

**OCORRÊNCIA DE *Clostridium botulinum* EM AMOSTRAS DE  
ALGUMAS ESPÉCIES DE PESCADO COLHIDAS NO LITO-  
RAL DO ESTADO DE SÃO PAULO**

**IVONE DELAZARI**

**Orientador: 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: Tecnologia de Alimentos.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Abril, 1982

*À minha mãe,  
pelo apoio e estímulo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão, Diretor de Pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos pelas sugestões e auxílio prestados na elaboração desta pesquisa;

Ao Dr. Renato Sérgio Papini, Diretor do Instituto de Tecnologia de Alimentos pelo apoio oferecido à realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Rodolpho de Camargo, pela orientação segura, estímulo e confiança durante a execução desta pesquisa;

Ao Dr. Matagiro Kai, pelo auxílio prestado na coleta e transporte de amostras;

Ao Farmacêutico-Bioquímico Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelo apoio e consideração;

Ao Engenheiro Agrônomo Júlio Cesar Medina pela colaboração na revisão do texto;

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade de realizar o Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

## ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMENTOS .....  | iii.   |
| LISTA DE TABELAS .....  | v.     |
| LISTA DE FIGURAS .....  | vii.   |
| RESUMO .....  | viii.  |
| SUMMARY .....   | x.     |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....  | 6      |
| 2.1. Epidemiologia de <i>Clostridium botulinum</i> .....  | 6      |
| 2.1.a - Características Gerais da Bactéria<br><i>Clostridium botulinum</i> .....                    | 6      |
| 2.1.b - Condições Gerais para o Desenvolvi <u>me</u><br>mento de <i>Clostridium botulinum</i> ..... | 14     |
| 2.1.c - Isolamento a <i>Clostridium botulinum</i> .....   | 21     |
| 2.1.d - Ocorrência no meio aquático .....   | 23     |
| 2.1.e - Ocorrência em alimentos .....   | 35     |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 37     |
| 3.1. Caracterização, coleta e preparo das amostras .  | 37     |
| 3.2. Determinação de culturas tóxicas .....   | 42     |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 50     |
| 5. CONCLUSÕES .....   | 72     |
| 6. LITERATURA CITADA .....  | 75     |

## LISTA DE TABELAS

| Tabela   | Página |
|--|--------|
| 1. Dados sobre a ocorrência de botulismo em vários paí <u>ses</u> .....  | 13     |
| 2. Positividade para <i>Clostridium botulinum</i> em amostras de pescado .....   | 50     |
| 3. Tipos de <i>Clostridium botulinum</i> isolados a partir de 500 amostras de pescado .....  | 52     |
| 4. Positividade para <i>C. botulinum</i> em extratos obtidos à partir da inoculação de vísceras de pescada-fogue <u>te</u> meios de enriquecimento ..... | 53     |
| 5. Positividade para <i>C. botulinum</i> em extratos obtidos a partir da inoculação de vísceras de bagre-do-mar, em meio de enriquecimento .....         | 56     |
| 6. Isolamento de <i>C. botulinum</i> a partir da inoculação de sedimentos de cultura de vísceras de bagre-do-mar em meio de isolamento                   | 57     |
| 7. Positividade para <i>C. botulinum</i> em extratos obtidos a partir de inoculação de vísceras de sardinha-verdadeira em meio de enriquecimento .....   | 60     |

| Tabela   | Página |
|--|--------|
| 8. Positividade para <i>C. botulinum</i> em extratos obtidos a partir da inoculação de vísceras e cefalotórax de camarão-sete-barbas em meio de enriquecimento ..... | 62     |
| 9. Isolamento de <i>C. botulinum</i> a partir da inoculação de sedimentos de culturas de vísceras e cefalotórax de camarão-sete-barbas em meio de isolamento .....   | 63     |
| 10. Positividade para <i>C. botulinum</i> em extratos obtidos a partir da inoculação de ostras em meio de enriquecimento .....                                       | 65     |
| 11. Isolamento de <i>C. botulinum</i> a partir de sedimentos de culturas de ostras inteiras em meio de isolamento.   | 66     |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura  | Página |
|---|--------|
| 1. Metodologia utilizada na detecção e isolamento de <i>Clostridium botulinum</i> a partir de amostras de vários tipos de pescado ..... | 49     |
| 2. Morfologia das colônias de <i>C. botulinum</i> tipo B em meio de TS-gema de ovo .....  | 69     |
| 3. Morfologia das colônias de <i>C. botulinum</i> tipo B em meio de TPEG-gema de ovo .....  | 69     |
| 4. Características morfológicas das colônias de <i>C. botulinum</i> tipo B em meio de TS-gema de ovo .....                              | 70     |
| 5. Características morfológicas das colônias de <i>C. botulinum</i> tipo B em meio de TPEG-gema de ovo .....                            | 70     |
| 6. Colônias de <i>C. botulinum</i> tipo E em meio de Sacarose-gema de ovo .....   | 71     |
| 7. Colônias de <i>C. botulinum</i> tipo E após a adição de <u>lu</u> gol em meio de Sacarose-gema de ovo .....                          | 71     |

RESUMO

OCORRÊNCIA DE *Clostridium botulinum* EM AMOSTRAS DE  
ALGUMAS ESPÉCIES DE PESCADO COLHIDAS NO LITORAL DO  
ESTADO DE SÃO PAULO

Ivone Delazari

Rodolpho de Camargo

A presente pesquisa visou à avaliação da ocorrência de *Clostridium botulinum* em várias espécies de pescado, incluindo peixes de escama e de couro, crustáceos e moluscos.

Um total de 500 amostras foram examinadas, compreendendo a pescada-foguete, bagre-do-mar, sardinha-verdadeira, camarão-sete-barbas e ostras. Deste total, 135 amostras (27,0%) apresentaram toxicidez indicativa da presença de *C. botulinum*, quando extratos de culturas eram inoculados intra



peritonealmente em pares iguais de camundongos suíços (*Mus musculus*). A maior frequência de contaminação foi constatada em camarões (35,0%), seguindo-se as amostras de ostras (34,0%) e de pescada-foguete e bagre-do-mar, com 31,0% cada uma. O menor índice de contaminação por *C. botulinum* foi verificado em sardinhas (4,0%).

Os resultados obtidos pelo exame de amostras de peixes sugerem que fatores tais como hábitos alimentares e "habitat" influenciam grandemente nos níveis de contaminação, sendo maiores nas espécies demersais (pescada-foguete e bagre-do-mar) e menores nas espécies pelágicas (sardinha).

O *C. botulinum* tipo E foi positivado com maior frequência (13,8%), seguido dos tipos F (4,6%), B (3,0%), A (2,6%) e tipos não identificados (1,6%) provavelmente tipos C ou D. Por outro lado, observou-se também a ocorrência de amostras contendo mais de um tipo de *C. botulinum*, na frequência de 5,1%.

Foi também realizada uma avaliação sobre a adequação da metodologia normalmente utilizada na detecção de *C. botulinum*. Os resultados revelaram que pela efetivação de estrias de isolamento a partir do centrifugado (sedimentos) de culturas, era muito aumentada a possibilidade de isolamento desta bactéria, principalmente quando mais de um tipo era presente na amostra.

Verificou-se, também, que pelo uso do teste de iodo, aplicado às colônias isoladas em placas de sacarose-gema de ovo-ágar, resulta em um rápido e eficiente método presuntivo para a detecção do tipo E.

## SUMMARY

### OCCURRENCE OF *Clostridium botulinum* IN SOME FISH SPECIES SAMPLING COLLECTED IN COASTLAND OF THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Ivone Delazari

Rodolpho de Camargo

This research is concerned with the occurrence of *Clostridium botulinum* in some species of fish, shelfish (oysters) and crustaceans (shrimps).

Five hundred samples were examined, consisting of one hundred specimens each of white fish, catfish, sardines, shrimps and oysters.

One hundred and thirty five samples (27,0%) showed toxicity, indicating the presence of *C. botulinum* when culture extracts were inoculated intraperitonially in matched

pairs of swiss mice (*Mus musculus*). The highest frequency of toxicity was observed in shrimps (35,0%) followed by oysters (34,0%), cat fish (31,0%) and white fish (31,0%). Sardines showed the lowest level (4,0%) of contamination.

The results suggest that feeding habits and habitat greatly influence the contamination levels, being highest in demersal species (cat and white fishes) and lowest in pelagic ones (sardines).

*C. botulinum* type E was isolated in greatest frequency (13,8%), followed by F (4,6%), B (3,0%), A (2,6%) and non identified types (1,6%), probably C or D types. Moreover, it was observed that some samples (5,1%) contained more than one *C. botulinum* type.

An evaluation was also made on routine *C. botulinum* detection methodology compared with plating procedures on egg yolk agar media. The results showed that the isolation of *C. botulinum* strains was improved when sampling were centrifuged followed by streaking on egg yolk agars. This was particularly noticed usually when more than one *C. botulinum* type was present.

It was also observed that the use of the iodine test on colonies grown on Sacarose-egg yolk agar plates result in a fast and efficient presumptive method for the detection of *C. botulinum* type E.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento microbiano em produtos alimentícios é condicionado por fatores inerentes ao próprio alimento (fatores intrínsecos), bem como pelas condições ambientais que, com maior ou menor intensidade, irão afetar a natureza e a velocidade de crescimento da microflora contaminante (fatores extrínsecos). Em função da adequação destes fatores, os alimentos poderão servir de substrato para a proliferação de bactérias, bolores e leveduras; usualmente, em consequência da atividade metabólica destes microrganismos, serão desencadeados diferentes processos de deterioração refletidos por alterações de aroma, sabor, textura, coloração, etc., que irão resultar na perda completa do alimento ou na redução do seu período de vida útil. No entanto, ao lado da participação como agentes de deterioração, a presença de microrganismos nos alimentos também merece considerações no aspecto de Saúde Pública. Levantamentos epidemiológicos conduzidos em vários paí-

ses, têm revelado a participação crescente de alimentos contaminados ou infectivos em casos ou surtos de toxi-infecções com índices de morbidade, mortalidade e letalidade muito variáveis.

Dentre as bactérias patogênicas de possível ocorrência e capacidade de multiplicação em alimentos, o *Clostridium botulinum* é, provavelmente, a de maior importância. Esta afirmativa é justificada pelas seguintes considerações:

- Inicialmente, o microrganismo *C. botulinum* é uma bactéria esporogênica, tendo seus esporos elevada resistência aos agentes físicos e químicos; à exceção de algumas cepas de *C. sporogenes* e do organismo identificado como *Clostridium* P.A. 3679, os esporos de *C. botulinum* são os de maior resistência térmica entre as bactérias esporogênicas mesofílicas anaeróbias.

- A par da resistência térmica de seus esporos, o *C. botulinum*, em decorrência de seu desenvolvimento no alimento, produz uma neurotoxina extremamente potente; conforme mencionado por ABRAMS et alii, 1946, 1,0 miligrama de toxina botulínica contém dose letal para 30 milhões de camundongos, sendo aproximadamente seis vezes mais tóxica que a tetânica e caracterizando-se como a mais potente entre as toxinas bacterianas. Em decorrência destas características, a destruição ou inibição dos esporos de *C. botulinum* é premissa básica no processamento térmico de alimentos industrializados. Assim sendo, o binômio tempo-temperatura de esterilização para ali-

mentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,6$ ) é calculado visando a assegurar a destruição de um número muito elevado de esporos de *C. botulinum* (conceito 12 D,  $F_0$  mínimo = 2,54 minutos).

A despeito das preocupações adotadas no processamento industrial dos alimentos, os dados epidemiológicos de inúmeros países revelam a ocorrência continuada de casos ou surtos de botulismo, usualmente com índices elevados de mortalidade; embora muitos destes surtos sejam decorrentes do consumo de alimentos de conservação caseira, sabe-se que a adoção de novos métodos ou técnicas de conservação industrial têm resultado na sobrevivência de esporos viáveis de *C. botulinum*, principalmente quando as condições de armazenamento dos produtos não são adequadas.

