OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ALGUNS
PRODUTOS DE ORIGEM MARINHA FRESCOS,
REFRIGERADOS E CONGELADOS

ÂNGELA LÍBIA M.P. CARDOSO
Farmacêutica Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. RODOLPHO DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de Concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Cardoso, Angela Líbia

C268o Ocorrência de Vibrio parahaemolyticus em alguns
produtos de origem marinha frescos, refrigerados e
congelados. Piracicaba, 1990.
52p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Alimento marinho - Bacteriologia 2. Alimento
marinho - Tecnologia 3. Camarão - Bacteriologia 4. Me
xilhão - Bacteriologia 5. Produto pesqueiro - Bacte -
riologia 6. Sardinha - Bacteriologia I. Escola Supe -
rior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 664.94

OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ALGUNS
PRODUTOS DE ORIGEM MARINHA FRESCOS,
REFRIGERADOS E CONGELADOS

ÂNGELA LÍBIA M.P. CARDOSO

Aprovada em: 10 de janeiro de 1991.

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo

Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

LCT/ESALQ

LCT/ESALQ

LQI/ESALQ

Prof. Dr. Rodolpho de Camargo
Orientador

Ao
Cardoso,
Cardosinho e Flavinho
que fazem dos meus sonhos realidade
Ofereço

Aos meus pais
José (em memória)
e
Guajarina
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Júlia Martins Rego (Mainha) pela dedicação, amor e carinho com que sempre tratou os meus filhos, dando-me tranquilidade para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Rodolpho de Camargo, pelo apoio e orientação prestados no decorrer do trabalho e elaboração desta dissertação.

Ao Professor Cláudio Rosa Gallo, pelo apoio e ensinamentos recebidos no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Antônio Joaquim de Oliveira, pelo estímulo e apoio recebidos.

À Professora Anita Tibana da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo apoio recebido.

À Adélia Rodrigues, pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz pelo fornecimento das culturas padrões e alguns materiais imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do Setor de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, em especial à Hilkias Arruda Nicolau, pelo auxílio e dedicação prestados.

Às bibliotecárias da Biblioteca Central e Setorial do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela revisão feita nas referências.

À Universidade do Amazonas através da Sub-Reitoria para pesquisa e Pós-Graduação - SUBPESP, pelos recursos recebidos.

Aos colegas da Pós-Graduação do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo agradável convívio no decorrer do curso.

Aos colegas do Departamento de Medicamentos e Alimentos da Universidade do Amazonas pelo apoio recebido.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Estatística da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP pela amizade e carinho que sempre me dedicaram.

À amiga Katy, cujo incentivo, apoio e amizade muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Às amigas Suely, Sandra e Mariá pelo apoio, amizade, carinho e incentivo recebidos nos momentos mais difíceis.

À Cassiana Crestana pelos ensinamentos, análise e discussão dos dados estatísticos.

Ao Rogério e Maria Lúcia pelos valiosos serviços de digitação.

À Luiza Paraíba pela revisão de Português realizada nesta dissertação.

Aos meus pais e sogros que mesmo distante sempre estiveram ao meu lado.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

SUMÁRIO	viii.
LISTA DE FIGURAS	x.
LISTA DE TABELAS	xi.
RESUMO	xii.
SUMMARY	xiii.
1 INTRODUÇÃO	1.
2 REVISÃO DE LITERATURA	4.
2.1 Considerações gerais	4.
2.2 Características morfológicas e bioquímicas	5.
2.3 Patogenicidade	6.
2.4 Ocorrência e isolamento	9.
2.5 Termorresistência	12.
3 MATERIAL E MÉTODOS	15.
3.1 Material	15.
3.1.1 Equipamento e vidrarias	15.
3.1.2 Meios de cultura	15.
3.2 Métodos	16.
3.2.1 Coleta das amostras	16.
3.2.2 Preparo das amostras	16.
3.2.3 Isolamento e identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17.
3.2.4 Análises Estatísticas	18.
4 RESULTADOS	19.
5 DISCUSSÃO	21.

	ix.
6 FIGURAS E TABELAS	26.
7 CONCLUSÕES	38.
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39.
9 APÊNDICE	50.

LISTA DE FIGURAS

Página

- 1 Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de mexilhão coletadas em diferentes condições e épocas 26.
- 2 Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de camarão coletadas em diferentes condições e épocas 27.
- 3 Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de sardinha coletadas em diferentes condições e épocas 28.

LISTA DE TABELAS

Página

1	Características morfológicas e bioquímicas do <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	7.
2	Percentual de amostras positivas para <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de mexilhões, camarões e sardinhas	29.
3	Avaliação estatística, descritiva, da incidência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> no inverno	30.
4	Avaliação estatística, descritiva, da incidência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> no verão	31.
5	Ocorrência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de camarão coletadas no inverno em diferentes condições	32.
6	Ocorrência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de camarão coletadas no verão em diferentes condições	33.
7	Ocorrência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de camarão coletadas em diferentes estações	34.
8	Ocorrência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de mexilhão coletadas no verão em diferentes condições	35.
9	Ocorrência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de mexilhão coletadas no inverno em diferentes condições	36.
10	Ocorrência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em amostras de mexilhão coletadas em diferentes estações	37.

OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ALGUNS PRODUTOS DE ORIGEM MARINHA FRESCOS, REFRIGERADOS E CONGELADOS

Autora: ÂNGELA LÍBIA CARDOSO

Orientador: PROF. DR. RODOLPHO DE CAMARGO

RESUMO

Foi estudada a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de camarões, mexilhões e sardinhas frescas e armazenadas, coletadas no litoral Norte de São Paulo e nos principais mercados de Campinas e Piracicaba durante o verão e o inverno.

Os mexilhões apresentaram presença da bactéria em 100% das amostras analisadas com população de até $5,0 \times 10^2$ UFC/g.

As amostras de camarões apresentaram a bactéria em números menores do que os mexilhões, variando de $1,0 \times 10^2$ UFC/g a $2,0 \times 10^2$ UFC/g.

As amostras de sardinhas não apresentaram a bactéria.

Houve variação na incidência da bactéria durante o verão e o inverno, ocorrendo maior incidência nos meses de verão.

Houve também variação na incidência da bactéria nos diferentes tipos e condições em que se encontravam os produtos. A maior incidência ocorreu em mexilhões frescos, seguido de camarões refrigerados e mexilhões refrigerados.

Nenhuma cultura isolada apresentou reação positiva no teste de Kanagawa.

OCURRENCE OF *Vibrio parahaemolyticus* IN SOME FRESH, REFRIGERATED AND FROZEN PRODUCTS OF MARINE ORIGIN

Author: ÂNGELA LÍBIA CARDOSO

Adviser: PROF. DR. RODOLPHO DE CAMARGO

SUMMARY

It was studied the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in samples of shrimps, mussels and fresh sardines collected on the north of São Paulo coast and in the main markets of Campinas and Piracicaba during summer and winter.

The mussels presented *Vibrio parahaemolyticus* in all the samples (100% frequency) with a population of $5,0 \times 10^2$ UFC/g.

The samples of shrimps presented the bacteria in lower counts, varying from $1,0 \times 10^2$ UFC/g to $2,0 \times 10^2$ UFC/g.

The samples of sardines did not present any bacteria at all.

Variation was observed the presence of the bacteria during summer and winter, occurring the higher incidence during summer.

There was also variation in the incidence of the bacteria in different kinds and conditions of the products.

The greatest incidence occurrence in the fresh mussels, followed by refrigerated shrimps and mussels.

None of the isolated culture presented positive reaction for the Kana-gawa test.

1. INTRODUÇÃO

A interação ecológica existente entre a população microbiana presente e os animais marinhos representa as condições que influenciam a qualidade sanitária dos alimentos originários do ambiente marinho.

O pescado normalmente apresenta uma microflora natural característica, em geral constituída pelos gêneros *Vibrio*, *Achromobacter* (*Alcaligenes*), *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*. Investigações efetuadas nos últimos anos, ressaltam a predominância quantitativa dos grupos: *Vibrio* e *Pseudomonas*, seguido do gênero *Achromobacter* (COLWELL & LISTON, 1960; MURCHELANO & BRONW, 1968 e KANEKO & COLWELL, 1974). A frequência destes microrganismos no ambiente marinho varia devido às condições ambientais, tais como: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade da água.

Nesta microflora, é importante destacar as bactérias que pertencem ao gênero *Vibrio*, no qual estão incluídas diversas espécies que são patogênicas para o homem e para os animais marinhos vertebrados e invertebrados. Apesar da ampla variedade de espécies de vibrios, o interesse dos pesquisadores restringiu-se há algumas décadas atrás ao estudo do *Vibrio cholerae* (sorotipo 01). Os outros vibrios eram chamados de "vibrios não aglutinantes" ou "vibrios não-cólera" sem nenhum interesse para a saúde pública.

Posteriormente porém, descobriu-se que os outros vibrios também podiam ser patogênicos para o homem, pois eles apresentavam nicho ecológico, mecanismo de patogenicidade e características epidemiológicas próprias diferentes entre si (BEUCHAT, 1982). A partir daí, as investigações se concentraram principalmente na pesquisa de novas espécies de vibrio, patogênicos ou não (DAVIS & SIZEMORE, 1982; TISON & SEIDLER, 1983; BAUMANN et alii., 1984 e MADDEN, 1988).

