual a 70 *E. coli*/100 ml de água do mar está intrinsecamente relacionado com o isolamento de salmonelas, o que não acontece quando o número de *E. coli* é menor ou igual a 14/100 ml. Entretanto, esses resultados estão localizados no tempo e no espaço, o que nem sempre permite sua extrapolação para outras áreas e épocas.

Considerando que as ostras concentram os microrganismos dispersos na água do mar, e que a tolerância para a aprovação da área do mar para a extração dos moluscos parece estar em nítida disparidade com os padrões microbiológicos para os moluscos à venda nos mercados, é importante salientarmos que é cor-

rente e obrigatório, na quase totalidade dos países citados, que as ostras sejam depuradas após a sua captura, seja ou por permanência em águas livres de contaminação, ou pela desinfecção por processos químicos, em especial a ozonização.

Complementando trabalho anterior<sup>4</sup>, e considerando o padrão microbiológico nacional, estabelecido em dezembro de 1977, republicado em junho de 1978<sup>2</sup>, neste trabalho apresentaremos as determinações quantitativas do *V. parahaemolyticus*, da *E. coli* e da contagem em placas de ostras analisadas num período aproximado de um ano.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 30 lotes de ostras procedentes da região de Cananéia (litoral sul do Estado de São Paulo) e/ou do norte do Estado do Paraná. Cada lote era composto de 8 a 10 unidades do molusco, que chegavam ao laboratório em sacos plásticos, refrigerados e acondicionados em caixa de isopor. As ostras estavam vivas, com as conchas firmemente unidas, sendo desprezadas as que se encontravam com as conchas abertas.

Após a lavagem externa das conchas, com escova e água corrente, as mesmas foram abertas com o auxílio de bisturis e pinças de aço inoxidável estéreis, em capela de fluxo laminar. Os organismos e a água interna contida nas conchas foram coletados com assepsia. 25 g do material assim constituído (água e animal) foram homogeneizados em 225 ml de solução salina peptonada (a 0,1%), estéril. Do homogeneizado, que se apresentava como a diluição 10<sup>-1</sup>, obtiveram-se as diluições seriadas até 10<sup>-7</sup>, retirando-se 10 ml da diluição precedente, misturando-se com 90 ml de solução salina peptonada.

*Contagem padrão em placas:* 1,0 ml de cada diluição foi colocado em placas de Petri estéreis, acrescentando-se então 18-20 ml de ágar padrão para contagem (Standard Plate Count Agar), fundido e resfriado à temperatura aproximada de 45°C. Após a adequada mistura e solidificação do ágar as placas foram incubadas a 35°C/48h. As colônias que se desenvolveram foram contadas em contador de colônias tipo Quebec.

*Número mais Provável de E. coli:* 1,0 ml de cada diluição (até a diluição 10<sup>-3</sup>) foi semeado em 3 tubos de caldo lactosado-bile-verde brilhante, concentração simples, que foram incubados a 35°C/48 h. O material dos tubos positivos — com formação de gás no tubinho de Durham invertido no meio — foi semeado em placas de Holt-Harris e Teague, pelo método de estrias e, ao mesmo tempo, transferido para outros tubos de caldo lactosado-bile-verde brilhante, incubados a 44,5°C/48 h. O material desses últimos tubos, desde que positivos, foi semeado também em placas

de Holt-Harris e Teague. As placas, tanto do material incubado a 35°C como a 44,5°C, foram incubadas a 35°C/24 h. De 3 a 5 colônias típicas de *E. coli* que se desenvolveram foram isoladas em meio IAL<sup>8</sup>, presuntivo para a identificação de enterobactérias.

*Número mais provável de V. parahaemolyticus:* 1,0 ml de cada diluição foi semeado em 3 tubos de caldo GSTB (Glucose Salt Teepol Broth), incubados a 35°C/18-24 h. O material dos tubos positivos — com turvação e viragem do indicador — foi semeado em placas de TCBS (Thiosulfate Bile-salts Sucrose Agar), pelo método de estrias. Após incubação a 35°C/25 h, 3-5 colônias típicas, verde-azuladas, foram isoladas em meio de Rugai com 3% de NaCl e identificadas conforme metodologia já descrita<sup>4</sup>.

A expressão numérica dos resultados foi obtida multiplicando-se o número de colônias da contagem em placas pelo fator de diluição correspondente. Foram selecionadas para as contagens as placas que apresentavam entre 30-300 colônias. Para a expressão numérica do número mais provável, utilizou-se tabela correspondente, multiplicando-se o número mais provável da tabela pela penúltima diluição positiva.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos nas determinações quantitativas realizadas estão expressos na tabela 1. A média mensal dos resultados está expressa na tabela 2.