Estas considerações realçam portanto, a necessidade da continuidade nos estudos sobre *C. botulinum*, principalmente no que concerne à sua real incidência nas várias matérias primas de uso industrial, e às técnicas para a destruição de esporos ou o controle adequado da sua germinação.

Particularmente nos países com grau avançado de tecnologia, são inúmeros os relatos e pesquisas evidenciando a ocorrência de *C. botulinum* no ambiente natural e a predominância dos diferentes tipos nos alimentos. Já no que diz respeito à América do Sul e ao Brasil, em particular, são praticamente inexistentes pesquisas desta natureza, impossibilitando, portanto, uma avaliação concreta da real ocorrência de *C. botulinum* no ambiente. No entanto, dados esparsos, mencionan

do um surto de botulismo humano no Rio Grande do Sul, deixam antever a presença da bactéria em nosso ambiente.

O desenvolvimento de *C. botulinum* pode ocorrer tanto em alimentos de origem animal como vegetal, desde que suas exigências mínimas de atividade de água, pH, potencial de oxi-redução e nutrientes disponíveis sejam atendidas; no entanto, dentre os produtos de origem animal, os pescados são os mais freqüentemente envolvidos em casos ou surtos de botulismo. Fatores como a contaminação freqüente da matéria-prima e práticas não adequadas de conservação poderiam parcialmente explicar esta constatação. Cabe ainda acrescentar que o único surto de botulismo humano registrado no Brasil foi também devido ao consumo de conserva caseira de pescado, conforme consta dos registros existentes no Instituto Butantan.

Com base nas considerações mencionadas e visando contribuir para um melhor conhecimento da ocorrência de *C. botulinum* no ambiente brasileiro, é que se decidiu pela realização do presente trabalho que teve os seguintes objetivos:

- Avaliar a ocorrência de *C. botulinum* em diversas espécies de pescado (peixes, ostras e camarão), selecionadas de forma a incluir espécies de importância comercial e hábitos alimentares diversos;

- Caracterizar os tipos de *C. botulinum* presentes no pescado, visando principalmente avaliar qual ou quais os tipos predominantes nas espécies pesquisadas, e,

- Avaliar a eficiência e validade de técnicas para o isolamento e caracterização de culturas puras de *C. botulinum* a partir de amostras de pescado.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Epidemiologia de *Clostridium botulinum*

#### 2.1.a - Características Gerais da Bactéria *Clostridium botulinum*

O gênero *Clostridium* compreende bactérias usualmente móveis, com flagelos peritríqueos, e ocasionalmente imóveis. Formam esporos ovais ou esféricos, os quais usualmente, possuem um diâmetro maior que o das células vegetativas, ocasionando em consequência, a dilatação destas. As células são Gram-positivas, pelo menos nos primeiros estágios do desenvolvimento. São quimorganotróficas, apresentando espécies saca-

rolíticas, proteolíticas, algumas se apresentam com ambas as características e outras que não apresentam nenhuma destas atividades (SMITH & HOBBS, 1974). São encontrados comumente em solo, sedimentos marinhos e de águas doces, bem como no trato intestinal do homem e dos animais (RIEMANN, 1969 e SMITH & HOBBS, 1974).

A espécie *C. botulinum* compreende bactérias em forma de bastões retos ou ligeiramente curvos, medindo de 2,0 a 10,0 micrômetros de comprimento por 0,5 a 2,0 micrômetros de largura, ocorrendo isolados, pareados ou ainda em pequenas cadeias. Embora incluídas dentro da definição global da espécie, as diferentes cepas de *C. botulinum* podem apresentar características culturais, fisiológicas, bioquímicas e sosológicas bastante diversas. Talvez o traço mais marcante da espécie seja a produção de neurotoxinas, com ação farmacológica semelhante, mas apresentando diversidade antigênica, o que permite a divisão da espécie em sete tipos diversos (A, B, C, D, E, F e G) com base na especificidade antigênica das várias toxinas, evidenciando tanto em reações "in vivo" como "in vitro".

O tipo A foi pela primeira vez isolado em Elezelles, na província de Hainaut, na Bélgica, por Emile Pierre Marie van Ermengen, em 1896, a partir de presunto cru salgado, responsável pela morte de três músicos (SMITH, 1977 e DOLMAN, 1964). O microrganismo isolado por van Ermengen foi denominado *Bacillus botulinus* (STIEBERS, 1967).

O tipo B foi isolado por Landman em 1904, no laboratório da Companhia Merck, em Darmstadt, Alemanha, quando o pesquisador examinava porções remanescentes de uma salada de vagem de processamento caseiro, que havia causado naquela cidade, a morte de 11 pessoas (SMITH, 1977). Os dois microorganismos, aquele isolado por van Ermengen e o isolado por Landman, foram comparados por Leusch em 1910, no Instituto Real de Doenças Infecciosas, em Berlim. Leuch constatou que embora similares, os microrganismos eram sorologicamente diferentes, uma vez que uma antitoxina preparada contra uma das culturas não neutralizava a ação da outra (DOLMAN, 1964 e SMITH, 1977).

O *C. botulinum* tipo C foi descoberto em 1922, quase simultaneamente na Austrália e nos Estados Unidos da América do Norte. Ida Bengston, do Serviço de Saúde Pública, em Washington, D.C., Estados Unidos da América do Norte, isolou-o de larvas de moscas-verdes (*Lucilia caesar*), incriminadas em uma doença que causava paralisia em galinhas. Bengston constatou que a toxina formada pelo organismo recém-isolado, não era sorologicamente relacionada com aquelas já conhecidas, ou seja, dos tipos A e B (DOLMAN, 1964 e SMITH, 1977). No mesmo ano, Seddon, na Austrália, constatou o mesmo tipo de doença em gado, então chamada paralisia bulbar, que era uma consequência da ingestão de materiais contaminados com um microrganismo que denominou *Clostridium parabotulinus* (DOLMAN, 1964). No entanto, Pfenninger, em 1924, estudando as duas culturas, verificou que elas poderiam ser consideradas como dois sub-ti

tipos, uma vez que a antitoxina produzida para a cultura originalmente isolada por Bengston neutralizava a toxina produzida pelo organismo isolado por Seddon, enquanto a antitoxina preparada a partir de cultivo deste último microrganismo não neutralizava a toxina produzida pela cepa isolada por Bengston (BOROFF & DAS GUPTA, 1971 e SAKAGUCHI, 1979). Em 1927, foi proposto que o microrganismo isolado por Bengston fosse denominado *C. botulinum* tipo C alfa, enquanto o de Seddon denominar-se-ia *C. botulinum* tipo C beta (SMITH, 1977).

O tipo D foi isolado por Theiler e Robinson, em Onderstepoort, em Pretória, África do Sul, a partir da carcaça de uma vaca que havia morrido de "lamsiekte", uma paralisia responsável pela morte de milhares de cabeças de gado naquela país (DOLMAN, 1964). Gunnison e Meyer, em 1928, nos Estados Unidos da América do Norte, estudaram a bactéria isolada e verificaram ser a toxina por ela produzida diferente daquelas até então conhecidas, denominando-a, então, de *C. botulinum* tipo D (SMITH, 1977).

O *C. botulinum* tipo E foi também isolado quase que simultaneamente em dois lugares diferentes, nos anos de 1936 e 1937. Bier, do Instituto de Bacteriologia de Dniepetrovsk, na Ucrânia, isolou-o a partir de uma amostra de peixe envolvida em um surto de botulismo. Enviando uma cultura deste organismo à Fundação Hooper, em São Francisco, Califórnia, nos Estados Unidos da América do Norte, Gunnison e seus colaboradores, após identificação e caracterização, denominaram-

na *C. botulinum* tipo E (DOLMAN, 1964 e SMITH, 1977). Em 1937, Elizabeth Hazen, do laboratório do Departamento de Saúde Pública em Nova Iorque, Estados Unidos da América do Norte, isolou também um microrganismo produtor de toxina a partir de material contido em uma lata de espadilha, também conhecida como arenque europeu (*Clupea sprattus*) e processada na Alemanha. Estudos posteriores comprovaram serem as duas culturas, embora isoladas em locais diferentes, capazes de produzir a mesma toxina do tipo E (SMITH, 1977).

O tipo F foi isolado por Moller e Scheibel, em 1960, a partir de uma amostra de patê de fígado de fabricação caseira, cujo consumo resultou na morte de uma pessoa na ilha de Langeland, na Holanda (BDRDFF & DAS GUPTA, 1971 e SAKAGUCHI, 1979). Entretanto, SMITH, 1977, comenta sobre a possibilidade desta bactéria ter sido isolada e caracterizada anteriormente, em 1942, quando Elizabeth Hazen descreveu o isolamento de um microrganismo cuja toxina não era neutralizada pela antitoxina E, e que, embora semelhante, não causava letalidade em galinhas; cabe acrescentar que é geralmente aceito que a toxina F é neutralizada em parte pela antitoxina E e que galinhas e outros galináceos são sensíveis à toxina E e resistentes a toxina F (SMITH, 1977).

O tipo G foi descoberto por GIMENEZ & CICCARELLI, 1970, que isolaram de uma amostra de solo proveniente de um campo de milho na província de Mendoza, na Argentina.

No passado, os microbiologistas julgaram conveniente dividir a espécie *C. botulinum* em grupos proteolíticos e não-proteolíticos, com base na capacidade relativa das cepas em hidrolisar ou não as proteínas (caseína, soro coagulado, ou albumina de ovo coagulada). As cepas proteolíticas foram também denominadas de ovolíticas, devido à habilidade de digerirem a albumina coagulada do ovo. Alguns autores propuseram a denominação de *C. parabolulinum* para caracterizar cepas proteolíticas. Segundo SMITH, 1977, tal procedimento não é válido por várias razões: a) o nome da espécie *C. parabolulinum* foi originalmente aplicado a cepas não proteolíticas do tipo C, por Seddon em 1922; b) diferentes culturas obtidas a partir da mesma cepa poderão mostrar variações na atividade proteolítica, sendo esta usualmente associada com variações na produção de toxina; c) a especificidade antigênica da toxina nem sempre é correspondente à atividade proteolítica do organismo que a produz; d) se a espécie *C. parabolulinum* fosse definida com base nas características bioquímicas, seria inevitável a inclusão na mesma de todas as cepas de *Clostridium sporogenes* uma vez que elas são idênticas no que concerne às suas características.

Com base nestes fatos, por ocasião do IV Congresso Internacional de Microbiologia foi recomendado que somente o nome *C. botulinum* fosse utilizado para caracterizar os organismos produtores de toxina botulínica (SMITH, 1977).

Levando-se em conta as características bioquí-

micas, é possível a subdivisão da espécie *C. botulinum* em quatro grupos (HODERMAN & MOORE, 1972; SMITH & HOBBS, 1974 e SMITH, 1977):

Grupo I. Anteriormente denominado ovolítico, incluindo todos os microrganismos do tipo A e cepas proteolíticas dos tipos B e F;

Grupo II. Abrangendo todas as cepas do tipo E e aquelas não proteolíticas dos grupos B e F;

Grupo III. Incluindo todas as cepas do tipo C alfa, C beta e o tipo D;

Grupo IV. Abrangendo todas as cepas do tipo G, proteolíticas e não sacarolíticas.

As colônias do grupo I, em meio de ágar-sangue são irregulares e apresentam reação de hemólise (PRÉVOT, 1966). Em meio de cultura contendo gema de ovo, elas, como também as dos demais grupos, exibem uma superfície iridiscente, quando examinadas sob luz oblíqua. Esta zona lustrosa é também denominada camada aperolada (pearly layer). Além disso, apresentam também uma zona de precipitação, geralmente menor que 2,0 milímetros, após 48 horas de incubação em meio contendo gema de ovo (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, 1978). As cepas deste grupo, desenvolvem a reação de Stikland entre pares de aminoácidos, sendo na sua maioria capazes de utilizar a arginina como fonte de energia. O gás sulfídrico é produzido pela maioria das cepas e a atividade da lipase é evidenciada em meios contendo gema de ovo, formando en

tão o precipitado acima referido. Além disso são capazes de liquefazer a gelatina (SMITH, 1977).