Segundo MADDEN (1988), as espécies patogênicas associadas à ingestão de alimentos e que são capazes de causar toxinfecção alimentar no homem, são principalmente *Vibrio cholerae* (sorotipos 01 e não 01), *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio mimicus*.

Nos últimos anos porém, as pesquisas estão voltadas principalmente para o estudo do *Vibrio parahaemolyticus*, uma vez que esta espécie vem sendo responsabilizada por numerosos casos de toxinfecção alimentar.

O *Vibrio parahaemolyticus* é o principal agente etiológico de gastroenterites e intoxicações alimentares em locais onde o hábito de se comer alimentos de origem marinha é bastante difundido. Isso é muito comum no Japão, onde o consumo de peixe cru ou semiprocessado é um hábito. Neste país, durante os meses de verão são relatados surtos de toxinfecção alimentar, dos quais 70% dos casos são atribuídos ao *Vibrio parahaemolyticus* (BEUCHAT, 1982).

No Brasil, existem poucos dados sobre a pesquisa de microrganismos potencialmente patogênicos em produtos de origem marinha. O clima tropical reinante em nosso país durante o ano todo, a ingestão desses alimentos pouco cozidos ou crus, a manipulação e estocagem inadequadas, principalmente a nível de comércio varejista, fazem crer que grande número de surtos isolados e não relatados devam ocorrer entre os consumidores, a saber, gastroenterite de origem não identificada, uma vez que não faz parte da rotina laboratorial brasileira a identificação de vibrio, nos procedimentos rotineiros de coprocultura, em casos de diarreia com histórico de ingestão de alimentos de origem marinha. Pode-se inferir que parte das infecções que não apresentam o agente etiológico identificado, seja devido à presença de vibrio patogênico, já que o número de surtos de toxinfecção por estes microrganismos e o número de isolamentos feito nesse tipo de alimento é muito grande. Isso indica que o *Vibrio parahaemolyticus* constitui uma grave ameaça para a saúde pública e para a cultura de espécies marinhas, em especial àquelas que se dedicam a moluscos e crustáceos. As ostras e mexilhões em particular, destacam-se bastante devido ao seu aspecto fisiológico e ao hábito de consumi-las IN NATURA, o que favorece a veiculação de inúmeros agentes microbianos.

É necessário, então, que se adote condutas rotineiras para a pesquisa de *Vibrio* evitando, desse modo, falsos diagnósticos.

Os aspectos sanitários apresentados, o discreto respaldo da literatura nacional sobre o assunto, o gradativo interesse de implantar e implementar a cultura de espécies marinhas em nosso meio e principalmente a falta de controle sanitário nesse tipo de produto vendido no mercado interno, foram as causas precípuas para o desenvolvimento deste trabalho, que se deteve em avaliar a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em alguns produtos de origem marinha vendidos nos principais mercados de Piracicaba e de Campinas e também no litoral norte de São Paulo visando, principalmente:

- avaliar a ocorrência da referida bactéria em amostras de sardinhas, camarões e mexilhões frescos, refrigerados e congelados;
- avaliar o grau de incidência dessa bactéria nestes produtos, levando em consideração o estado em que se encontra o produto e o período de coleta da amostra.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

O *Vibrio parahaemolyticus* foi identificado pela primeira vez no Japão, em 1951, quando FUJINO¹, citado por SAKAZAKI et alii (1969a), isolou-o de material coletado após um surto de gastroenterite, resultante do consumo de "shirazu" (sardinhas jovens semi-secas), classificando-o como *Pasteurella parahaemolyticus*.

TAKIKAWA (1958), isolou diversas linhagens originárias de casos de gastroenterite, evidenciando o caráter halofílico e identificando o organismo como sendo semelhante às espécies do gênero *Pseudomonas*, mas diferindo sorologicamente. O autor propôs assim, o nome de *Pseudomonas enterites* para esse microrganismo.

MIYAMOTO et alii (1961), ao estudarem diversos microrganismos com reações semelhantes, propuseram a criação de novo gênero, *Oceanomonas*, com as espécies *Oceanomonas enterites*, *Oceanomonas parahaemolyticus* e *Oceanomonas alginolyticus*.

Estudos mais aprofundados foram realizados por SAKAZAKI em 1963, que conseguiu caracterizar a bactéria morfocultural e fisiologicamente, propondo a designação de *Vibrio parahaemolyticus*, que é aceita até hoje.

¹ FUJINO, T.; OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAI, K.; MUKAI, T.; VEHO, T. On the bacteriology examination of shirasu food poisoning. *Medical Journal of Osaka University, Osaka*, 4: 229-4, 1953.

Atualmente o gênero *Vibrio* encontra-se definido na 8ª edição do BERGEY'S "Manual of Systematic Bacteriology", e compreende 26 espécies todas tendo sido isoladas ou associadas ao ambiente aquático (BAUMANN, P. & BAUMANN, L. 1973; BAUMANN, P. et alii, 1973 e 1984).

Estudos recentes têm mostrado que as bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* ocorrem naturalmente em muitas espécies da fauna marinha, em sedimentos e na água do mar sendo largamente distribuídas em vários continentes, em especial os de águas temperadas (BARROSS & LISTON, 1970; KANEKO & COLWELL, 1978; BEUCHAT, 1982; MADDEN, 1988).

2.2. Características morfológicas e bioquímicas

O *Vibrio parahaemolyticus*, é uma bactéria anaeróbica facultativa, halofílica, heterotrófica, mesofílica, móvel apresentando flagelo polar em meio líquido e flagelos laterais em meio sólido. São bactérias Gram negativas de morfologia bacilar mas apresentando pleomorfismo (SAKAZAKI, 1963). Esta bactéria desenvolve-se em meios usuais desde que adicionados de 1% a 3% de sal (COUVERT & WOODBURN, 1972). Contudo, as suas exigências variam de acordo com as características do meio. Em ágar sangue, são capazes de desenvolverem-se na ausência de sal (SAKAZAKI, 1963; KATOH, 1965 e BEUCHAT, 1982).

Desenvolvem-se a temperaturas entre 15°C a 42°C, sendo a ótima a 37,5°C (BEUCHAT, 1973). O pH ótimo situa-se entre 7,5 e 8,6, mas podem ser isoladas na faixa de pH 5,0 a 9,6 (BEUCHAT, 1974; TWEDT et alii 1969 e COUVERT & WOODBURN, 1972).

Existem algumas controvérsias com respeito à caracterização bioquímica do *Vibrio parahaemolyticus*, SAKAZAKI et alii (1965a) sugerem que esse microrganismo não fermenta a sacarose, enquanto BARROSS & LISTON (1968) observaram que 7 dentre 40 linhagens isoladas no Japão eram capazes de fermentar esse carboidrato.

Com raras exceções, são sensíveis aos antibióticos estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e novobiocina. São resistentes à polimixina B e colistina. São extre-

mamente sensíveis ao vibriostático 0-129 (2,4-diamino 6,7 diisopropil pteridina), (LEE, 1973). Os testes bioquímicos mais importantes segundo a 8ª edição do BERGEY'S "Manual of Determinative Bacteriology" para a identificação do *Vibrio parahaemolyticus* estão resumidos na Tabela 1.

2.3. Patogenicidade

Extensivos estudos vêm sendo realizados para esclarecer o mecanismo da patogenicidade do *Vibrio parahaemolyticus*. Não está bem definido se todos os membros da espécie são patogênicos. Estudos epidemiológicos revelam que a patogenicidade do *Vibrio parahaemolyticus* está associada a capacidade que certas linhagens possuem de lisar hemácias humanas como resultado da ação de sua β hemolisina. (SAKAZAKI et alii, 1965a; MIYAMOTO et alii, 1969 e CANN, TAYLOR & MERICAN, 1981). Este fenômeno é conhecido como o "Kanagawa phenomenon" (KP) e é observado no Wagatsuma blood agar, o qual contém alta concentração de cloreto de sódio adicionado de hemácias humanas recém-obtidas (SPITE et alii, 1978).

SAKAZAKI et alii (1963 e 1965b), sugeriram que todos os "strains" de *Vibrio parahaemolyticus* poderiam ser enteropatogênicos para o homem, em virtude de todas as culturas isoladas dos vibriões terem revelado uma zona hemolítica ao redor das colônias, em placas de ágar sangue comum.

MIYAMOTO et alii (1969), verificaram 95,3% de reações positivas, no "Fenômeno de Kanagawa", em linhagens isoladas de pacientes suspeitos com desenteria e 0,54% e 0,48% de reações positivas de linhagens isoladas de água marinha e amostras de peixes respectivamente. Estes autores concluíram que grande parte dos *Vibrio parahaemolyticus* isolados de alimentos marinhos não apresentam reações positivas para o teste de KANAGAWA. No entanto, investigações epidemiológicas no Japão, demonstraram que peixes do mar e seus produtos são os agentes causadores de surtos de gastroenterite, quando estes são ingeridos contendo grandes quantidades de células (10^9 — 10^{10}). A capacidade de multiplicação no trato intestinal parece, então, estar associada à reatividade KP do *Vibrio* (SPITE et alii, 1978).