Pelos resultados da tabela 1, a qualidade microbiológica das ostras não depuradas não é homogênea. Há uma variação sazonal na incidência dos microrganismos, conforme os dados da tabela 2. Os meses mais frios do ano — maio, junho e julho — apresentam uma incidência quantitativa de bactérias menor que a dos meses mais quentes, apesar de uma das amostras (n.º 19 da tabela 1) ter apresentado resultados discordantes das demais, determinando que a média mensal de junho das determinações de contagem padrão em placas e de *E. coli* não se relaciona coerentemente com a do *V. parahaemolyticus* (tabela 1 e 2).

Dos resultados das amostras analisadas nesse período de 11 meses, concluímos que há uma variação sazonal na incidência quantitativa dos parâmetros microbiológicos estudados e, pela presença de *E. coli*, que há contaminação fecal freqüente nas amostras por nós analisadas.

Das amostras analisadas, 28 (93,33%) atendem ao padrão nacional fixado para os moluscos bivalvos e 2 (6,66%) ultrapassam este limite. Pela legislação de outros países e de acordo com nossos resultados, as ostras analisadas podem ser consideradas de má qualidade microbiológica.

TABELA 1

Resultados obtidos das determinações de contagem de bactérias mesófilas, de *E. coli* e de *V. parahaemolyticus*

N.º amostra	Contagem padrão/g	NMP * <i>E. coli</i> /100 g	NMP <i>V. parahaemo-lyticus</i> /g	Mês
1	16.000	150	1,1x10 <sup>5</sup>	Janeiro
2	17.400	430	1,1x10 <sup>4</sup>	Fevereiro
3	193.000	750	7,5x10 <sup>4</sup>	Fevereiro
4	1.060.000	≥ 24.000	1,1x10 <sup>6</sup>	Fevereiro
5	> 3.000.000	230	3,9x10 <sup>6</sup>	Fevereiro
6	1.370.000	2.400	2x10 <sup>4</sup>	Março
7	> 3.000.000	1.500	7,510 <sup>5</sup>	Março
8	84.000	930	3,6x10 <sup>3</sup>	Março
9	54.000	2.400	7,5x10 <sup>3</sup>	Março
10	3.900	≤ 3	3,9x10 <sup>6</sup>	Março
11	58.000	430	1,2x10 <sup>4</sup>	Abril
12	540	30	3,6x10	Abril
13	6.000	2.400	2,4x10 <sup>3</sup>	Abril
14	17.500	≤ 3	3,9x10 <sup>2</sup>	Maió
15	1.870	230	9,3x10	Maió
16	14.000	≤ 3	9,1	Maió
17	55.000	≤ 3	3,9x10 <sup>2</sup>	Junho
18	580	430	4,6x10 <sup>2</sup>	Junho
19	124.000	≥ 24.000	2,3x10	Junho
20	650	70	2,4x10	Julho
21	7.900	≤ 3	9,3	Julho
22	7.200	210	4,6x10 <sup>3</sup>	Julho
23	32.000	430	7,5x10 <sup>4</sup>	Agosto
24	520	230	1,5x10	Setembro
25	400.000	4.600	2,4x10 <sup>5</sup>	Setembro
26	42.000	930	4,6x10 <sup>3</sup>	Setembro
27	> 3.000.000	4.600	2,4x10 <sup>3</sup>	Outubro
28	74.000	290	2,0x10	Outubro
29	15.400	750	1,1x10 <sup>3</sup>	Novembro
30	127.000	430	4,6x10 <sup>4</sup>	Novembro

\* NMP = número mais provável.

TABELA 2

Resultados das determinações de contagens de bactérias mesófilas, de *Escherichia coli* e de *Vibrio parahaemolyticus*. Média mensal.