As colônias do grupo II e em especial o tipo E apresentam-se translúcidas em meio de agar sangue, com um diâmetro em torno de 0,5 milímetros após 48 horas de incubação a 37°C, podendo evidenciar uma discreta reação de hemólise (AJMAL & HOBBS, 1966). Em meio de cultura contendo gema de ovo, as colônias são irregulares e, além da camada aperolada, apresentam uma zona de precipitado maior do que aquelas das colônias do Grupo I, medindo de 2,0 a 4,0 milímetros, circundando-as (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, 1978). A gelatina é hidrolizada pela maioria das cepas, sendo capazes de provocar uma suave coagulação do leite, o qual, no entanto não é digerido (SMITH, 1977). Finalmente, neste grupo não é po não é evidenciada a produção de gás sulfídrico, ao passo que suas toxinas podem ser ativadas pela tripsina (DUFF *et alii*, 1956; GERWING *et alii*, 1965 e UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, 1978).

Os microrganismos do Grupo III são culturalmente indistinguíveis. Em meio contendo gema de ovo, as colônias são irregulares, apresentando bastante semelhança com as do Grupo II. A gelatina é hidrolizada, enquanto a caseína ou outras proteínas não são digeridas pela maioria dos representantes (SMITH, 1977).

As colônias do Grupo IV, ou seja do tipo G, são de modo geral menores do que as dos outros grupos. As cepas



apresentam reações negativas para a produção de gás sulfídrico, lecitinase, lipase e hidrólise da gelatina, bem como para a fermentação de carboidratos.

#### 2.1.b - Condições gerais para o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*

Neste aspecto, alguns fatores como o potencial de oxi-redução, pH, atividade de água e presença de aditivos químicos, influem decisivamente no comportamento da bactéria. O *C. botulinum* é um anaeróbico estrito, razão pela qual alimentos enlatados, embalados a vácuo e determinados produtos cárneos e de pescado, são os principais veículos da doença (SAKAGUCHI, 1979). O desenvolvimento do microrganismo é dependente do potencial de oxi-redução do alimento, o qual, sendo suficientemente reduzido, poderá proporcionar condições para a multiplicação (SAKAGUCHI, 1979 e HOBBS, 1976). Sendo um anaeróbico estrito, o oxigênio atmosférico tem um efeito direto inibitório e/ou tóxico. O organismo é susceptível ao peróxido de hidrogênio formado como produto metabólico das células expostas ao oxigênio, além da possibilidade de formação de outros peróxidos devido à oxidação dos compostos do meio de cultura, os quais poderão também atuar sobre a bactéria (RIEMANN, 1969). O mais alto valor de potencial de oxi-redução que permitirá o crescimento dependerá do número de células presentes, desde que elas reduzem o potencial no seu ambiente mais

imediatamente. Os esporos de *C. botulinum* tipos A e B iniciam o desenvolvimento após 10 a 20 dias em leite desnatado armazenado sem precauções de anaerobiose e a toxina botulínica pode ser produzida em peixe defumado inoculado superficialmente com esporos do tipo A e incubado em condições aeróbicas a 30 °C por 8 dias (RIEMANN, 1969). Nestes casos, o alimento por si mesmo produz um potencial de oxi-redução suficientemente reduzido. Microorganismos contaminantes também podem consumir o oxigênio presente, proporcionando condições anaeróbicas mesmo na superfície do alimento, como no caso de peixe defumado (RIEMANN, 1969). JAY, 1970, comenta que o crescimento de *Clostridium* ocorre em valores de potencial de oxi-redução iguais ou menores que -36 milivolts.

Em relação ao pH, dados experimentais indicam que *C. botulinum* não apresenta crescimento em valores de pH menores ou iguais a 4,7 (DOLAUG & PFLUG, 1978; TOWNSEND **et alii**, 1954; HAUSCHILD **et alii**, 1975; ITO **et alii**, 1976 e LECHOWICK, 1968); no entanto, o pH 4,6 é considerado, por medida de segurança, como a linha divisória entre os alimentos ácidos, onde via de regra o microrganismo não se desenvolve, e os alimentos de baixa acidez, capazes de proporcionar condições que permitem a proliferação da bactéria.

Segundo DHYE **et alii**, 1967, a atividade de água mínima necessária ao desenvolvimento de *C. botulinum* tipo E é estimada em 0,975, embora cepas mais tolerantes consigam desenvolver-se em valores entre 0,965-0,970; cabe acrescentar

que alguns autores (RIEMANN, 1969 e OHYE & CHRISTIAN, 1966) estabelecem o valor de atividade de água de 0,93-0,94 como o limite mínimo para o desenvolvimento de *C. botulinum*. Estes valores corresponderiam àqueles obtidos em soluções contendo 50% de sacarose ou 10% de cloreto de sódio (RIEMANN, 1969; OHYE & CHRISTIAN, 1966 e LECHOWICH, 1968). OHYE & CHRISTIAN, 1966, estudando o efeito da atividade de água sobre o *C. botulinum* tipos A, B e E, observaram que sob condições ideais de pH e temperatura, os valores mínimos de atividade de água para o desenvolvimento dos tipos A, B e E eram, respectivamente, 0,95, 0,94 e 0,97, correspondentes às concentrações de 8,0, 9,4 e 5,1% de cloreto de sódio respectivamente.

O efeito inibitório do cloreto de sódio na célula microbiana não é devido apenas à redução da atividade de água. Outros fatores, entre os quais o aumento da pressão osmótica, podendo causar plasmólise das células; a liberação do íon cloreto, em solução, o qual é tóxico para os microorganismos; a sensibilização dos organismos à ação do gás carbônico; e a interferência com a ação dos enzimas proteolíticos, também afetam o desenvolvimento microbiano (FRAZIER, 1967). Dados experimentais revelaram que o *C. botulinum* é inibido em seu desenvolvimento em presença de níveis de 10% de cloreto de sódio, embora a produção de toxina não ocorra quando a concentração é superior a 7,0% (GREENBERG et alii, 1959). Além disso, a sensibilidade dos diferentes tipos é variável, sabendo-

do-se que o tipo E é o menos resistente quando comparado aos tipos A e B (SOFOS et alii, 1979).

O nitrito de sódio, aditivo químico usual no preparo de carnes curadas, exerce um pronunciado efeito inibidor sobre o *C. botulinum*; este efeito é potencializado quando o emprêgo ocorre conjuntamente com o de cloreto de sódio; nestas condições, o nível de nitrito para assegurar a inibição da germinação dos esporos oscila entre 150,0 a 500,0 µg/g (CHRISTIANSEN et alii, 1973; CHRISTIANSEN et alii, 1974; LECHOWICH et alii, 1978; ROBERTS et alii, 1976 e RIEMANN, 1973]. Outros fatores, como o número de esporos presentes, intensidade do tratamento térmico do alimento, temperatura, pH, etc., influem também na dose inibitória mínima de nitrito adicionado ao meio.

O intervalo de temperatura capaz de permitir a multiplicação do *C. botulinum* é bastante amplo, oscilando de 3,3 a 50,0°C; particularmente o tipo E revela capacidade de crescimento a temperatura de refrigeração, ao passo que os tipos A e B já apresentam uma temperatura mínima de desenvolvimento acima de 5,0°C (ROBERTS & HOBBS, 1968; RIEMANN, 1969; ABRAHAMSON et alii, 1966 e BONVENTRE & KEMPE, 1959).

A despeito do conhecimento dos fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o desenvolvimento de *C. botulinum* aliado ao emprego de técnicas de processamento capazes de assegurar a destruição dos esporos desta bactéria, dados epidemiológicos de vários países revelam a persistência de casos

ou surtos de botulismo. Segundo SMITH, 1977, a real incidência do botulismo em seres humanos não é conhecida em toda a sua extensão, sendo que os dados de morbidade e mortalidade disponíveis refletem apenas parcialmente a importância do problema. Alguns destes dados constam da Tabela 1.

Pequenos surtos, envolvendo poucas pessoas, têm sido registrados na Argentina, Áustria, Bélgica, Checoslováquia, Holanda, Suíça e Iugoslávia (MATVEEV *et alii*, 1967; RIEMANN, 1969; e SAKAGUCHI, 1979). No Brasil, a literatura é bastante escassa, havendo, entretanto, a citação de um surto de botulismo ocorrido em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, em 1958, devido ao consumo de conserva de peixe (JEFFMAN, 1960).

TABELA 1. Dados sobre a ocorrência de botulismo em vários países

| País                               | Período   | Número de casos | Número de mortes | Fonte   |
|------------------------------------|-----------|-----------------|------------------|---|
| Alemanha                           | 1989-1948 | 1294            | 179              | DOLMAN, 1964  |
| Austrália                          | 1942-1966 | 49              | ?                | SUTTON, 1973  |
| Canadá                             | 1944-1963 | 36              | 22               | DOLMAN, 1964 e SAKAGUCHI, 1979                            |
|                                    | 1973-1975 | ?               | 7                | TUDO, 1978  |
| França                             | 1940-1944 | >1000           | 15               | LEGROUX et alii, 1947                                     |
| Guatemala                          | 1961-1967 | 18              | 2                | HALBINGER, 1973   |
| Ilhas Britânicas                   | 1922      | 21              | 16               | DOLMAN, 1964  |
| Inglaterra                         | 1965      | 2               | ?                | BARROW, 1973  |
| Japão                              | 1951-1963 | 307             | 77               | KAWABATA & SAKAGUCHI, 1963; SAKAGUCHI, 1979 e TUDO, 1978. |
| Noruega                            | 1963      | 5               | 1                | BARROW, 1973  |
| Polônia                            | 1962-1963 | 23              | 5                | DOLMAN, 1964  |
| Suécia                             | 1960-1962 | 5               | 1                | DOLMAN, 1964  |
| Estados Unidos da América do Norte | 1899-1949 | 1281            | 833              | DOLMAN, 1964 e ZOTTOLA, 1972                              |
|                                    | 1966-1980 | 320             | 60               | CDC, 1977; 1978-a; 1979-a; 1980 e 1981                    |
| E.U.A. (Alasca)                    | 1950-1962 | 22              | 8                | EISENBERG & BENDER, 1976 e TOMPKIN et alii, 1976.         |
| União Soviética                    | 1818-1939 | 1283            | 459              | DOLMAN, 1964  |
|                                    | 1958-1964 | 25              | ?                | MATVEEV et alii, 1967                                     |
| Venezuela (Caracas)                | 1964-1965 | 4               | ?                | HALBINGER, 1973   |

DOWELL *et alii*, 1968, apresentam um resumo dos alimentos envolvidos em surtos de botulismo nos Estados Unidos da América do Norte no período de 1899 a 1967, constatando-se que 463 destes surtos foram devidos ao consumo de conservas caseiras, 60 a alimentos industrializados e 117 com origem desconhecida. MATVEEV *et alii*, 1967, comentam que em 95 surtos de botulismo ocorridos na União Soviética, três deles foram devidos a produtos comercializados, ao passo que 92 foram causados pelo consumo de alimentos de conservação caseira, resultando em um total de 95 mortes.

DDWELL *et alii*, 1968, analisando dados epidemiológicos nos Estados Unidos da América do Norte (1899 - 1967) mencionam que 114 dos surtos ocorridos foram devidos ao consumo de vegetais em conservas, 26 a conserva de frutos, 9 a carnes e frangos, 23 a peixes e derivados, 4 a leite e produtos de laticínio e 17 a vários outros alimentos. Peixes defumados foram responsáveis por muitos surtos nesse país, com um total de 11 mortes no período de 1960 a 1967 (CDC, 1963-a, b, c e d; CDC, 1967 e FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1964), envolvendo, principalmente, peixes capturados na região dos Grandes Lagos no Estado de Michigan. Já no Estado de Alasca, foram relatados 21 casos de botulismo, envolvendo o consumo de pescado embalado a vácuo, que resultaram em 4 mortes (EISENBERG & BENDER, 1976).