Tabela 1 - Características morfológicas e bioquímicas do *Vibrio parahaemolyticus*

Características	Reação
Bastonetes	+
Gram Negativo	+
Crescimento 42°C	+
Motilidade	+
Crescimento em NaCl	
0%	-
1%	+
8%	+
10%	-
Catalase	+
Citocromo Oxidase	+
Hemólise	β +
Indol	+
Voges Proskauer	-
Vermelho de Metila	+
Utilização de Citrato	+
Produção de H ₂ S	-
Hidrólise da Gelatina	+
Hugh Leifson Glicose	+ s/ gás
Sensibilidade ao	
Agente Vibriostático O-129 ¹	sensível
Fermentação de	
Carboidratos (Glucose, Maltose, Melobiose e Manitol)	+
Celobiose, Frutose, Arabinose ¹	+/-
Sacarose ¹	-
Lactose, Melibiose, Rafinose, Inositol ¹	-
Utilização de Carboidratos	+
Ornitina Descarboxilase	+
Lisina Descarboxilase	+

¹ São testes fundamentais para diferenciar as espécies entre si

Segundo JOSEPH et alii (1982), experimentos realizados com camundongos adultos e recém-nascidos, demonstraram que é necessário um grande número de células para causar letalidade, e que filtrados de culturas livres de células não causam a morte dos animais. Demonstraram também que tanto as células KP+ quanto as KP-, podem causar sintomas de gastroenterite, ressaltando, entretanto, que as células KP- causam sintomas com menor frequência. Estes autores concluíram que o aparecimento de sintomas de gastroenterite depende, então, da administração de células vivas. Estudos mais apurados serão necessários para determinar se o mecanismo de ação do microrganismo é devido à produção de enterotoxinas, ao efeito da invasão microbiana sobre o trato intestinal, ambos ou nenhum destes fatores (TWEDT et alii, 1980).

A maioria dos autores japoneses afirmam que organismos isolados de amostras marinhas diferem das linhagens isoladas de fezes humanas e que somente estas últimas são capazes de causarem a doença típica, uma vez que em experimentos realizados com voluntários humanos, verificou-se que o *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa negativo não causa a doença típica. Entretanto, neste ponto não há unanimidade, uma vez que linhagens Kanagawa positiva foram isoladas de amostras marinhas e já foi registrado envenenamento alimentar por *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa negativo. (ICMSF, 1978; JAY, 1973; SPITE et alii, 1978 e BEUCHAT, 1982).

ZEN YOJY et alii (1965), estudando a enteropatogenicidade do *Vibrio parahaemolyticus*, concluíram que esta é do tipo infeccioso, com o desenvolvimento de gastroenterite na maioria dos casos. Os sintomas principais surgem geralmente doze horas após a ingestão do alimento contaminado, podendo, no entanto, variar num intervalo tão breve quanto duas horas ou tão longo quanto quarenta e oito horas. A doença ocorre principalmente nos meses quentes de verão e os sintomas mais comuns são dores abdominais, diarreia, náuseas, vômitos, estado febril, calafrios e cefaléia. A diarreia em geral é autolimitante, mas os casos mais graves exigem, às vezes, administração de antibióticos. (BLAKE et alii, 1980).

Devido a essa sintomatologia a doença é frequentemente diagnosticada,

erroneamente, como salmonelose ou disenteria simples (JAY, 1973).

2.4. Ocorrência e isolamento

Em virtude da ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* na maioria das águas marinhas do mundo, acredita-se que estes microrganismos sejam veiculados pela água e dessa forma contaminem os moluscos e peixes vivos. Após a captura desses produtos, estes microrganismos se multiplicam com muita rapidez, principalmente quando as temperaturas são altas alcançando, em poucas horas, níveis suficientes para produzir toxinfecção (SHEWAM, 1961 e THATCHER & CLARK, 1973).

Embora o *Vibrio parahaemolyticus* esteja presente principalmente nas águas costeiras, sedimentos e plancton, a abundância desses organismos é estritamente sazonal (LISTON & BARROSS, 1973). Isto foi evidenciado pelos trabalhos de MIYAMOTO et alii (1962), BARROSS & LISTON, (1968 e 1970) e de BARTHEY & SLANETZ (1971) que demonstraram uma baixa incidência de *Vibrio parahaemolyticus*, quando as temperaturas quentes baixavam ou em amostras coletadas em alto mar, onde além da baixa temperatura, o conteúdo orgânico nestas áreas está reduzido.

Este ciclo sazonal é observado em locais como o Japão, Estados Unidos, Austrália e Europa, não ocorrendo o mesmo em países onde a temperatura da água não atinge níveis inferiores a 11°C nos meses frios. Em países tropicais, o ciclo sazonal está relacionado com os meses de chuva, nos quais o microrganismo é isolado em abundância e nos meses correspondentes à estiagem, nos quais eles são isolados em números menores (JOSEPH et alii, 1982).

HORIE et alii (1967), observaram que não foram isolados organismos em amostras de águas de alto mar, mas por outro lado, foi revelado que as águas marinhas costeiras ou águas dos estuários continham até 10^5 UFC/ml de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras coletadas durante o verão.

SAKAZAKI (1969b), demonstrou a presença de *Vibrio parahaemolyticus* nos litorais dos Estados Unidos, das Filipinas, de Formosa, Hong Kong e Singapura, provando dessa forma, que essa bactéria não era restrita às águas do litoral do Japão como vinha sendo reportado anteriormente.

A partir daí então, sucessivos estudos, sobre a ocorrência dessa bactéria em produtos marinhos, vêm sendo realizados por diversos pesquisadores, com a finalidade de mostrar a importância epidemiológica dessa bactéria a nível de saúde pública, uma vez que esta bactéria está presente, nestes produtos, podendo ou não causar doenças em caranguejos, camarões e ostras, tornando-se um risco em potencial para o homem (KRANTZ et alii, 1969; VANDERZANT & THOMPSON, 1973; COLWELL et alii, 1973; KANEKO & COLWELL, 1973; 1974; 1975 e 1978).

Segundo o "Department of Food Control and National Institute of Health", do Japão, apud KAWATAWA (1961), os microrganismos do gênero *Salmonella*, *Staphylococcus* e *Vibrio* foram os mais envolvidos nos casos de toxinfecções alimentares devido ao consumo de pescado e produtos de pesca ocorridos no Japão no período de 1957 a 1958.

Em Maryland, no verão de 1971, ocorreram quatro surtos de origem alimentar por *Vibrio parahaemolyticus* devido ao consumo de caranguejo submetido a vapor e salada de caranguejo (FISHBEIN et alii, 1970).

TOOD (1978), analisou as toxinfecções alimentares ocorridas no período de 1967 a 1971, na Austrália; de 1968 a 1972 no Japão e de 1973 a 1975 nos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e País de Gales e verificou que o maior número de surtos, 6.109, ocorrem no Japão e que *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *C. perfringens* foram os principais agentes responsáveis pelas toxinfecções. O *Vibrio parahaemolyticus* apresentou maior incidência no Japão. Os pescados foram responsáveis por 6 (12,5%) surtos na Austrália, 1.270 (35,4%) no Japão, 10 (0,5%) na Inglaterra e País de Gales, 84 (5,8%) no Canadá e 112 (9,3%) nos Estados Unidos.

Nos Estados Unidos, acreditava-se que os surtos que ocorriam eram devidos à ingestão de alimentos manipulados imprópriamente com refrigeração inadequada, cocção insuficiente e contaminação cruzada. Nos últimos anos porém, vários surtos são atribuídos ao consumo de caranguejos e ostras contaminadas por *Vibrio parahaemolyticus* (FISHBEIN & WENTZ, 1973; BARKER, 1974 e 1984; KANEKO & COLWELL, 1975; DePAOLA et alii, 1990).

BARROSS & LISTON (1970), em um estudo bastante complexo sobre a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de ostras e águas do ambiente

marinho de Washington (EUA), verificaram que 100% das amostras de ostras examinadas estavam contaminadas por essa bactéria, ao passo que, nas amostras de águas, a incidência foi muito variável, alcançando média de 68% de amostras positivas.

JOHNSON et alii (1971), mencionaram levantamentos da contaminação de alimentos de origem marinha, originários de Puget (EUA), constatando que a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* variava de 50% em peixes, até 100% em crustáceos e 18% em águas.

Em virtude da alta incidência dessa bactéria, constatada por vários autores, principalmente em moluscos e crustáceos coletados em diversas cidades litorâneas dos Estados Unidos, é que atualmente a Food and Drug Administration recomenda a pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* nestes produtos em casos suspeitos de infecção alimentar (BARTLEY & SLANETZ, 1971; THOMPSON & VANDERZANT, 1976; BROECK et alii, 1979; HACKNEY & SPECK, 1980).

EARLE & CRISLEY (1975), isolaram o *Vibrio parahaemolyticus* de bacalhau e de mariscos (*Mya arenaria*) em pelo menos 90% das amostras em PUGET (EUA).