Mês	Lotes analisados	<i>E. coli</i> /100 g Média	Bactérias mesófilas/g Média	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> /g Média
Janeiro	1	150	16.000	1,1x10 <sup>5</sup>
Fevereiro	4	6.352,5	1.067.600	3,4x10 <sup>5</sup>
Março	5	1.446,6	902.380	4,9x10 <sup>4</sup>
Abril	3	953,3	21.513	2,9x10 <sup>3</sup>
Mai	3	78,6	11.123	7,9x10 <sup>2</sup>
Junho	3	8.144,3	59.860	4,1x10 <sup>2</sup>
Julho	3	94,3	5.250	5,4x10
Agosto	1	430	32.000	7,5x10 <sup>4</sup>
Setembro	3	1.920	147.506	3,2x10 <sup>2</sup>
Outubro	2	2.445	1.537.000	2,2x10 <sup>2</sup>
Novembro	2	690	71.200	3,4x10 <sup>3</sup>

#### DISCUSSÃO

Apesar de o *V. parahaemolyticus* não ser considerado parâmetro de significado para a presunção da qualidade microbiológica das ostras, sua presença no levantamento executado reafirma que este agente se encontra no ambiente marinho. A variação sazonal quantitativa deve ser considerada, pois significa que existe risco potencial à Saúde Pública pelo consumo de produtos de origem marinha nas estações quentes do ano. A presença do *V. parahaemolyticus* independe da presença de contaminantes fecais, por ser ubiqüitário de ambiente marinho.

Pelo fato de os processos de desinfecção não serem incentivados em nosso país, nem serem cogitadas normas necessárias para os procedimentos de depuração dos moluscos bivalvos, recomendamos iniciativas legais para processos de depuração de ostras, no sentido de minimizar possíveis riscos à saúde por agentes patogênicos microbianos. Ainda, que sejam realizados levantamentos correlatos ao presente trabalho para a obtenção de dados que contribuam para complementar e determinar os parâmetros microbiológicos dos padrões legislativos dessa classe de alimentos.

RIALA6/476

GELLI, D. S.; TACHIBANA, T. & SAKUMA, H. — Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* and mesophilic bacteria in oysters. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(1):61-66, 1979.

SUMMARY: A bacteriological examination was made of 30 pools of commercial oysters originating from the shores of Southern São Paulo and Northern Paraná. Mesophilic bacteria (standard counting on plates) varied from 520 to 3,000,000 bacteria per g of oyster. *Escherichia coli* varied from 3 to 24,000/g and, *Vibrio parahaemolyticus*, from 9.1 to 3,900,000/g of oyster. Apparently, there was a seasonal influence on the frequencies obtained. The results are discussed in the light of Brazilian and international standards of microbiologic quality of bivalve mollusk foods as well as the public health implications of the microbiological findings.

DESCRIPTORS: oysters, microbiological contaminants; *Escherichia coli* in oysters; *Vibrio parahaemolyticus* in oysters; mesophilic bacteria in oysters.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREWS, W. H.; DIGGS, C. D.; PRESNELL, M. W.; MIESCIER, J. J.; WILSON, C. R.; GOODWIN, C. P.; ADAMS, W. N.; FURFARI, S. A. & MUSSELMAN, J. F. — Comparative validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Milk Food Technol.*, 38:453-6, 1975.
2. BRASIL, Leis, Decretos, etc. — Resolução n.º 13/78. Diário Oficial, Brasília, DF, 25 jul. 1978. Seção I, pt I, p. 11616-7. [Resolução aprovada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos no mês de março de 1978].
3. COLWELL, R. R.; LOVELACE, T. E.; WAN, L.; KANEKO, T.; STALEY, T. CHEN, P. K. & TUBIASH, H. — *Vibrio parahaemolyticus* — isolation, identification, classification, and ecology. *J. Milk Food Technol.*, 36:202-13, 1973.
4. GELLI, D. S.; TACHIBANA, T. & SILVA, T. M. P. — Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras e outros produtos marinhos no litoral de São Paulo, Brasil. Revisão e considerações sobre o risco potencial para a saúde pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36:9-16, 1975/76.
5. HUNT, D. A.; MIESCIER, J.; REDMAN, J. & SALINGER, A. — Molluscan shellfish, fresh or fresh frozen oysters, mussels, or clams. In: APHA. Intersociety Agency/Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, D. C., v. 1976. p. 522-39.
6. LISTON, J. & BARROS, J. — Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the natural environment. *J. Milk Food Technol.*, 36:113-17, 1973.
7. LISTON, J. & MATCHES, J. R. — Fish, crustaceans, and precooked seafoods. In: APHA. Intersociety Agency/Committee on Microbiological Methods for Foods — *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, D. C., c1976. p. 507-21.
8. PESSÓA, G. V. A. & SILVA, E. A. M. — Meios de Rugai e Lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:97-100, 1972.
9. SAKAZAKI, R. — Recent trends of *Vibrio parahaemolyticus* as a causative agent of food poisoning. In: HOBBS, B. C. & CHRISTIAN, J. H. B., ed. — *The microbiological safety of foods*. London, Academic Press, 1973. p. 375-85.

Recebido para publicação em 15 de agosto de 1978.