No Canadá, entre os anos de 1944 e 1963, foram registrados 13 surtos, com 22 mortes, por causa do con-

sumo de conservas de peixes e de ovos de salmão contaminados com *C. botulinum* tipo E (DOLMAN, 1964 e SAKAGUCHI, 1979).

Na União Soviética, 58,9% dos surtos relatados entre 1958 e 1964 foram devidos a peixes e produtos de pescado e 14% ao consumo de produtos de origem vegetal (MATVEEV *et alii*, 1967).

Levantamentos efetuados na Austrália, no período de 1942 a 1966, relatam apenas 5 surtos de botulismo, sendo que 4 deles foram provocados pela ingestão de conservas vegetais e uma por conserva de atum enlatado comercialmente (SUTTON, 1973).

No Japão, em 29 surtos registrados nos anos de 1951 a 1960, os alimentos incriminados foram conservas de pescado, usualmente de processamento caseiro (KAWABATA & SAKAGUCHI, 1973).

#### 2.1.c - Isolamento de *Clostridium botulinum*

Os procedimentos básicos utilizados em laboratórios para a detecção dos vários tipos de *C. botulinum* envolvem, numa fase inicial, a inoculação da amostra em um meio de enriquecimento, como, por exemplo, o meio de carne cozida (KAUTER *et alii*, 1968), meio de Tripticase Peptona Glicose Extrato de Levedura no caso especial do tipo E (GRAIG *et alii*, 1968 e STIEBERS, 1967) e vários outros meios citados na literatura



(BONVENTRE & KEMPE, 1960; DUFF et alii, 1957; EKLUND et alii, 1972; CARDELLA et alii, 1958 e BOTT et alii, 1964). Este meio de enriquecimento é então incubado sob anaerobiose, a temperatura e tempos apropriados para o desenvolvimento dos organismo (30 a 37° C de 3 a 5 dias). Após incubação, efetua-se a extração da toxina a partir da cultura obtida, seguida de testes biológicos efetuados por meio da inoculação em camundongos brancos ou suíços (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, 1978).

Embora a demonstração da toxina seja uma prova cabal da presença do organismo, o isolamento de cultura pura de *C. botulinum* complementa, como prova final, a presença da bactéria. Geralmente, o isolamento envolve a utilização de meios sólidos contendo gema de ovo, onde a cultura é estriada, seguindo-se a incubação em anaerobiose, à temperatura entre 30 a 37° C, dependendo do tipo que se espera isolar (STIEBERS, 1967). Nestes meios, as colônias suspeitas de *C. botulinum* apresentam, como características mais marcantes, a camada aperolada e uma zona de precipitado. A partir destas colônias efetuam-se novos isolamentos e inoculações em meio de enriquecimento, visando à caracterização final de *C. botulinum*, mediante novas inoculações em camundongos (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, 1978).

#### 2.1.d - Ocorrência no meio aquático

O interesse no conhecimento da presença de *C. botulinum* no ambiente aquático e particularmente em pescado, foi motivado por uma série de surtos ocorridos nos Estados Unidos da América do Norte resultantes do consumo de pescado, na década de 1963 (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1964; CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1963-a, b, c e d).

WARD & CARROL, em 1965, efetuaram um estudo com um número bastante reduzido de amostras de sedimentos coletadas próximo à confluência da Baía Dickinson e Lago Moisés ao oeste da Baía de Galvston, no Texas, Estados Unidos da América do Norte, sendo que em 36 amostras examinadas, apenas 2 demonstraram a presença de *C. botulinum* tipo E.

CHAPMAN & NAYLOR, 1966, examinaram amostras de peixes capturados no Lago Cayuga, o segundo maior lago da região centro-sul do Estado de Nova Iorque, nos Estados Unidos da América do Norte. De um total de 32 amostras examinadas, apenas 2 estavam contaminadas com o tipo E, ao passo que nenhuma entre 4 amostras de água analisadas revelou a presença da bactéria.

BOTT et alii, 1967, analisaram o trato intestinal de vários peixes capturados em vários lagos e baías da região dos Grandes Lagos, nos Estados Unidos da América do Norte, visando a isolar *C. botulinum* tipo E. Os resultados reve-

laram que de um total de 3818 culturas isoladas, a ocorrência de *C. botulinum* tipo E oscilou de menos de 1 a 56%, com valores médios ao redor de 11%.

GRAIG & PILCHER, 1967, estudaram a distribuição natural de *C. botulinum* tipo E ao longo da costa dos Estados de Oregon e Washington, nos Estados Unidos da América do Norte, banhados pelo Oceano Pacífico, bem como ao norte e ao sul do Rio Colúmbia, procurando verificar a ocorrência da bactéria, principalmente em salmão e sedimentos marinhos. Examinando 357 amostras de salmão, os autores constataram 48 amostras tóxicas, sendo 18 delas contaminadas com o tipo E; a maior percentagem de amostras tóxicas ocorreu em salmões capturados próximo ao Rio Colúmbia. Por outro lado, nas 47 amostras de sedimentos coletadas ao longo da costa, em 25 delas (53,2%) constatou-se *C. botulinum*, sendo que em 8 estava presente o tipo E.

EKLUND & POYSKY, 1967, pesquisaram a presença de *C. botulinum* em carangueijos [*Cancer magister*] capturados nas águas costeiras dos Estados do Alasca, Washington, Oregon e Califórnia, nos Estados Unidos da América do Norte, analisando o trato intestinal, brânquias e carapaça de carangueijos. Nas áreas de Ketchikan, no Alasca, e Ancoradouro Grays, em Washington, como também ao norte de Oregon, constatou-se 57, 61-75 e 87% de amostras contaminadas, respectivamente. Amostras coletadas na Califórnia, em São Francisco, Forte Bragg, e Eureka, apresentavam-se menos contaminadas, com positividade

des variando de 12 a 30%. No Alasca, foi observada apenas a ocorrência do tipo E, ao passo que em Washington e Oregon foram isolados os tipos A, B, C e E. Verificou-se ainda que as carapaças e as brânquias também estavam contaminadas e que a presença da bactéria no intestino, variava em função do estado de alimentação e digestão do peixe, sendo o *C. botulinum* isolado com maior frequência quando o trato digestivo estava repleto e raramente quando estava vazio. Em amostras de sedimentos marinhos coletadas no litoral dos Estados de Washington, Oregon e Califórnia, os autores relataram o isolamento de *C. botulinum* tipos A, B e E, ao passo que o tipo E foi constatado apenas em amostras procedentes de Oregon e Califórnia.

NICKERSON et alii, 1967, verificaram a ocorrência de *C. botulinum* tipo E em várias amostras de peixes e lodo coletadas no Golfo de Maine, nos Estados Unidos da América do Norte. Dentre os pescados estudados, destacavam-se o eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*), linguado (*Hippoglossoides platessoides*), bacalhau (*Gadus morrhua*) e pescada polaca (*Pollachius virens*). A frequência de contaminação destes peixes foi de 4,5%, ao passo que para as amostras de lodo foi inferior a 1%.

PRESNELL et alii, 1967, nos Estados Unidos da América do Norte, efetuaram um estudo com a finalidade de determinar a possível correlação entre a ocorrência e a distribuição de *C. botulinum* nos estuários, sedimentos marinhos e

ostras, coletando amostras em cinco estações de amostragem na Baía Mobile, Golfo do México, no Texas. Estas estações localizavam-se em áreas de profundidades variáveis, oscilando de 0,91 a 1,52 metros. No período compreendendo agosto de 1965 a junho de 1966, os autores coletaram 74 amostras de ostras e 74 de sedimentos em cada um dos pontos de amostragem, constatando-se a ocorrência de *C. botulinum* em 4,1 e 2,7% das amostras de sedimentos e ostras, respectivamente.

WARD et alii, 1967-b, coletaram amostras de peixes em vários pontos da costa norte-americana, entre Key West, na Flórida, e Brownsville, no Texas. Em um total de 214 amostras coletadas no inverno, os autores demonstraram a presença de *C. botulinum* em 6 delas, com o isolamento dos tipos B, C, D e E. Por outro lado, os resultados do exame de 303 amostras coletadas no verão revelaram que 14 estavam contaminadas, com predominância do tipo E, confirmado em 12 delas, seguido dos tipos B e C. Os mesmos autores examinaram 104 amostras de camarão coletadas durante o verão com apenas um resultado positivo para o tipo E. Finalmente, foram também examinadas amostras de sedimentos constituídas de lama, conchas e areia. Em um total de 117 e 164 amostras coletadas no inverno e verão, respectivamente, a presença de *C. botulinum* foi positivada em 8 a 9 delas respectivamente, sendo que no inverno foram isolados os tipos A, B e E, e no verão, os tipos C e E, com predominância deste último.

WARD et alii, 1967-a, examinaram amostras de sedimentos e animais (moluscos, crustáceos e peixes) coletadas ao longo da costa leste dos Estados Unidos da América do Norte, desde Nova Iorque até a Louisiana. Em um total de 275 amostras de sedimentos e 382 daqueles animais, os autores verificaram uma positividade de 3,3 e 1,0%, respectivamente.

CRAIG et alii, 1968, nos Estados Unidos da América do Norte, conduziram um estudo no sentido de se avaliar a ocorrência de *C. botulinum* em 369 amostras de salmão recém-capturado, observando que 48 delas apresentavam-se contaminadas, sendo o tipo E constatado em aproximadamente 50% destas amostras. Verificaram ainda que 18 entre 113 amostras de solha e bacalhau, 4 entre 115 amostras de carangueijos, 5 dentre 16 amostras de ostras e 27 entre 115 amostras de mariscos, continham toxina botulínica, geralmente do tipo E, embora os tipos A e B fossem ocasionalmente encontrados. Os resultados obtidos em amostras de salmão capturados em diferentes locais ao longo da costa noroeste do Pacífico e do Rio Colúmbia, evidenciaram que a proporção de peixes contaminados com *C. botulinum* variava em função do local de captura. Os autores sugeriram que o rio era uma fonte mais abundante desta bactéria do que o mar e que grande número destes peixes provavelmente contaminavam-se com o microrganismo quando adentravam o rio, por ocasião da desova. Em peixes como solha e bacalhau, considerados como peixes de profundidade, a bactéria foi iso-

lada na maioria das amostras; constatou-se também que mais de 30% das amostras de ostras e 50% das de carangueijos apresentavam-se tóxicas após incubação em meio de enriquecimento. Neste trabalho, os autores conseguiram o isolamento do tipo F em apenas uma amostra de salmão, capturado no rio Colúmbia.

GRAIKOSKI *et alii*, 1968, conduziram um estudo no sentido de se avaliar a distribuição de *C. botulinum* tipo E na região dos Grandes Lagos, nos Estados Unidos da América do Norte. Os autores pesquisaram sedimentos, água, plâncton, peixes e invertebrados, capturados em vários lagos da região. Em um total de 925 amostras examinadas, o *C. botulinum* tipo E estava presente em 15,8% delas, predominando em plâncton (30,7%), peixes (21,8%) e sedimentos (19,8%), com menor positividade nas amostras de água e invertebrados (3,6 e 3,4%, respectivamente).

SUGIYAMA *et alii*, 1968, efetuaram uma pesquisa sobre a ocorrência de *C. botulinum* tipo E, em amostras de sedimentos coletadas no Lago de Michigan e na Baía Verde, a qual é um prolongamento daquele lago, na região dos Grandes Lagos, nos Estados Unidos da América do Norte. As positivities encontradas neste estudo foram de 81,9 e 81,4% no lago e na baía, respectivamente.