BROECK et alii (1979), verificaram na Baía de Cheseapeake, a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de mexilhões em pelo menos 26,6% de 288 amostras analisadas.

HACKNEY & SPECK (1980) analisaram na Carolina do Norte, 716 amostras de diferentes produtos marinhos (camarões, ostras, mexilhões e caranguejos) por um período de três anos. Estes autores verificaram que houve uma variação no número de amostras positivas entre os diferentes tipos de alimentos. Eles observaram também que as ostras e camarões mostraram-se mais contaminadas do que os caranguejos e mexilhões.

NAVA FERNANDEZ et alii (1981) isolaram no México, o *Vibrio parahaemolyticus* em todas as amostras de peixes, mariscos, ostras e crustáceos. Os autores concluíram que todas as amostras analisadas possuíam um alto grau de contaminação por esta bactéria.

VENKATESWARAN et alii (1989), estudando a ocorrência e distribuição de espécies de *Vibrio* no mar do Japão, concluíram que ocorre uma considerável

contaminação por organismos patogênicos, em que o gênero predominante de bactérias marinhas é *Vibrio*.

2.5. Termorresistência

O *Vibrio parahaemolyticus* é sensível ao calor e morre por exposição a 100°C por seis minutos. Entretanto, essas bactérias podem sobreviver em alimentos de origem marinha, quando expostas a 80°C por vários minutos. Sendo assim, quando esses alimentos são cozidos, é necessário assegurar uma temperatura adequada e homogênea por todo o lote. No Estado de Lousiana, EUA, exige-se um mínimo de sete minutos de fervura para assegurar a destruição de patógenos em produtos de origem marinha (CRISLEY & DELMORE, 1979; TEPEDINO, 1982 e BEUCHAT, 1982).

RAJ & BERGDOLL (1961), pesquisando sobre a sobrevivência de bactérias de significância à saúde pública, em produtos do mar congelados e refrigerados, observaram que o congelamento e o armazenamento sob refrigeração não reduzem significativamente a carga bacteriana dos produtos.

Particularmente nestes produtos, após longa armazenagem no estado congelado e até mesmo após o congelamento e descongelamento repetidos, pode haver sobrevivência de bactérias patogênicas ou potencialmente patogênicas em número significativo para constituir um risco para a saúde.

O tempo de geração do *Vibrio parahaemolyticus*, quando inoculado experimentalmente em alimentos marinhos, pode ser de apenas doze minutos e assim sendo, um pequeno número inicial pode rapidamente atingir níveis perigosos se o alimento não for estocado a temperaturas seguras (abaixo de 10°C). Alguns autores observaram também o comportamento de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* em carnes de camarão e caranguejo cozidas e armazenadas em várias temperaturas de refrigeração. Os microrganismos cresceram a 18,3°C e declinaram em números abaixo ou iguais a 10°C. Nesta investigação, os autores estabeleceram 12,8°C como temperatura limite para o crescimento do microrganismo em carnes de camarão e caranguejo cozidas (KRANTZ et alii, 1969; JOHNSON et alii, 1973 e BEUCHAT, 1977).

LISTON & BARROSS (1973), constataram que o *Vibrio parahaemoly-*

ticus é susceptível à refrigeração e ao congelamento, não resistindo a esta por mais de dez dias a 10°C ou três semanas a 4°C, de acordo com JOHNSON, SALINGER & KING (1973).

Considerando a grande faixa litorânea do país, aliada ao crescente beneficiamento e utilização dos produtos do mar como fonte de alimentos, discretas são as informações em nosso meio, sobre a incidência de *Vibrio parahaemolyticus*, tanto do meio ambiente como aquelas que retratam processos entéricos humanos, relacionados com surtos de toxinfecção alimentar.

No Brasil, as discussões sobre a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* se concentram principalmente em achados em peixes, crustáceos, moluscos marinhos e águas de regiões estuarinas (HOFER & SILVA, 1974; LEITÃO & ARIMA, 1975; BARROS, 1977a; ZEBRAL, 1980; FRANÇA et alii, 1980; RODRIGUES, 1983 e LOPES 1984).

LEITÃO et alii (1976), avaliaram a incidência de *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo, onde observaram uma acentuada variação na incidência dessa bactéria entre as diferentes espécies e em diferentes épocas.

RODRIGUES (1983) observou uma alta incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de ostras coletadas na Baía de Sepetiba (RJ).

LOPES (1984), em suas pesquisas sobre *Vibrio sp.*, constatou que o *Vibrio parahaemolyticus* estava presente em todas as amostras de mariscos analisadas, originárias das praias da cidade do Rio de Janeiro.

BOUTIN et alii (1985), estudaram experimentalmente a sobrevivência de células de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*, em temperatura baixa, em amostras de camarão congelado. Eles observaram que mesmo em baixa temperatura, essas bactérias ainda conseguiram sobreviver.

HOFER et alii (1986), estudaram a caracterização de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de peixes capturados do litoral brasileiro. Os autores obtiveram resultados em que o maior número de peixes portadores dessa bactéria são oriundos dos Estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul.

BATISTA (1987), pesquisou *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de sardinhas coletadas na região litorânea de São Paulo e não detectou a presença dessa

bactéria nas amostras analisadas. Estes resultados contrariam as pesquisas de BARROSS (1977a) e de LEITÃO et alii (1976).

SHIARIS et alii (1987), em recentes estudos sobre a relação da presença de *Vibrio* com o índice de contaminação fecal do meio, concluíram que, não necessariamente, a presença deste microrganismo está relacionada à contaminação fecal do meio ambiente.

Atualmente continuam sendo feitas investigações sobre bactérias patogênicas do gênero *Vibrio*, principalmente as espécies *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus* isolados em amostras de diferentes produtos marinhos. Segundo MADDEN (1988), KOWONG-YU CHAN (1989), KAYSNER et alii (1989, 1990a e 1990b), é muito importante que sejam rigorosas as medidas de controle sanitário em produtos de origem marinha. Os autores destacam a alta incidência de Vibrios patogênicos nesses alimentos, sendo este fato um risco para a saúde pública, principalmente em lugares onde se têm o hábito de consumi-los IN NATURA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Equipamentos e vidrarias

No presente estudo, além das vidrarias e equipamentos usados rotineiramente em Laboratório de Microbiologia, foi utilizado para os cálculos estatísticos o computador IBM 4381.

3.1.2. Meios de cultura

Os meios utilizados foram:

- meio para enriquecimento
Glucose Salt Teepol Broth - GSTB (MERCK)
- meio para isolamento
Tiosulfato Citrato Bile Sacarose - TCBS (LOTZ et alli, 1983)
- meio para manutenção de cultura
Agar Soy Trypticase - TSA (Difco)
- meio para identificação
Agar Ferro Açúcar Triplíce - TSIA (MERCK)
- meio para identificação rápida de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) (KAPER, 1980).
- meio para verificar a hemólise
Wagatsuma Agar (Wagatsuma, 1968)

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Coleta das Amostras

As amostras frescas de mexilhões (*Mytilus edulis*), camarões sete-barbas (*Vipphonella kroyeri*) e de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*), foram coletadas em diferentes pontos de venda do litoral Norte do Estado de São Paulo. As amostras refrigeradas e congeladas desses produtos foram coletadas nos mercados municipais de Campinas/SP e de Piracicaba/SP, durante o período de agosto/88 a fevereiro/90. Foram transportadas em recipiente com gelo para o laboratório, sendo processadas dentro de um prazo não superior a doze horas.

3.2.2. Preparo das amostras

O preparo das amostras para o exame foi realizado de acordo com as normas descritas no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (1984) e de acordo com American Public Health Association (Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 1984).

a) Preparo dos mexilhões

Os mexilhões foram lavados com o auxílio de uma escova em água corrente, procedendo-se depois a abertura das conchas em condições assépticas e o conteúdo de 50g colocado em becker previamente esterilizado.

b) Preparo dos camarões

As amostras de camarões foram preparadas com 50g de camarões integrais e em condições assépticas foram colocados em becker esterilizado.

c) Preparo das sardinhas

Com o auxílio de um bisturi e uma pinça esterilizada, descamaram-se as sardinhas, retirando-se assepticamente 50g de amostra, compreendendo pele e músculo da parte dorsal, colocando-se em becker previamente esterilizado.

As amostras preparadas foram diluídas em 450ml de solução salina a 3%, homogeneizadas por dois minutos a 8000 rpm.

3.2.3 Isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

A metodologia usada foi a sugerida pela ICMSF(1978), que emprega a técnica do número mais provável-NMP, usando-se 4 séries de 3 tubos de Caldo Glucose Salt Teepol Broth (GSTB) com incubação a 37°C por 24 horas. Em seguida, selecionou-se as diluições mais altas que apresentavam turvação e procedeu-se o estriamento em ágar tiosulfato citrato sais biliares sacarose (TCBS), com incubação a 37°C por 18-24 horas. As colônias que se apresentavam verdes com o centro azul e pequenas eram as suspeitas para *Vibrio parahaemolyticus*.

Estas colônias foram inoculadas em ágar soja tripticase (TSA) adicionado de 2.5% de NaCl, incubadas a 35°C por 24 horas para posterior identificação de *Vibrio*.