HOUGHTBY & KAYSNER, 1969, pesquisaram a ocorrência de *C. botulinum* tipo E em salmões de água frescas e costeiras dos Estados de Washington, Oregon e Alasca, nos Esta-

dos Unidos da América do Norte. Os autores examinaram guelras e vísceras de salmão, sendo que de um total de 733 amostras das primeiras, 16 (2,2%) estavam contaminadas com o tipo E, enquanto em 638 amostras de vísceras, apenas 1 (0,1%) revelou resultado positivo. Muito provavelmente, esta baixa ocorrência se deveu à falta de alimentação dos peixes por ocasião de sua entrada no mar, apresentando seus tratos digestivos vazios, como esclarecem os autores.

LAYCOCK & LORING, 1972, coletaram amostras de sedimentos na parte sul do Golfo de São Lourenço, no noroeste de Montreal, no Canadá. Em um total de 8 amostras coletadas no estuário, 6 foram positivas para o *C. botulinum* tipo E, ao passo que das 325 amostras coletadas no Golfo, 63 (19,0%) continham o mesmo tipo.

CARRDLL et alii, 1966, examinaram um total de 28 amostras compreendendo camarões e truta de areia, coletadas no Golfo da Venezuela e Golfo de Darién, no mar das Antilhas. Deste total, 13 amostras evidenciaram a presença de *C. botulinum*, particularmente naquelas de camarão, de onde se isolaram os tipos A, B e E.

WARD et alii, 1967-c, fizeram um estudo sobre a ocorrência de *C. botulinum* no litoral nordeste do Brasil, coletando amostras no Açude de Araras, Reservatório de Pente-costes, Açude Drós, bem como nas praias de Fortaleza, no Esta-



do do Ceará. Os resultados revelaram que a partir de 5 amostras coletadas no Açude de Araras, uma delas, composta de areia e limo, continha o tipo C; dentre 9 amostras procedentes do Reservatório de Pentecostes, uma de areia vermelha, continha o tipo A, ao passo que entre 12 amostras de areia coletadas na praia de Fortaleza, duas estavam contaminadas com o tipo B e uma delas com o tipo F.

JOHANSEN, em 1963, em uma investigação conduzida na Suécia, demonstrou que os esporos de *C. botulinum* tipo E estavam presentes em 100% das amostras de sedimentos coletados no Mar Báltico, estreito de Katergat e Skagerrack, todos no litoral suéco. Por outro lado, em sedimentos fluviais e lacustres, a positividade para o tipo E variou de 33 a 67%. Além disso, o autor verificou que em amostras de intestino de linguado (*Pleuronectes platessa*) e ciclóptero (*Cyclopterus lampus*), capturados em Sound, houve 22% de positividade para o tipo E, ao passo que em arenques alcançou 100.

CANN et alii, 1967, realizaram um levantamento sobre a ocorrência de *C. botulinum* no litoral da Inglaterra, Noruega e também no Mar do Norte. Em um total de 662 amostras de pescado, compreendendo peixes e moluscos capturados no litoral britânico, houve ausência de isolamento de *C. botulinum*.

Por outro lado, entre 66 amostras de arenque coletadas em águas da Noruega, 27 apresentavam positividade para o tipo E. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que a ocorrência

do tipo E era, provavelmente, muito reduzida no litoral da Grã-Bretanha, tendo no entanto elevada incidência em da águas Noruega.

HUSS et alii, 1974-a realizaram um levantamento em quatro fazendas de criação de trutas na Dinamarca, encontrando uma predominância de *C. botulinum* tipo E. Os outros tipos A e B, também foram encontrados, embora com pouca frequência de isolamento. A ocorrência nas trutas variou de 5 a 100% durante os meses de inverno e início da primavera. No entanto, no fim do verão, ela se revelou uniformemente elevada, oscilando de 85 a 100% em todas as quatro fazendas estudadas. Os resultados obtidos para as amostras retiradas do fundo dos açudes, nem sempre correlacionavam-se com aquelas encontradas para as amostras de truta. Os autores testaram ainda nematóides, caracóis e lesmas coletadas nos mesmos locais, observando uma grande correlação com a incidência do microrganismo nestas amostras e nos sedimentos. Assim, os locais onde as amostras de sedimentos apresentavam índices de contaminação superiores a 38%, a percentagem de invertebrados contaminados era usualmente de 100%; por outro lado, nos tanques sem contaminação nos sedimentos, geralmente não se isolava *C. botulinum* dos nematóides e moluscos. Com base nos resultados alcançados, os autores aventaram a possibilidade da contaminação de trutas por *C. botulinum*, particularmente do tipo E, ser bastante frequente. As pesquisas também evidenciaram ser a ração utilizada na alimentação destes peixes um dos veículos da contamina-

ção, principalmente através das pastas de peixes marinhos empregados como ingredientes.

HUSS et alii, 1974-b, observaram que a contaminação em trutas em viveiros, na Dinamarca, ocorria principalmente no trato intestinal e em menor extensão nas guelras. A remoção manual ou mecânica das vísceras era invariavelmente seguida de uma redução significativa da contaminação dos peixes. Os autores recomendaram que a evisceração deveria ser efetuada imediatamente após a morte, e extremos cuidados deveriam ser tomados para se evitar a contaminação cruzada ou recontaminação durante esta operação.

BURNS & WILLIAMS, 1975, na Escócia, analisaram amostras de truta arco-íris e de sedimentos, coletadas em três viveiros de trutas, dois deles com fundo de concreto e um terceiro com o fundo natural de terra. Nos viveiros do primeiro tipo a presença de *C. botulinum* não foi evidenciada em 48 amostras de trutas examinadas; já no caso de tanques de fundo natural, a bactéria foi isolada a partir de uma amostra de truta e de 9 de sedimentos. Os autores destacaram a possibilidade dos sedimentos de tanques ou viveiros de criação serem uma fonte provável de *C. botulinum*, principalmente em decorrência da presença de solo e deposição de resíduos orgânicos de diversas origens.

CANN et alii, 1975, examinando 400 trutas procedentes de viveiros na Grã-Bretanha, verificaram que a inci-

dência de *C. botulinum* em músculos de peixes era de 9,4%, enquanto no exame de vísceras esta era de 11%.

SMITH & MORRISON, 1977, constataram uma baixa positividade de *C. botulinum* em lagos, canais e rios da Ilha Camargue, ao sul da França, situada entre os rios Petit e Grand Rhones e o Mar Mediterrâneo, compreendendo uma área de 757 km<sup>2</sup>, dos quais 142 são cobertos por lagos e pântanos. A salinidade da região é variável, sendo mais acentuada nas partes mais baixas, ao nível do mar, e ausente nas partes mais altas, ao norte do delta, com 2 a 3 metros acima do nível do mar. Os autores examinaram um total de 46 amostras e a presença de *C. botulinum* tipos B e E foi positivada em 2 amostras de sedimentos lacustres de baixa salinidade, ao passo que nas 44 amostras restantes, apenas 2 (4,5%) foram positivas, sendo em ambas isolado o tipo E.

SMITH et alii, 1978, realizaram um levantamento sobre a distribuição de *C. botulinum* no ambiente aquático da Escócia, Inglaterra e Irlanda. A maioria das amostras analisadas foram coletadas em 1975 e 1976, embora algumas delas o tivessem sido em 1974 e 1977. As amostras de sedimentos foram obtidas em lagos, pântanos, reservatórios, açudes, rios e canais. A partir de um total de 554 amostras, 194 (35%) evidenciaram contaminação; destas, 167 (30,1%) continham o tipo B, 19 (3,4%) o tipo C, 6 (1,1%) o tipo D, 15 (2,7%) o tipo E e 13 (2,3%) continham mais de um tipo. Entre 77 amostras coletadas na Escócia, 18 delas estavam contaminadas com o tipo B

e duas com o tipo C. O número coletado em Gales foi de 43 amostras, com 17 contaminadas com os vários tipos. Na Irlanda, entre 55 amostras, 10 evidenciaram a presença de *C. botulinum* tipo B, enquanto que na Inglaterra, entre 379 amostras examinadas, 161 continham principalmente o tipo B e os tipos C, D e E apareciam em menor proporção.

KRAVCHENKO & SHISHULINA, 1967, realizaram uma pesquisa sobre a distribuição de *C. botulinum* em solos e águas na União das Repúblicas Socialistas Soviéticas, examinando 4242 amostras de solo e 103 de águas coletadas em cinco regiões geográficas. Os autores obtiveram as seguintes porcentagens de isolamento: 8,3 do tipo A; 2,1 do tipo C, 62,2 do tipo E e apenas 1 amostra de solo apresentou resultado positivo para o tipo D.

KANZAWA et alii, 1968, examinaram amostras de sedimentos coletadas em 30 pontos diversos ao longo da costa do Mar do Japão, Oceano Pacífico e Mar Okhotsk, e também em 30 pontos ao longo de rios e lagos em Hokkaido, também no Japão. Em cada um destes 60 locais foram colhidas 30 amostras. Os resultados evidenciaram que em 900 (30 x 30) amostras obtidas nos pontos costeiros, 118 (13,1%) foram positivas para o tipo E, enquanto que entre as 900 coletadas ao longo dos rios e lagos, 168 (18,8%) foram positivas para este tipo. Os autores examinaram também 260 amostras de solo da região de Hokkaido, não constatando, no entanto, a presença de bactéria em nenhuma delas.

MORTOJUDO *et alii*, 1973, efetuaram um estudo sobre a ocorrência de *C. botulinum* em águas de Java e Bali, na Indonésia, com o objetivo de determinar o risco eventual do uso de irradiação no processamento de produtos marinhos. Os autores coletaram nos perímetros costeiros de Java e Bali, 122 amostras de limo, areia, coral e cascalho, 45 de moluscos e crustáceos e 29 de peixes. Coletaram ainda em Java, numa segunda amostragem, mais de 59 amostras, sendo 50 de peixes, 6 de moluscos e crustáceos e 3 de sedimentos. Na primeira época de amostragem, 10 amostras de limo, areia, coral e cascalho, apresentaram resultados positivos para todos os tipos de *C. botulinum*, com excessão do tipo G, enquanto nos exames de amostras de animais, constatou-se uma incidência muito grande do tipo C, seguido dos tipos A, D e F. Na segunda época de amostragem, apenas 7 amostras foram positivas para *C. botulinum*; novamente o tipo C predominou, com 3 amostras positivas, seguido dos tipos B e F, constatados em 2 e 1 amostra respectivamente.

#### 2.1.e - Ocorrência em alimentos

O botulismo é uma neuromielose causada pela ação de uma toxina produzida por *C. botulinum*, atuando no sistema nervoso periférico e com sintomatologia que inclui manifestações gerais e neuromusculares (SAKAGUCHI, 1979). O período de incubação oscila usualmente entre

12 e 36 horas, com intervalo de variação de 4 horas a 4 dias (RIEMANN, 1969). Os sintomas gerais caracterizam-se principalmente por lassidão, fraqueza, xerostomia, dores na faringe e ocasionalmente vômitos e náuseas. Entre as manifestações neurológicas destaca-se a paralisia, afetando inicialmente o globo ocular (ROGERS *et alii*, 1964), desenvolvendo-se pela garganta e tórax e atingindo posteriormente as extremidades; na fase final, diafragma e os músculos do tórax são afetados, impossibilitando a respiração, com a conseqüente asfixia e morte (BOROFF & DAS GUPTA, 1971; SAKAGUCHI, 1979; DOLMAN, 1964; WIRAHADIKUSUMAH, 1968; ROGERS *et alii*, 1964).

O botulismo afeta não apenas os seres humanos, mas também várias espécies de mamíferos, pássaros e peixes (SMITH, 1977).