Nas colônias isoladas foi realizada uma identificação presuntiva para *Vibrio* em meio VP proposto por KAPER et alii (1980), e mais os seguintes testes: características morfotintoriais; pelo método de Gram, pesquisa de citocromo oxidase, redução de nitrato, mobilidade e hidrólise de gelatina segundo a metodologia descrita por MacFADDIN (1980).

Foram realizados ainda os seguintes testes adicionais para a identificação de *Vibrio* segundo a metodologia usada por HOFER (1974): Teste Hugh-Leifson, glicose, teste de VMVP, teste de motilidade, fermentação de carboidratos (arabinose, inositol, lactose, manitol e sacarose), e crescimento a 42°C. O teste de sensibilidade ao composto 0-129 (2,4 - diamino - 6,7 - di - isopropil pteridine) foi feito de acordo com a metodologia descrita por KAPER et alii (1980).

A atividade hemolítica foi realizada de acordo com a metodologia usada por LEITÃO (1976).

Para a realização dos testes utilizados para a identificação, adotou-se o método de replicação múltipla descrito por CANHOS (1980). Neste método, trabalha-se simultaneamente com vinte culturas contidas em uma placa mestra, previamente preparada com o auxílio de um replicador para placas e tubos, contendo os meios próprios previamente esterilizados (Fotos 1 e 2 do Apêndice).

Foram preparadas várias placas mestras para cada conjunto de vinte culturas bacterianas, o que permitiu a realização de muitos testes ao mesmo tempo, já que havia inóculo suficiente.

3.2.4. Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados obtidos, foi utilizado o pacote estatístico SAS "Statistical Analysis System" do Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

No presente estudo, foram realizados dois tipos de análise estatística, com objetivo de se avaliar a incidência e a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em produtos de origem marinha.

Para avaliar a incidência, foi utilizada a análise descritiva, através da qual se determinou a média, moda, mediana, variância e o desvio padrão (Tabelas 3 e 4).

Para verificar a ocorrência, isto é, o grau de homogeneidade de proporções da positividade dessa bactéria entre os diferentes tipos de alimentos coletados, em diferentes épocas, foi usado o método estatístico Qui-quadrado (χ^2_n) de Pearson. No item Resultados constituiu-se tabelas contendo frequências observadas, porcentagens, valor do Qui-quadrado e nível descritivo (Tabelas de 5 a 10).

4. RESULTADOS

Foram analisados três tipos de produtos marinhos (mexilhões, camarões e sardinhas), perfazendo um total de 926 amostras das quais 212 (22,89%) apresentaram *Vibrio parahaemolyticus* (Tabela 2).

Pelos resultados obtidos, verifica-se que ocorreram variações entre os diferentes tipos de produtos com relação às amostras positivas. Estas variações foram avaliadas estatisticamente, apresentando resultados mais claros, principalmente quanto à incidência da bactéria e a homogeneidade das amostras na ocorrência da bactéria por amostra analisada.

As Figuras 1, 2 e 3 representam, graficamente, os resultados das Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Os resultados obtidos, evidenciaram acentuada variação na incidência de *Vibrio parahaemolyticus* entre os diferentes tipos de produtos examinados. Nas Figuras 1 e 2, observa-se que:

1. Ocorreram diferenças bastante evidentes quanto à variação da microflora de *Vibrio parahaemolyticus* entre os produtos analisados, ou seja, as amostras de camarões e de mexilhões apresentaram elevada incidência da bactéria, ao contrário das amostras de sardinhas que não apresentaram nenhuma incidência (Figura 3).
2. A incidência de *Vibrio parahaemolyticus* foi muito elevada em mexilhões frescos coletados durante o verão. O número de isolamento variou entre $1,0 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^2$ UFC/g, apresentando pontos extremos em torno de $3,5 \times 10^2$ UFC/g e raros pontos soltos.
3. No camarão (Figura 2) a maior incidência mostrou-se nas amostras refrigeradas coletadas durante o verão com valores entre $1,0 \times 10^2$ UFC/g e $2,0 \times 10^2$ UFC/g

com pontos extremos até $5,0 \times 10^2$ UFC/g. Não houve diferença significativa entre as amostras de camarões frescos coletados nas diferentes épocas.

4. Não houve diferenças entre as amostras congeladas, que independente do tipo e da época de coleta, não apresentaram incidência significativa.

Nas Tabelas 5,6,7,8, 9 e 10 estão resumidos os resultados obtidos, através da análise estatística utilizada, para verificar o grau de positividade para o *Vibrio parahaemolyticus*, nas amostras analisadas.

Nenhuma cultura isolada apresentou reação positiva no teste de KANA-GAWA.

5. DISCUSSÃO

Observando-se as Tabelas 3 e 4, verifica-se que, nenhuma das amostras de sardinhas examinadas apresentou *Vibrio parahaemolyticus*. O mesmo ocorreu em trabalhos desenvolvidos por LISTON & BARROSS (1973), FOSTER et alii (1977) e BATISTA (1987), que também não obtiveram um único isolamento dessa bactéria em peixes.

Esses resultados contrariam entretanto as pesquisas de BARROSS (1977) e de LEITÃO et alii (1976), que encontraram a bactéria em índices baixos (3,3% e 3,6% respectivamente) nas amostras de sardinhas analisadas.

HOFER & SILVA (1986), analisando 82 amostras de peixes de origem marinha e de diferentes espécies, detectaram 45% ou 54,8% de peixes portadores de *Vibrio parahaemolyticus*. Esses resultados confirmam uma ampla disseminação nas diversas espécies de peixes capturados no litoral brasileiro.

O mesmo não ocorreu com os mexilhões e camarões examinados no presente trabalho. De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2, observa-se que a presença de *Vibrio parahaemolyticus* é constante, tanto nos mexilhões como nos camarões analisados, variando sua incidência de acordo com as condições em que se encontravam e o período de coleta da amostra.

Isso confirma as observações de outros autores de que a referida bactéria apresenta uma distribuição bastante ampla no ambiente marinho independente do continente de localização (BARROSS & LISTON, 1968; BARROSS & LISTON, 1970; COLWELL et alii, 1973; e VANDERZANT & NICKELSON, 1972).

Tais resultados também são concordantes com LEITÃO & ARIMA (1975), que demonstraram a presença constante de *Vibrio parahaemolyticus* em águas costeiras do litoral paulista. Nessas condições, os microrganismos presentes na água podem ser ab-

sorvidos pelos animais marinhos e, encontrando condições favoráveis, iniciam um intenso processo de multiplicação, atingindo índices altíssimos de infestantes, transformando-se dessa forma num risco em potencial para a população.

Os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4, permitem uma observação mais minuciosa em relação ao estado em que se encontravam os camarões examinados, nas diferentes épocas de coleta, sobre a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*.

Verifica-se que a maior frequência da bactéria ocorreu nas amostras frescas (57,14%), seguida das refrigeradas (34,15%). Tais resultados também são concordantes com as observações feitas por LEITÃO et alii (1976), BARROSS (1977) e LOPES (1984).

VANDERZANT & NICKELSON (1972), obtiveram resultados semelhantes avaliando a incidência dessa bactéria em camarões frescos e refrigerados. Os autores constataram que a incidência do *Vibrio parahaemolyticus* em camarões frescos foi maior do que em camarões refrigerados.

JOHNSON, BARROSS & LISTON (1971), também em estudos sobre a ocorrência dessa bactéria em camarões frescos e resfriados, obtiveram resultados que mostram os camarões resfriados com uma maior incidência de *Vibrio parahaemolyticus* do que em camarões frescos.

O mesmo não ocorreu com LEITÃO et alii (1976), que de 30 amostras de camarões originárias do litoral de São Paulo, obtiveram apenas 6,6% de amostras positivas para *Vibrio parahaemolyticus*. Índices semelhantes obteve FRANÇA (1980), ao analisar camarões originários de águas costeiras de Salvador-Bahia.

A frequência de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras congeladas foi muito baixa, não ultrapassando a 10%. Esses resultados não são concordantes com os resultados obtidos por BARROSS & VIANNI (1980), que estudando a qualidade higiênico-sanitária em camarões congelados, não encontrou nenhum microrganismo patogênico nas amostras analisadas.

Segundo BARROSS et alii (1977), o *Vibrio parahaemolyticus*, apesar de ser muito sensível a baixas temperaturas, resiste a temperaturas entre 4°C e 12°C por 3 a 4 semanas especialmente em carne de marisco, camarão e caranguejo. É possível que este comportamento do *Vibrio parahaemolyticus* esteja relacionado com a quantidade

de células que contém o produto, pois o tempo de geração dessa bactéria é muito rápido, podendo em um certo espaço de tempo atingir índices perigosos para a saúde pública.

Pelos dados apresentados na Tabela 5, verifica-se que a ocorrência da bactéria nas amostras de camarão foi maior durante o verão (52,90%) do que durante o inverno (25,91%). Esses resultados coincidem com as observações de BARROSS & LISTON (1968), SAKAZAKI (1973) e LEITÃO (1975), que constataram uma incidência muito reduzida dessa bactéria em águas, sedimentos e camarões durante os meses de inverno.

De acordo com os resultados das Tabelas 6 e 7, observa-se que a frequência de *Vibrio parahaemolyticus* foi muito elevada tanto nas amostras de mexilhões frescos e resfriados durante o verão como durante o inverno. O mesmo não ocorreu para as amostras congeladas, que durante o verão apresentaram apenas 6% de positividade.

Pela Tabela 8, verifica-se que a frequência de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras de mexilhões e camarões coletados durante o verão, mostrou-se bastante alta, muito embora as amostras de camarões apresentem maior índice.

BARROSS & LISTON (1970), em trabalhos realizados sob outras condições, constataram 100% de positividade nas amostras de ostras, coletadas no litoral de Washington.

Além do elevado índice de ocorrência, observado nas tabelas apresentadas, a microflora de *Vibrio parahaemolyticus* presente nos produtos analisados, principalmente nos mexilhões frescos, mostrou-se bastante acentuada conforme fica evidenciado na Figura 1.

Observando as Figuras 1 e 2, verifica-se que ocorreram variações na incidência da referida bactéria entre as amostras de camarões e mexilhões frescos e refrigerados ($1,0 \times 10^2$ UFC/g a $5,0 \times 10^2$ UFC/g).

Esses resultados também concordam com aqueles obtidos por outros pesquisadores fazendo trabalhos semelhantes.

JOHNSON et alii (1971), mencionaram uma contaminação média em ostras de $5,0 \times 10^4$ /g com uma variação entre 10^2 a 10^5 /g.

BARTLEY & SLENETZ (1971) constataram uma contaminação média

em amostras de camarões de $5,0 \times 10^2/\text{g}$.

LEITÃO (1976), constatou uma contaminação média de $8,1 \times 10^3$ e $4,1 \times 10^3/\text{g}$ em ostras refrigeradas e frescas respectivamente.

Por essas evidências e pelos resultados da avaliação estatística, apresentados nas Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10, rejeitamos a hipótese de que existe homogeneidade na ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* entre as diferentes amostras analisadas com nível descritivo p , dado respectivamente em cada tabela. Isso significa que existe diferença entre os tipos de amostras refrigeradas, congeladas e frescas no inverno e verão para mexilhões e camarões.

Observa-se também que a maior ocorrência da bactéria ocorreu no mexilhão durante o verão. Provavelmente em virtude desses animais em seu processo de alimentação e respiração, aspirarem e expelirem quantidades muito grande de água. Nessa atividade, através de um mecanismo de filtração, absorvem nutrientes e, em função desse processo, podem estar sujeitos a uma intensa contaminação, desde que se localizem em águas contaminadas.

Observando-se as Figuras 1 e 2 as amostras refrigeradas mostram um elevado índice da referida bactéria, verificando-se também que ocorre uma diferença muito acentuada entre as amostras de camarões e mexilhões refrigerados, ou seja, os camarões refrigerados apresentaram uma contaminação muito superior aos mexilhões refrigerados no verão.

THOMPSON & THACKER (1973), evidenciaram que o *Vibrio parahaemolyticus* multiplicava-se com relativa rapidez quando ostras e mexilhões eram armazenados a 8°C, perdendo, entretanto, a viabilidade quando estes eram estocados a temperaturas de 4° e 0°C.

GOATHER et alii (1974), observaram que a sobrevivência do *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos processados e estocados a 5°C era muito variável, dependendo da linhagem da bactéria e do grau de contaminação inicial; a perda da viabilidade era maior nas primeiras vinte e quatro horas de armazenamento e, em alguns casos, a redução da microflora alcançava três ciclos logarítmicos.

Tais resultados sugerem que as condições de armazenamento dos camarões e mexilhões examinados no presente trabalho não foram adequados, uma vez que seria de se esperar uma sensível redução na microflora de *Vibrio parahaemolyticus*, quando comparada àquelas dos produtos frescos.

Pode-se observar pela Figura 1, que a incidência da bactéria em mexilhões frescos foi maior do que em camarões frescos no verão.

A causa primordial dessa contaminação, possivelmente deva ser em virtude da característica fisiológica nutricional que é típica de animais filtradores. Deve-se reconhecer que estes possuem uma capacidade muito grande de retenção de inúmeros microrganismos, uma vez que, todo o material que serve de alimento é acumulado nas faces inalantes das lamelas branquiais do animal.

6. FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de mexilhão coletadas em diferentes condições e épocas.

Figura 2 - Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de camarão coletadas em diferentes condições e épocas.

Figura 3 - Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de sardinha coletadas em diferentes condições e épocas.

Tabela 2 - Percentual de amostras positivas para *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões, camarões e sardinhas

Natureza da Amostra	Nº de Amostras Examinadas	Nº de Amostras Positivas	%
Mexilhões	250	96	38,40
Camarões	290	116	40,00
Sardinhas	383	0	0,00
Total	926	212	22,89

Tabela 3 - Avaliação estatística, descritiva, da incidência de *Vibrio parahaemolyticus* no inverno

Produto	Nº de		Média	Moda	Mediana	Variância	D.P.
	Obs.						
Camarão							
Fresco	35	0,685719	1	1	0,457193	0,676123	
Refrigerado	41	0,463415	0	0	0,504878	0,710548	
Congelado	59	0	0	0	0	0	
Mexilhão							
Fresco	30	0,9	0	1	0,782759	0,884736	
Refrigerado	40	0,425	0	0	0,558333	0,747217	
Congelado	32	0	0	0	0	0	
Sardinha							
Fresca	64	0	0	0	0	0	
Refrigerada	64	0	0	0	0	0	
Congelada	64	0	0	0	0	0	

Tabela 4 - Avaliação estatística, descritiva, da incidência de *Vibrio parahaemolyticus* no verão

Produto	Nº de					
	Obs.	Média	Moda	Mediana	Variância	D.P.
Camarão						
Fresco	64	0,765625	0	1	0,75372	0,868171
Refrigerado	61	1,262295	1	1	1,230055	1,109078
Congelado	31	0,096774	0	0	0,90323	0,300537
Mexilhão						
Fresco	40	2,025	1	2	1,563462	1,20385
Refrigerado	59	0,576271	0	0	0,662186	0,8135748
Congelado	50	0,06	0	0	0,057551	0,239898
Sardinha						
Fresca	64	0	0	0	0	0
Refrigerada	64	0	0	0	0	0
Congelada	64	0	0	0	0	0

Tabela 5 - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de camarão coletadas no inverno em diferentes condições

Condições	Positivo	Negativo	Total
Fresco	20 57,14%	15 42,86%	35
Refrigerado	14 34,15%	27 65,85%	41
Congelado	0 0,00%	59 100,00%	59
Total	34 25,19%	101 74,81%	135 100,00%
$\chi^2_2 = 40,580$			$p=0,0001$

Tabela 6 - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de camarão coletadas no verão em diferentes condições

Condições	Positivo	Negativo	Total
Fresco	34 53,12%	30 46,88%	64
Refrigerado	45 73,74%	16 26,26%	61
Congelado	3 10,00%	27 90,00%	30
Total	82 52,90%	73 47,10%	155 100,00%
$\chi^2 = 32,825$		p=0,0001	

Tabela 7 - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de camarão coletadas em diferentes estações

Estação	Positivo	Negativo	Total
Inverno	34 25,19%	101 74,81%	135
Verão	82 52,90%	73 47,10%	155
Total	116 60,00%	174 40,00%	290 100,00%
$\chi^2_1 = 23,098$			$p=0,0001$

Tabela 8 - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de mexilhão coletadas no verão em diferentes condições

Condições	Positivo	Negativo	Total
Fresco	40 100,00%	0 0,00%	40
Refrigerado	25 42,37%	34 57,63%	59
Congelado	3 6,00%	47 94,00%	50
Total	68 45,64%	81 54,36%	149 100,00%
$\chi^2_2 = 79,564$		$p = 0,0001$	

Tabela 9 - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de mexilhão coletadas no inverno em diferentes condições

Condições	Positivo	Negativo	Total
Fresco	17 56,67%	13 43,33%	30
Refrigerado	11 27,50%	29 72,50%	40
Congelado	0 0,00%	31 100,00%	31
Total	28 27,72%	73 72,28%	101 100,00%
$\chi^2 = 96,186$			$p = 0,0001$

Tabela 10 - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de mexilhão coletadas em diferentes estações

Estação	Positivo	Negativo	Total
Inverno	28 27,72%	73 72,28%	101
Verão	68 45,64%	81 54,36%	149
Total	96 38,40%	154 61,60%	250 100,00%
$\chi^2_1 = 8,167$		p=0,004	

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem algumas conclusões gerais:

- a) As contagens de *Vibrio parahaemolyticus* encontradas para as amostras de mexilhões e camarões utilizadas, variaram de 2.5 a 5.0×10^2 /g, números que embora pareçam estar bem distantes da dose infectante dessa bactéria que oscila de 10^6 a 10^9 células viáveis, podem atingir rapidamente a dose infectante se as condições de armazenamento e/ou manipulação não forem adequadas.
- b) Os resultados obtidos sugerem que, dentre os alimentos de origem marinha estudados, os lamelibrânquios (moluscos) são os de maior importância quanto ao aspecto de saúde pública. Deve-se acrescentar, ainda, que ao contrário de peixes e crustáceos, os mexilhões são comumente consumidos crus, sem prévia cocção ou aplicação de quaisquer tratamentos, que pudessem reduzir a microbiótica contaminante, aumentando-se, conseqüentemente o risco de infecção alimentar.
- c) A presença da bactéria nos produtos refrigerados, indica a necessidade de maiores cuidados higiênicos na obtenção, armazenamento, distribuição e manipulação destes produtos.
- d) Os resultados encontrados demonstram ainda que, um maior controle por parte dos poderes públicos, deveria ser executado, visando, se não acabar pelo menos minimizar os riscos de infecção alimentar por *Vibrio parahaemolyticus* em função da comercialização inadequada de produtos tão perecíveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Laboratory procedures for the examination of seawater and shellfish. 15.ed. Washington, 1984. 143p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual* 5.ed. Washington, 1978, p.71.