Segundo o CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1979-b, o botulismo humano é classificado em quatro categorias:

a. Botulismo de origem alimentar - "Food borne botulism", definido como uma intoxicação causada pela ingestão de um alimento contaminado com a toxina botulínica;

b. Botulismo infantil - "Infant botulism", a mais recente forma de botulismo que se conhece e definida como sendo uma intoxicação causada pela absorção da toxina botulínica produzida "in vivo" no trato intestinal de crianças menores de um ano de idade, após a colonização e multiplicação do *C. botulinum* no organismo infantil. Este tipo tem sido associado à inclusão de mel na dieta do lactente;

c. Botulismo por lesão - "Wound botulism", que é a forma mais rara da doença em consequência da formação da toxina "in vivo" após a multiplicação do microrganismo em uma lesão traumatizada ou infeccionada;

d. Botulismo indeterminado - "Classification undetermined", expressão que se aplica aos casos de botulismo em indivíduos maiores de um ano de idade, nos quais não são implicados nem alimentos nem lesões.

A ocorrência de botulismo de origem alimentar, a forma mais comum e mais grave, e governada por três fatores coincidentes: a presença do microrganismo no alimento; o uso de métodos de conservação capazes de destruir células vegetativas, mas não os esporos de *C. botulinum*; e, finalmente, a existência de condições que permitam a proliferação da bactéria no alimento processado, resultando na presença de toxina.

Os tipos de alimentos envolvidos em surtos de botulismo variam nas diversas regiões, sendo consequência do modo de preservação assim como dos hábitos alimentares das populações. A toxina tem sido constatada em uma considerável quantidade de alimentos, tanto de origem vegetal como animal, citando-se entre eles, conservas de milho, beterraba, aspargos, azeitonas verdes, espinafre, cogumelos, atum, patês de figado, presunto, linguiças, lagostas e peixes defumados (CDC, 1978-b; HAUSCHILD *et alii*, 1975; READ *et alii*, 1974; RIEMANN, 1969 e Zottola, 1972). A maioria dos surtos registrados tem sido relacionada com o consumo de conservas caseiras de hortaliças e legumes, frutas, peixes e produtos cárneos, e poucas vezes com alimentos industrializados (LYNT *et alii*, 1975; DDLAUG & PFLAUG, 1978 e ZOTTOLA, 1972).



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização, coleta e preparo das amostras

A pesquisa sobre a ocorrência de *C. botulinum* em pescado envolveu o estudo de peixes (três espécies, sendo duas de escamas e um de couro), crustáceos e moluscos, com as seguintes características:

##### 3.1.a. Pescada-foguete.

Família: Sciaenidae

Gênero: *Macrodon*

Espécie: *Macrodon ancylodon* (Bloch, 1801; Everman e Clark, 1930).

A pescada-foguete ou pescadinha-real ocorre des de a Venezuela, no Golfo de Paria, até a Argentina, na Baía Blanca, sendo que as áreas de maior abundância são as das Guianas e as Regiões Sul e Sudeste do Brasil. A pesca industrial

é realizada por barcos que operam em profundidades de 10 a 30 metros, em locais de fundo de areia e/ou lama, sendo a maior parte da captura feita por barcos de arrastão de parelha. O tamanho comercial da pescada-foguete é de 26 cm, podendo esta espécie alcançar até 1,25 metros de comprimento. Seu regime alimentar é baseado em camarões, diatomáceas e peixes pequenos.

Na presente pesquisa, a captura foi realizada por barcos tipo parelha, na região do Cabo de Santa Marta, no litoral de Santa Catarina, a profundidades de 15 a 22 metros. A coleta das amostras foi feita diretamente nos barcos, por ocasião do desembarque no Porto de Santos. Visando à obtenção de dados mais representativos, as amostragens foram efetuadas em quatro épocas diversas, a saber: nos meses de fevereiro, abril e julho de 1978 e em maio de 1979. Em cada uma destas épocas foram coletadas, ao acaso, 21, 22, 20 e 37 unidades de amostras, respectivamente. Estas amostras foram acondicionadas em caixas plásticas contendo gelo picado e a seguir transportados à Usina-Piloto de Pescado do Instituto de Tecnologia de Alimentos, no Guarujá. Neste local foram embaladas individualmente em sacos plásticos, colocadas no interior de caixas de isopor contendo gelo picado e enviadas, no dia seguinte, ao laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas, Estado de São Paulo, onde foram realizados os exames. De cada amostragem separou-se um exemplar que foi enviado ao Museu de Zoologia da Univer-

sidade de São Paulo para identificação e caracterização da espécie.

Por ocasião dos exames, os peixes eram retirados dos plásticos, seguido de corte na região ventral, com remoção das vísceras, usando-se instrumentos previamente desinfetados em solução de álcool iodado (2 gramas de iodo em 100 ml de álcool etílico), com flambagem posterior. A seguir as vísceras eram colocadas em tubos de ensaio 20 x 220 mm contendo 40 ml do meio de tripticase-extrato de levedura - glicose (TPEG). Após inoculação, os tubos contendo as amostras eram colocados em jarros anaeróbicos, sistema Gas-Pack (BBL - Becton-Dickson), em atmosfera de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, seguido de incubação a 32<sup>o</sup>C durante 5 dias em incubadora Fanen, modelo 347).

### 3.1.b. Bagre-do-mar

Família: Ariidae

Gênero: *Netuna*

Espécie: *Netuna barba* (Lancedede, 1803).

Esta espécie é capturada em todo o litoral brasileiro, em águas estuarinas e lagunares. As amostras utilizadas nesta pesquisa, foram capturadas por barcos tipo parelha, na região do Bom-Abrigo, no litoral de São Paulo, a uma profundidade de 18 a 27 metros. A exemplo do relatado para a pescada-foguete, foram coletadas amostras em quatro épocas diferentes, ou seja: em abril, maio e junho de 1978 (20 unidades de amostras por época) e em janeiro de 1979 (40 unidades). As

amostras foram retiradas do próprio barco por ocasião do desembarque, sendo encaminhadas e preparadas para exame de forma idêntica à relatada para a pescada-foguete.

3.1.c. Sardinha-verdadeira

Família: Clupeidae

Gênero : *Sardinella*

Espécie: *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879).

Esta espécie é capturada desde o Estado do Rio de Janeiro, em Cabo Frio, até Santa Catarina, um pouco ao sul do cabo de Santa Marta, a uma profundidade do redor de 70 metros, o que significa que em alguns pontos a captura se estende até 30 milhas da costa. Trata-se de um peixe pelágico, ingerindo alimentos planctônicos (microcrustáceos, diatomáceas, crustáceos, tunicados e moluscos).

A sardinha desloca-se em grande cardume junto à superfície das águas, servindo, por seu turno, de alimento para peixes maiores. Seu tamanho comercial é de aproximadamente 19 cm, podendo, entretanto, alcançar 26 cm de comprimento. Sua captura é feita através do cerco, quando o cardume aflora à superfície.

No presente trabalho, a captura foi realizada por barcos tipo traineira, na região da Ilha Queimada Grande, no litoral do Estado de São Paulo, e a uma profundidade de 30 a 35 metros. As amostras foram coletadas logo após o desembarque no cais, sem passar pelo sistema de lavagem, e em duas époc

cas diversas, isto e, duas amostragens em junho de 1978, num total de 44 amostras, e uma em janeiro de 1979, num total de 56 sardinhas, ou seja 56 unidades de amostras.

O modo de encaminhamento ao laboratório, para exame, bem como a preparação das amostras para análise, foram os mesmos descritos anteriormente para a pescada-foguete.

#### 3.1.d. Camarão-sete-barbas

Família: Penaeidae

Gênero : *Xiphopenaeus*

Espécie: *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller)

Esta espécie de crustáceo e bentonica, sendo sua captura baseada na utilização de redes de arrasto. Os camarões utilizados nesta pesquisa foram capturados na região de Guaraú, no litoral de Santos, SP, a uma profundidade de 12 metros. As amostras foram obtidas imediatamente após o desembarque em Santos, em duas épocas (janeiro e julho de 1979), sendo que em cada ocasião foram coletadas 50 camarões para exame, o qual era geralmente executado, 24 horas após a coleta. Nesta ocasião, os camarões eram separados individualmente, selecionando-se aqueles não danificados, seguindo-se da remoção do cefalotórax e intestinos, os quais eram recebidos em alforizes previamente esterilizados. Após trituração em condições assépticas, fazia-se a transferência para tubos de ensaio 20x220 mm contendo caldo TPEG, sendo as condições de incubação idênticas às descritas para a pescada-foguete.

### 3.1.e. Ostras

Família: Crassostrea

Espécie : *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck)

Local de cultivo: Ilha de Casca, Cananéia, SP.

Após a coleta, no local de cultivo, as amostras eram acondicionadas em caixas isotérmicas (isopor) contendo gelo picado e enviadas ao laboratório. As amostragens foram realizadas em épocas também diversas, em novembro de 1979 e junho de 1980, coletando-se em cada ocasião 30 e 70 amostras, respectivamente.

Por ocasião dos exames, procedeu-se, inicialmente, à lavagem externa das conchas, seguida de sua abertura com instrumentos apropriados e dentro da máxima assepsia. A seguir os moluscos integrais eram recebidos em tubos de ensaio 20 x 220 mm contendo caldo TPEG, seguido de incubação de forma idêntica à anteriormente descrita.

## 3.2. Detecção de culturas tóxicas

### 3.2.a. Fase I. Preparo dos extratos de culturas

Após incubação nas condições anteriormente mencionadas, removia-se assepticamente 5 ml do sobrenadante da cultura com evidência de crescimento, que eram transferidos para tubos de centrífuga, seguido de centrifugação a 15000g, a 4°C durante 20 minutos, utilizando-se de uma centrífuga refrigera

da marca International, modelo B-20 A. Após a centrifugação, removiam-se porções de 2 ml do sobrenadante que eram colocadas em tubos de ensaio, com ajuste posterior do pH para 6,2, empregando-se hidróxido de sódio 1N como alcalinizante ou ácido clorídrico 1 N como acidificante (CRAIG & PILCHER, 1968). A seguir, adicionava-se 0,2 ml de uma solução de tripsina (Difco 1:250), segundo as recomendações do UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, 1978, para a pesquisa de *C. botulinum* tipo E. O sobrenadante tripsinizado era posteriormente incubado a 35°C por 1 hora, depois transferido para um tubo de ensaio contendo 8 ml de solução tampão gelatina (0,2% de gelatina; 1,0% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH ajustado para 6,2 com HCl 1,0N), segundo especificações de CRAIG & PILCHER, 1967, e submetidas à homogeneização em agitador Vortex Genie. Após esta etapa o material apresentava-se diluído a 1:5. Em seguida, este material era esterilizado por filtração em membrana Millipore, recebendo-se o filtrado estéril em dois tubos de ensaio esterelizados, em porções aproximadas de 5 ml por tubo, para uso posterior nos testes de detecção de *C. botulinum*. Por outro lado o tubo de centrífuga contendo o sedimento da amostra original era estocado a -18°C em congelador, visando a assegurar a existência de material proveniente da amostra original para uso posterior em testes de isolamento de culturas suspeitas.

### 3.2.b. Fase II. Testes para detecção de toxina botulínica

Porções de 0,5 ml do filtrado esterilizado, obti-

do da forma descrita em 3.2.a, eram inoculadas intraperitoneallmente em duas fêmeas de camundongos suíços, *Mus musculus*. Outra porção de 1,0 ml do mesmo filtrado era colocada em tubo de ensaio estéril e aquecida a 100°C durante 10 minutos, com o objetivo de inativar a toxina botulínica eventualmente presente. Após resfriamento deste material, porções de 0,5 ml também eram inoculadas em dois camundongos suíços; finalmente, em 0,5 ml do filtrado estéril era adicionado 0,5 ml de soro antibotulínico polivalente obtido do Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, Estados Unidos da América do Norte, contendo anticorpos para os tipos A, B, C, D, E e F, seguido também da inoculação em dois camundongos suíços em porções de 0,5 ml por camundongo.

Após a execução dos diferentes testes, os camundongos eram submetidos à observação durante 96 horas, visando a constatar evidências sintomáticas do botulismo, caracterizada principalmente pelas seguintes reações: respiração ofegante, dificuldade de andar, paralisia progressiva incapacitando a locomoção e finalmente asfixia e morte.

Os testes da fase II eram considerados positivos, ou seja, com a comprovação da presença de toxina botulínica, quando os seguintes resultados eram observados: a) morte dos dois camundongos que receberam o filtrado estéril triplsinizado; b) sobrevivência dos dois camundongos que receberam o filtrado estéril submetido ao tratamento térmico; c) sobrevivência daqueles animais que foram inoculados com o



filtrado estéril neutralizado pelo anti-soro polivalente.

### 3.2.c. Fase III. Identificação do tipo de toxina botulínica

Quatro porções de 0,5 ml do filtrado esterilizado foram adicionadas separadamente em 0,5 ml de anti-soro monovalente tipos A, B, E e F, seguido de injeção intraperitoneal em pares de camundongos, em quantidades de 0,5 ml por animal. O par de camundongos sobreviventes indicaria o tipo de toxina presente; no caso de morte de todos os camundongos, independente de proteção com anti-soro de tipos A, B, E e F, havendo, no entanto, sobrevivência quando protegidos com o anti-soro polivalente, na fase II, o qual contém anticorpos para os tipos A, B, C, D, E e F, haveria indicação da existência de toxinas do tipo C ou D. No entanto, na presente pesquisa, pela não disponibilidade de anti-soros específicos para os tipos C e D, as culturas com estas características foram denominadas *C. botulinum* tipo não identificado.

Completada esta fase, passou-se então à fase IV, envolvendo o isolamento de *C. botulinum* presente na amostra tóxica

### 3.2.d. Fase IV. Isolamento de *C. botulinum*

Uma vez caracterizada a presença de *C. botulinum* na amostra, o sedimento original, obtido da forma descri-

ta em 2.a., era retirado do congelador e adicionado a tubos de ensaio contendo o meio de TPEG previamente desaerado, seguindo-se de incubação a 32<sup>o</sup>C durante 3 dias em jarros anaeróbios Gas-Pack, em atmosfera de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Após incubação e evidenciando-se a presença de esporos, por microscopia direta, retirava-se porções de 1,0 ml da cultura e colocava-as em tubos de ensaio contendo 1,0 ml de álcool etílico P.A.; após incubação a temperatura ambiente por 1 hora, efetuava-se estrias do material em placas contendo os meios de Tripticase - Sal - ágar - gema de ovo (TS gema de ovo), Tripticase-Pepton-Extrato de levedura-gema de ovo (TPEG gema de ovo) e meio de Sacarose-gema de ovo (S-gema de ovo). O meio de TPEG gema de ovo, foi na presente pesquisa, obtido a partir da modificação do meio de enriquecimento TPEG pela inclusão de gema de ovo, na proporção de 10% como nos dois primeiros. A seguir o material era incubado em jarros anaeróbios Gas-Pack a 32<sup>o</sup>C durante 3 dias. No caso de haver desenvolvimento de colônias suspeitas nos meios de TS-gema de ovo (STIEBERS, 1967) e TPEG-gema de ovo, procedia-se ao exame microscópico do material efetuando-se as colorações de Gram (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION OF FOODS, 1979) e de esporos pelo método descrito em HARRIGAN & McCANCE, 1976. A caracterização de células em forma de bastonetes Gram positivos, com esporos subterminais, usualmente com diâmetro maior que o das células vegetativas, eram indicativas da presença de *Clostridium* sp. Neste caso, efetuavam-se novas inoculações do material das colô-

nias observadas em meio de TPEG, cuja finalidade era testar a cultura quanto à sua toxicidez. O tubo contendo o inóculo em meio de TPEG era então incubado a 32°C durante 5 dias em jarro anaeróbico. O meio de Sacarose-gema de ovo, no qual a cultura após tratamento com álcool foi inoculada, tinha a finalidade de caracterizar a presença de compostos semelhantes ao amido, e produzidos por cepas de *C. botulinum* tipo E (STIEBERS, 1967). Com este objetivo, após incubação, uma pequena porção das colônias indicativas de *Clostridium*, ou seja com diâmetros de aproximadamente 2,0 mm, irregulares quanto aos bordos e apresentando fermentação da sacarose, era retirada com o auxílio de uma alça de platina e friccionada sobre um disco de papel de filtro Whatman número 1, previamente embebido em solução de iodeto de potássio (1,0 grama de iodo - 3,0 gramas de iodeto de potássio em 299 ml de água destilada) (STIEBERS, 1967). As culturas do tipo E apresentariam uma coloração azul escura ou preta devido à presença de tais compostos.

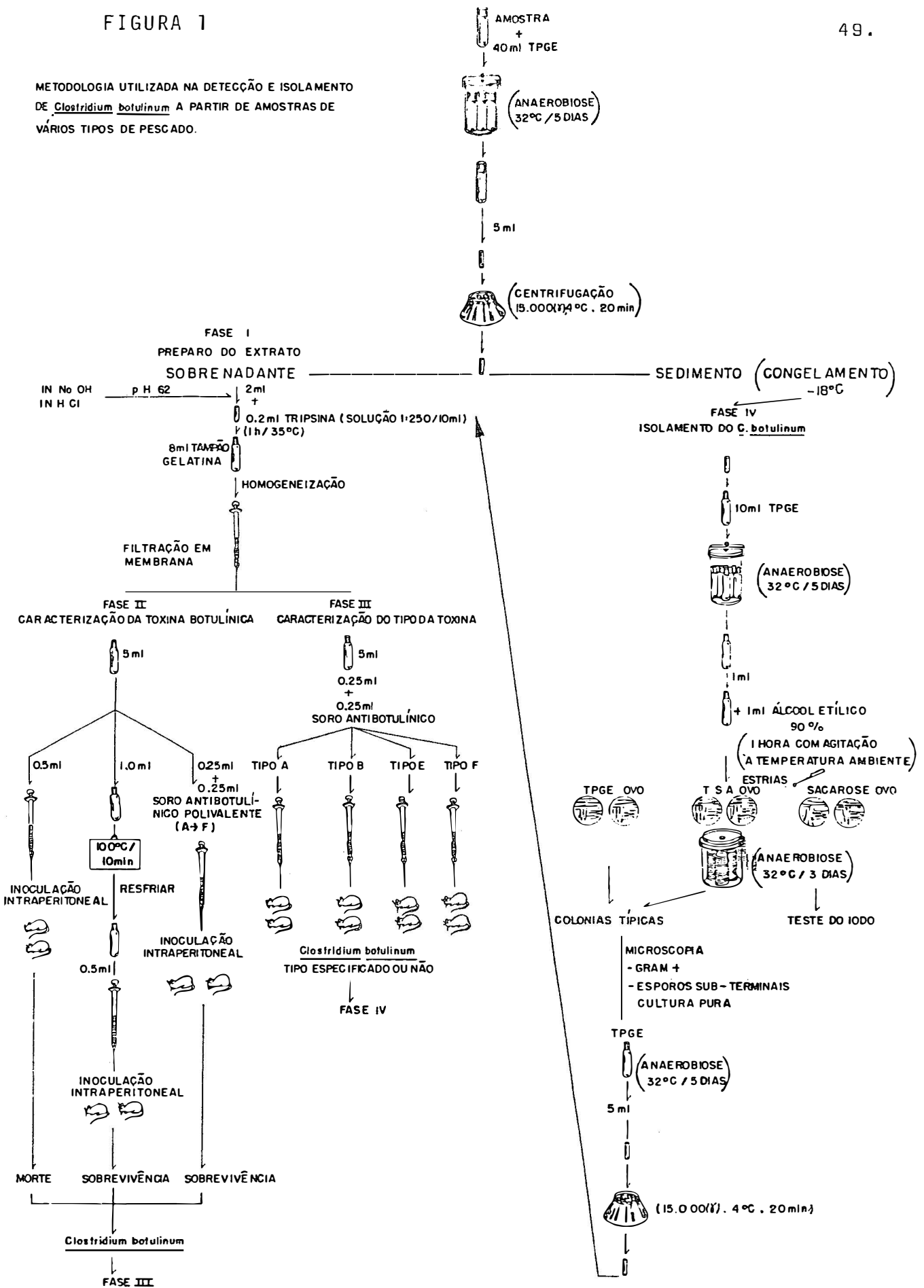
Em continuação, as culturas que foram incubadas em meio de TPEG, eram submetidas a testes adicionais. Inicialmente, separava-se uma alíquota de 5,0 ml que era transferida para um tubo de centrífuga e submetida à centrifugação de forma idêntica àquela descrita em 2.a. A seguir, o sobrenadante era testado em relação à presença de toxina botulínica, de forma análoga à mencionada anteriormente em 2.b. e 2.c.

O fluxuograma contido na figura 1 evidencia de

de forma suscinta todo o procedimento empregado para a caracterização da toxina botulínica como também para o isolamento da bactéria.

FIGURA 1

METODOLOGIA UTILIZADA NA DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE *Clostridium botulinum* A PARTIR DE AMOSTRAS DE VÁRIOS TIPOS DE PESCADO.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da presente pesquisa revelaram a presença constante de *C. botulinum* em pescados marinhos, independentemente da espécie, local e época de captura. Os dados contidos na Tabela 2 resumem estes resultados.

TABELA 2. Positividade para *Clostridium botulinum* em amostras de pescado.

| Tipos de pescado    | Número de amostras<br>examinadas | Positividade para<br><i>C. botulinum</i> (%) |
|---------------------|----------------------------------|--|
| Pescada-foguete     | 100                              | 31,0   |
| Bagre-do-mar        | 100                              | 31,0   |
| Sardinha verdadeira | 100                              | 4,0  |
| Camarão-sete-barbas | 100                              | 35,0   |
| Ostras              | 100                              | 34,0   |
| TOTAL               | 500                              | 27,0   |

Quando comparados com os resultados obtidos por outros autores, trabalhando com espécies diversas, em vários países, observa-se que, entre outros, CRAIG *et alii*, 1967, relataram positivities médias de 13,0% em amostras de salmão capturado na costa do Pacífico e Rio Colúmbia, nos Estados Unidos da América do Norte; WARD *et alii*, 1967, durante o exame de pescado capturado na costa leste dos Estados Unidos da América do Norte detectaram positivities médias para *C. botulinum* de 3,3%; GRAIKOSKI *et alii*, 1968, na região dos Grandes Lagos, também nos Estados Unidos da América do Norte, encontraram uma percentagem de 21,8% de *C. botulinum* em amostras de pescado. Já HUSS *et alii*, 1974-a, na Dinamarca, encontraram que a percentagem de contaminação de trutas por *C. botulinum* variava de 5,0 a 100% durante o inverno e início da primavera e de 85 a 100% no verão.

Por outro lado, nos testes de identificação dos tipos de *C. botulinum* presentes nas várias amostras, observou-se uma elevada predominância do tipo E, seguido dos tipos F, B, A e tipos não-identificados, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Comparando-se os resultados contidos na Tabela 3 com os de outros autores, verifica-se que, entre outros, BOTT *et alii*, 1967, no exame do trato intestinal de peixes coletados em lagos e baías na região dos Grandes Lagos, nos Estados Unidos da América do Norte, encontraram valores médios de ocorrência de *C. botulinum* tipo E ao redor de 11,0%. GRAIKOSKI *et*

TABELA 3. Tipos de *C. botulinum* isolados a partir de 500 amostras de pescado

| Tipos de Clostridium botulinum | Frequência de isolamentos |      |
|--------------------------------|---------------------------|------|
|                                | (Nº)                      | (%)  |
| E                              | 69                        | 13,8 |
| F                              | 23                        | 4,6  |
| B                              | 15                        | 3,0  |
| A                              | 13                        | 2,6  |
| Não identificado               | 8                         | 1,6  |
| A e E                          | 2                         | 0,4  |
| A e B                          | 1                         | 0,2  |
| A e F                          | 1                         | 0,2  |
| E e F                          | 1                         | 0,2  |
| Não identificado e E           | 1                         | 0,2  |
| Não identificado e B           | 1                         | 0,2  |
| TOTAL                          | 135                       | 27,0 |

alii, 1968, examinando amostras de peixes capturados no mesmo local, encontraram uma frequência de contaminação pelo tipo E de 21,8%. Já CANN et alii, 1967, encontraram níveis de positividade também para o tipo E de 45,0%, quando examinavam arenques capturados no litoral noruegues. Por outro lado, baixos índices de ocorrência para este tipo foram constatados por NICKERSON et alii, 1967, no exame de amostras de peixes coletadas no Golfo de Maine, nos Estados Unidos da América do Nor



te; estes autores verificaram uma freqüência de contaminação por *C. botulinum* tipo E não superior a 4,5%. Também HOUGHTBY & KAYSNER, 1969, examinando amostras de guelras e vísceras de salmões capturados nas costas dos Estados de Washington, Oregon e Alasca, nos Estados Unidos da América do Norte, constataram positivities para *C. botulinum* tipo E de 0,1 e 2,2% nas vísceras e guelras, respectivamente.