BARKER, W.H. *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *Vibrio parahaemolyticus*, Tokyo, 1974. Tokyo, Saikon Publ., 1974, p.47-52.

BARKER, W.H.; WEAVER, E.R.; MORRIS, K.G.; MARTINS, T.W. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* infections in humans. In: SCHLESSINGER, P., ed. *Microbiology*. Washington, American Society for Microbiology, 1974. p. 257-62.

BARROSS, G.C. *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em crustáceos e moluscos da Bahia de Sepetiba. Rio de Janeiro, 1977 70p. (Mestrado - Universidade Federal Fluminense).

BARROSS, G.C. & VIANNI, M.C.E. *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em águas da Baía de Guanabara. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, México, 22: 163-9, 1980.

BARROSS, G.C.; ROBBS, P.G.; SOARES, L.C. Estudo microbiológico em camarão descascado e congelado, destinado ao consumo no Rio de Janeiro. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, México, 19: 203-8, 1977.

- BARROSS, J. & LISTON, J. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature*, London, **213**: 1263-4, 1968.
- BARROSS, J. & LISTON, J. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Applied Microbiology*, Washington, **20**: 176-9, 1970.
- BARTLEY, C.H. & SLANETZ, L.W. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine waters and oyster of New Hampshire. *Applied Microbiology*, Washington, **20**: 965-6, 1971.
- BATISTA, V.R.C. Detecção e enumeração de bactérias de significância à saúde Pública em sardinha (*Sardinella brasiliensis*, STEINDACHNER, 1978) "IN NATURA" consumida na região da Grande Florianópolis, Santa Catarina. Campinas, 1987. 77p. (Mestrado - Universidade de Campinas).
- BAUMANN, P. & BAUMANN, L. Phenotypic characterization of *Beneckea*: a preliminary report. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, **36**: 214-9, 1973.
- BAUMANN, P.; BAUMANN L.; REICHELT, J.L. Taxonomy of marine bacteria: *Beneckea parahaemolytica* and *Beneckea alginolytica*. *Journal of Bacteriology*, Washington, **11**: 1144-55, 1973.
- BAUMANN, P.; FURNISS, A.L.; LEE, J.V. Genus I. *Vibrio*. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984. v.1, p.518-38, 1984.
- BEUCHAT, L.R. Interacting effects of pH, temperature and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, Washington, **25**: 844, 1973.
- BEUCHAT, L.R. Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, Washington, **27**: 1075, 1974.

- BEUCHAT, L.R. Environmental factors effecting survival and growth of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, **38**: 476-80, 1977.
- BEUCHAT, L.R. *Vibrio parahaemolyticus*: public health significance. *Food Technology*, Chicago, **52**: 80-90, 1982.
- BLAKE, P.A.; WEAVER, R.E.; HOLLIS, D.G. Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, **34**: 341-67, 1980.
- BOUTIN, K.B.; REYES, L.N.; PEELER, P.J.; TWEDT, M.R. Effect of temperature and suspending vehicle on survival of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. *Journal of Food Protection*, Ames, **48**: 875-8, 1985.
- BROEK, M.J.M.; MOSSEL, A.D.; EGGENKAMP, E.A. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Dutch Mussels. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, **37**: 438-42, 1979.
- CANHOS, V.P. Microorganisms isolated from sand filtered by water and the proteolytic activity of a *Flavobacterium* isolate. Oregon, 1980. 341 p. (Doutorado - Oregon State University).
- CANN, D.C.; TAYLOR, L.Y.; MERICAN, Z. A study of the incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Malaysian shimp undergoing processing for export. *Journal of Hygiene*, Cambridge, **87**: 485-91, 1981.
- COLWELL, R.R. & LISTON, J. Microbiology of shellfish bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology*, Washington, **8**: 104-9, 1960.
- COLWELL, R.R.; LOVELACE, T.E.; WAN, L.; KANEKO, T.; STALEY, T.; CHEN, P.K.; TUBIASH, H. *Vibrio parahaemolyticus* isolation, identification, classification and ecology. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, **36**: 202-13, 1973.

- COUVERT, D. & WOODBURN, M. Relationships of temperature and sodium chloride concentration to the survival of *Vibrio parahaemolyticus* in broth and fish homogenate. *Applied Microbiology*, Washington, **2B**: 321-5, 1972.
- CRISLEY, D. & DELMORE, P.R. Thermal Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in Clam homogenate. *Journal of Food Protection*, Ames, **42**: 131-4, 1979.
- DAVIS, J.W. & SIZEMORE, K. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) Collected from Galveston Bay Texas. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, **43**: 1092-7, 1981.
- DePAOLA, A.; HOPKINS, H.L.; PEELER, T.J.; WENTZ, B.; McPHEARSON, M.R. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Coastal Water and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, **58**: 2299-302, 1990.
- EARLE, P.M. & CRISLEY, D.F. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from Cape Cod Soft-Shell Clams *Mya arenaria*. *Applied Microbiology*, Washington, **29**: 635-40, 1975.
- FISHBEIN, M. & WENTZ, B. *Vibrio parahaemolyticus* methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, **36**: 118-23, 1973.
- FISHBEIN, M.; MEHLMAN, I.J.; PITCHER, J. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the processed meat of Chesapeake Bay blue crabs. *Applied Microbiology*, Washington, **20**: 176-8, 1970.
- FOSTER, J.F. A microbial survey of various fresh and frozen seafood products. *Journal of Food Protection*, Ames, **40**: 300-3, 1977.
- FRANÇA, S.M.C.; GIBBS, D.L.; SAMUELS, P.; JOHNSON, W.D. *Vibrio parahaemolyticus* in brazilian coastal waters. *Jama*, Chicago, **6**: 587-8, 1980.
- FUJINO, T.; OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAI, K.; MUKAI, T.; VEHO, T. On the bacteriology examination of shirasu food poisoning. *Medical Journal of Osaka University*, Osaka, **4**: 229-4, 1953.

- GOATCHER, L.J.; ENGLER, S.E.; WAGNER, D.C.; WESTHOFF, D.C. Effect of storage at 5°C on survival of *Vibrio parahaemolyticus* in processed Maryland oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, **37**: 74-7, 1974.
- HACKNEY, R.C. & SPECK, L.M. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in the microbiological quality of seafood in North Carolina. *Journal of Food Protection*, Ames, **43**: 769-73, 1980.
- HOFER, E. Métodos de isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. *Revista do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, (**31**): 22, 1974.
- HOFER, E. & SILVA, C. Isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* de material de peixes de origem marinha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 5., Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro, s.ed. 1974. p.193.
- HOFER, E. & SILVA, C. Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de peixes capturados no litoral brasileiro. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **17**: 327-31, 1986.
- HORIE, S.; SAHEKI, K.; OKUZUMI, M. Quantative enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in sea and estuarine waters. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Tokyo, **33**: 126-30, 1967.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. Toronto, University of Toronto, 1978. p.213-433.
- JAY, J.M. Microbiologia moderna de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1973. 319p.
- JOHNSON, H.C. & LISTON, J. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to cold oyster, fish jillets and crabmeat. *Journal of Food Science*, Chicago, **38**: 437-41, 1973.

- JOHNSON, H.C.; BARROSS, J.A. LISTON, J. *Vibrio parahaemolyticus* and its importance in seafood hygiene. *Journal of the American Veterinary Medical Association Science*, Schaismburg, **159**: 1470-3, 1971.
- JOHNSON, W.G.; SALINGER, A.C.; KING, W.C. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock at two different storage temperatures. *Applied Microbiology*, Washington, **26**: 122-3, 1973.
- JOSEPH, S.W.; COLWELL, R.R.; KAPER, J.B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Critical Reviews in Microbiology*, Boca Raton, **10**: 77-124, 1982.
- KAISNER, A.C.; ABEYTA, C.; STOTT, F.R.; KRANE, H.M.; WEKELL, M.M. Enumeration of *Vibrio* species including *Vibrio cholerea*, from samples of an oyster growing area, grays harbor. *Journal of Food Protection*, Ames, **53**: 300-1, 1990a.
- KAISNER, A.C.; ABEYTA, C.; STOTT, F.R.; KRANE, H.M.; WEKELL, M.M. Incidence of Urea-Hydrolysing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, **56**: 904-7, 1990b.
- KAISNER, A.C.; TAMPLIN, L.M.; WEKELL, M.M.; STOTT, F.R.; COLBURN, G.K. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostea virnica*) and effects of isolation medium on Recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, **55**: 3072-9, 1989.
- KANEKO, T. & COLWELL, R.R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*, Washington, **113**: 24-32, 1973.
- KANEKO, T. & COLWELL, R.R. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and related organisms in the Atlantic Ocean of South Carolina and Georgia. *Applied Microbiology*, Washington, **28**: 1009-17, 1974.
- KANEKO, T. & COLWELL, R.R. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Applied Microbiology*, Washington, **30**: 251-7, 1975.

- KANEKO, T. & COLWELL, R.R. The cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microbiology Ecology*, New York, 4: 135, 1978.
- KAPER, J.B.; REMMERS, F.E.; COLWELL, R.R. A medium for presumptive identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, Ames, 43: 936-8, 1980.
- KATOH, H. Studies on the growth rate of various food bacteria. I. On the generation time of *Vibrio parahaemolyticus* FUJINO. Japan. *Journal of Bacteriology*, Washington, 20: 94, 1965.
- KAWATAWA, T. Fish borne food poisoning in Japan. In: BORGSTROM, G.; ed. Fish as food. New York, Academic Press, 1961. v.2., p.467-79.
- KRANTZ, G.E.; COLWELL, R.R.; LOVELANCE, E. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab *Callinectes sapidus*. in Chesapeake Bay. *Science*, Washington, 164: 1286-7, 1969.
- KWONG YU CHAN, M.C. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with foods in Hong Kong. *Journal of Applied Bacteriology*, Washington, 66: 54-7, 1989.
- LEE, J.S. What seafood processors should know about *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Milk Food Technology*, Ames, 36: 405-8, 1973.
- LEITÃO, M.F. & ARIMA, H.K. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo - ocorrência na água e avaliação da metodologia para isolamento. *Coletânea do ITAL*, Campinas, 6: 146-66, 1975.
- LEITÃO, M.F.; ARIMA, H.K.; KAI, I. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo. Incidência em amostras de peixes, moluscos e crustáceos. *Coletânea do ITAL*, Campinas, 7: 181-90, 1976.
- LISTON, J. & BARROSS, J. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the natural environment. *Journal of Milk Food Technology*, Ames, 36: 113-7, 1973.

- LOPES, R.H. Pesquisa de *Vibrio sp.* e outros microrganismos gram negativos em mariscos. Rio de Janeiro, 1984. 58 p. (Graduação - Universidade Estadual do Rio de Janeiro).
- LOTZ, M.J.; TAMPLIM, M.L.; RODRICK, G.E. Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar and its selectivity for clinical and marine vibrio organisms. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, Philadelphia, **13**: 45-8, 1983.
- MacFADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacterial, 2.ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1980. p.597.
- MADDEN, N.J. *Vibrio* significance pathogen and control measures. *Food Technology*, Chicago, **42**: 191-2, 1988.
- MIYAMOTO, Y.; NAKAMURA, K.; TAKIZAWA, N. Pathogenic halophyles. Proposals of a new genus "*Oceanomonas*" and of the amend species names. *Japanese Journal Microbiology*, Tokyo, **5**: 477-86, 1961.
- MIYAMOTO, Y.; NAKAMURA, K.; TAKIZAWA, T. Seasonal distribution of *Oceanomonas sp.* halophilic bacteria in the coastal sea. Its significance in epidemiology and marine industry. *Japanese Journal Microbiology*, Tokyo, **6**: 141-58, 1962.
- MIYAMOTO, Y.; KATO, T.; OBARA, Y.; TAKIZAWA, K. In vitro hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, Washington, **100**: 1147-9, 1969.
- MURCHELANO, R.A. & BROWN, C. Bacteriological study of natural flora of the Earstern. Oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal Invertebrate Pathology*, Washington, **11**: 519-20, 1968.
- NAVA FERNANDEZ, L.M.; PARRILLA CERRILLO, M.C.; SALCEDO CLAVANIETA, N. Aislamento de *Vibrio parahaemolyticus* de Ostiones em Mexico, D.F. *Salud Publica Mexicana*, Mexico, **23**: 275-9, 1981.
- RAJ, H. & BERGDOLL, M.S. Survey of bacteria of Public Health significance in frozen seafoods. *Food Technology*, Chicago, **15**: 429-33, 1961.

- RODRIGUES, P.D. Detecção de bactérias potencialmente patogênicas no ecossistema água-ostra da Bahia de Sepetiba. Rio de Janeiro, 1983. 41p. (Mestrado - Universidade Federal Fluminense).
- SAKAZAKI, R. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophatic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Microbiological, cultural and biochemical properties and its taxonomic position. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, Tokyo, 16: 161-88, 1963.
- SAKAZAKI, R. Recent trends of *Vibrios parahaemolyticus* as causative agent of food poisoning. In: HOBBS, B.C. & CHRISTIAN, J.G.H., ed. The microbiological safety of food. London Academic Press, 1973. p.19-30.
- SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; FUKUMI, H. Studies on the enteropathogenic facultatively halophatic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, Tokyo, 16: 161-88, 1965a.
- SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; TAMURA, K. Studies on the Enteropathogenic. Facultatively Halophilic Bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* II. Serological characteristics. *Japanese Journal Medical Science and Biology*, Tokyo, 21: 313-24. 1969a.
- SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; TAMURA, K. In vitro hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*, its correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, Washington, 100: 1147-9, 1969b.
- SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAI, S.; HOBBO, K. Studies on the enterophilic genic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* III. Enteropathogenicity. *Japanese Journal Medical Science Biology*, Tokyo, 21: 325-31, 1965b.
- SHEWAN, J.M. Food poisoning caused by fish and fishery products. Fish as food. New York, Academic Press, 1961. v.2., p.443-60.

- SHIARIS, P.M.; REX, C.A.; PETTIBUNE, W.G.; KEAY, K.; McMANUS, P.; REX, A.M.; EBERSOLE, J.; GALLAGHER, E. Distribution of Indicator Bacteria and *Vibrio parahaemolyticus* in Sewage-Polluted Intertidal Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 53: 1756-61, 1987.
- SPECK, M.L. ed. Compendium of methods for the microbiological. 2.ed., Washington, American Public Health Association, 1984. 914p.
- SPITE, G.T.; BROWN, D.F.; TWEDT, M.R. Isolation of enterophogenic, Kanagawa-positive strain of *Vibrio parahaemolyticus* implicated in acute gastroenteritis. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 35: 1226-8, 1978.
- TAKIKAWA, L. Studies on pathogenic halophilic bacteria. *Yokohama Medical Bulletin*, Yokohama, 2: 313, 1958.
- TEPEDINO, A.A. *Vibrio parahaemolyticus* in Long Island oysters. *Journal of Food Protection*, Ames, 45: 150-1, 1982.
- THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. Analisis microbiologico de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1973. 271p.
- THOMPSON, C.A. & VANDERZANT, C. Relationships of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters, water and sediment, and bacteriological and environment indices. *Journal Food Science*, Chicago, 41: 116-7, 1976.
- THOMPSON, W.K. & THACKER, L.C. Effect of temperature of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Food Science and Technology*, Chicago, 6: 156-8, 1973.
- TISON, D.L. & SEIDLER, R.J. *Vibrio vulnificus* Biogroup 2: New Biogroup pathogenic for Eel. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 44: 640-6, 1983.
- TOOD, E.C.D. Foodborne disease in six countries - a comparison. *Journal of Food Protection*, Ames, 41: 559-65, 1978.

- TWEDT, R.M.; PELLER, T.J.; SPAULDING, T. Effective ileal loop dose of KANAGAWA positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, Washington, 40: 1012-6, 1980.
- TWEDT, R.M.; SPAULDING, P.L.; HALL, H.E. Morphological cultural biochemical, and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolates in the United States. *Journal of Bacteriology*, Washington, 98: 511-8, 1969.
- VANDERZANT, C. & NICKELSON, R. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Applied Microbiology*, Washington, 23: 34-7, 1972.
- VANDERZANT, C. & THOMPSON, A.C. Microbial floral and level of *Vibrio parahaemolyticus* of oysters (*Crassostrea virginia*) water and sediment from Galveston Bay. *Journal of Milk Food Technology*, Ames, 30: 447-52, 1973.
- VENKATESWARAN, K.; NAKANO, H.; OKABE, T.; TAKAYAMA, K.; MATSUDA, O.; HASHIMOTO, H. Occurrence and Distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp., and *Clostridium botulinum* in Seto Inland, sea of Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 55: 559-67, 1989.
- WAGATSUMA, S. A medium for test of hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle*, Tokyo, 13: 159, 1968.
- ZEBRAL, A.A. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em água da Baía de Salvador. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 10., Rio de Janeiro, 1980. Resumos. Rio de Janeiro, 1980. p.71.
- ZEN YOJI, H. Epidemiology, enteropatogenicity, and classification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, 115: 436-44, 1965.

APÊNDICE

Foto 1 Detalhe do replicador múltiplo e da replicação em placas.

Foto 2 Detalhe da estante de alumínio e da replicação em tubos.