Os dados contidos na Tabela 4 relatam a freqüência de isolamento de *C. botulinum* a partir de amostras de pescada-foguete. Observa-se pelos dados da Tabela 4 que 31,0% das amostras examinadas revelaram a presença da bactéria e de suas toxinas, com predominância marcante do tipo E (93,5%) em relação ao tipo A (6,4%).

TABELA 4. Positividade para *C. botulinum* em extratos obtidos a partir da inoculação de vísceras de pescada-foguete em meios de enriquecimento

| Época de Amostragem | Número de amostras examinadas | Amostras tóxicas |      | Tipos de <i>C. botulinum</i> isolados |      |    |       |
|---------------------|-------------------------------|------------------|------|---------------------------------------|------|----|-------|
|                     |                               |                  |      | A                                     |      | E  |       |
|                     |                               |                  |      | Nº                                    | %    | Nº | %     |
| Fevereiro/78        | 21                            | 12               | 57,1 | 0                                     | 0,0  | 12 | 100,0 |
| Abril/78            | 22                            | 3                | 13,6 | 0                                     | 0,0  | 3  | 100,0 |
| Julho/78            | 20                            | 3                | 15,0 | 0                                     | 0,0  | 3  | 100,0 |
| Maior/79            | 37                            | 13               | 35,0 | 2                                     | 15,3 | 11 | 84,6  |
| TOTAL               | 100                           | 31               | 31,0 | 2                                     | 6,4  | 29 | 93,5  |

Conforme anteriormente discutido, fatores como o hábito alimentar da espécie de pescado e suas características de habitat (espécies demersais ou pelágicas) seriam provavelmente os de maior importância que iriam influir na maior ou menor positividade para *C. botulinum*; por outro lado, não seria de se esperar uma influência marcante da época de captura na variação da presença da bactéria. Assim sendo, as diferentes percentagens de amostras tóxicas em função da época de coleta seriam muito mais devidas a variações naturais dos níveis de contaminação do que à eventual influência da estação do ano. Dados obtidos por HUSS & PEDERSEN, 1979, confirmam estas afirmativas; estes autores, examinando vísceras de peixes, não encontraram qualquer correlação entre a época de amostragem e a frequência de contaminação. Por outro lado, a região de captura do pescado pode exercer uma influência nos níveis de contaminação das amostras. Trabalhos desenvolvidos por CANN et alii, 1967, em várias regiões da Europa, evidenciaram haver sensíveis variações na presença de *C. botulinum* em algumas áreas. Assim, sabe-se que em determinadas regiões do litoral nórdico, a positividade para a bactéria em amostras de sedimentos e em diferentes espécies de pescado é extremamente elevada (40,0%), enquanto no litoral inglês a bactéria é virtualmente ausente (CANN et alii, 1967).

Quando analisados comparativamente, os dados da presente pesquisa diferem daqueles relatados por outros autores. Assim, CANN et alii, 1967, examinando amostras de pescada-branca coletadas em águas costeiras da Inglaterra, não

conseguiram detectar *C. botulinum* tipo E, ao passo que NICKERSON et alii, 1967, nos Estados Unidos da América do Norte, constataram apenas 4,5% de amostras de pescada-polaca contaminadas com este tipo. Por outro lado, HUSS & PEDERSEN, 1979, com base em pesquisas realizadas por WARD et alii, 1967-c e CARROLL et alii, 1966, afirmam que a ocorrência de *C. botulinum* tipo E em águas tropicais da América Latina é muito restrita; no entanto, os dados da presente pesquisa não confirmam estas observações, uma vez que a presença de *C. botulinum* tipo E foi positivada em todas as espécies de pescado examinadas.

No exame de amostras de bagre-do-mar, os níveis de positividade para *C. botulinum* foram idênticos aos constatados para a pescada-foguete (31,0%); no entanto, conforme pode ser observado pelas Tabelas 5 e 6, houve uma maior diversidade nos tipos encontrados, tanto em material proveniente dos extratos (Fases I, II e III) como nas culturas puras isoladas a partir dos sedimentos centrifugados (Fase IV).

Novamente, houve predominância de *C. botulinum* tipo E (54,8%) tanto nos extratos como nos sedimentos, mas a ocorrência dos tipos A, B e F foi caracterizada, conjuntamente, em um total de 35,3 e 38,6% das amostras de extratos e sedimentos, respectivamente. Observou-se ainda que, em algumas amostras, embora fosse positivada a presença de *C. botulinum*, não foi possível a detecção final do tipo específico, pela não disponibilidade de anti-soros próprios para os tipos C e D; assim sendo, é plausível supor-se que as culturas com a denominação "não identificadas" sejam na verdade representantes destes tipos.

TABELA 5. Positividade para *C.botulinum* em extratos obtidos a partir da inoculação de vísceras de bagre-do-mar em meio de enriquecimento.

| Época de Amostragem | Número de Amostras examinadas | Amostras tóxicas |      | Tipos de <i>C. botulinum</i> detectados |      |    |      |    |      |    |      |                   |      |
|---------------------|-------------------------------|------------------|------|---|------|----|------|----|------|----|------|-------------------|------|
|                     |                               | Nº               | %    | A                                       |      | B  |      | E  |      | F  |      | Não identificados |      |
|                     |                               |                  |      | Nº                                      | %    | Nº | %    | Nº | %    | Nº | %    | Nº                | %    |
| Abril/78            | 20                            | 3                | 15,0 | 0                                       | 0,0  | 0  | 0,0  | 2  | 66,0 | 1  | 33,0 | 0                 | 0,0  |
| Maió/78             | 20                            | 8                | 40,0 | 2                                       | 25,0 | 2  | 25,0 | 4  | 50,0 | 0  | 0,0  | 0                 | 0,0  |
| Julho/78            | 20                            | 5                | 25,0 | 0                                       | 0,0  | 0  | 0,0  | 4  | 80,0 | 0  | 0,0  | 1                 | 20,0 |
| Janeiro/78          | 40                            | 15               | 37,5 | 0                                       | 0,0  | 1  | 6,6  | 7  | 46,6 | 5  | 33,0 | 2                 | 13,3 |
| TOTAL               | 100                           | 31               | 31,0 | 2                                       | 6,4  | 3  | 9,6  | 17 | 54,8 | 6  | 19,3 | 3                 | 9,6  |

TABELA 6. Isolamento de *C. botulinum* a partir da inoculação de sedimentos de culturas de vísceras de bagre-do-mar em meio de isolamento.

| Época de Amostragem | Número de Amostras  |                  | Tipos de <i>C. botulinum</i> isolados |   |      |   |      |    |      |   |                   |   |      |
|---------------------|---------------------|------------------|---------------------------------------|---|------|---|------|----|------|---|-------------------|---|------|
|                     | Amostras examinadas | Amostras tóxicas | A                                     |   | B    |   | E    |    | F    |   | Não identificados |   |      |
|                     |                     |                  | Nº                                    | % | Nº   | % | Nº   | %  | Nº   | % |                   |   |      |
| Abril/78            | 20                  | 3                | 15,0                                  | 0 | 0,0  | 0 | 0,0  | 2  | 66,0 | 1 | 33,0              | 0 | 0,0  |
| Maior/78            | 20                  | 8                | 40,0                                  | 2 | 25,0 | 2 | 25,0 | 4  | 50,0 | 0 | 0,0               | 0 | 0,0  |
| Julho/78            | 20                  | 5                | 25,0                                  | 0 | 0,0  | 0 | 0,0  | 4  | 80,0 | 0 | 0,0               | 1 | 20,0 |
| Janeiro/79          | 40                  | 15               | 37,0                                  | 0 | 0,0  | 2 | 13,0 | 7  | 46,6 | 5 | 33,3              | 1 | 6,6  |
| TOTAL               | 100                 | 31               | 31,0                                  | 2 | 6,4  | 4 | 12,8 | 17 | 54,8 | 6 | 19,3              | 2 | 6,4  |

É interessante notar-se pelas Tabelas 5 e 6, que a distribuição dos tipos de *C. botulinum* nas mesmas amostras difere conforme o exame tenha sido realizado diretamente no extrato da cultura ou a partir do sedimento obtido da sua centrifugação. Tal constatação poderia ser parcialmente explicada pela possibilidade da ocorrência de mais de um tipo de *C. botulinum* numa mesma amostra; a predominância de um outro tipo nas culturas de enriquecimento e a conseqüente presença de toxina no extrato separado iria depender fundamentalmente dos números relativos de células vegetativas ou de esporos na amostra inicial (vísceras), bem como na melhor adequação dos mesmos ao meio de enriquecimento e condições de incubação. Por outro lado, pela efetivação de estrias de isolamento a partir das amostras de sedimentos obtidos por centrifugação dos caldos de enriquecimento, a possibilidade de isolamento de outros tipos seria acrescida; nesta etapa, as amostras foram inicialmente tratadas com álcool etílico visando à destruição de células vegetativas. Nestas condições, pelo emprego de estrias sucessivas, com esgotamento do inóculo, o isolamento dos diversos tipos presentes seria mais viável, independente da predominância de qualquer um deles.

Os resultados obtidos deixam evidente que as técnicas recomendadas tradicionalmente para a caracterização de *C. botulinum* em alimentos (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH,

EDUCATION AND WELFARE, 1978; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 1979 e KAUTTER & LYNT, 1976], embora bastante eficientes, não asseguram a caracterização dos diferentes tipos eventualmente presentes numa amostra; é evidente que, em face da sua simplicidade e rapidez de execução, estas técnicas seriam as de preferência em análises de rotina ou fiscalização. No entanto, em estudos mais pormenorizados, a tentativa de isolamento de culturas puras a partir de sedimentos da centrifugação de amostras seria inteiramente justificada.

Embora o bagre-do-mar também seja uma espécie demersal, a exemplo da pescada-foguete, seus hábitos alimentares diferem bastante, uma vez que sua alimentação é constituída fundamentalmente de lodo ou sedimentos e considerando que é neste tipo de substrato que o *C. botulinum* ocorre em maior abundância, seria de se esperar uma maior ocorrência desta bactéria nas vísceras; no entanto, conforme anteriormente mencionado, os índices de positividade foram idênticos para ambas as espécies, com a ressalva da diversidade dos tipos constatados nas amostras de bagre-do-mar.

Cumprindo ainda lembrar que embora se utilizasse de dois diferentes meios sólidos com a finalidade de isolamento, por razões que serão posteriormente mencionadas, este procedimento foi realizado a partir do meio de TPEG modificado, a exceção para o tipo E.

A Tabela 7 mostra os resultados dos exames de

amostras de sardinha-verdadeira coletadas em duas épocas diversas.

TABELA 7. Positividade para *C. botulinum* em extratos obtidos a partir da inoculação de vísceras de sardinha-verdadeira em meio de enriquecimento.

| Época de Amostragem | Número de amostras examinadas | Amostras tóxicas |     | Tipos de <i>C. botulinum</i> detectados |      |    |      |
|---------------------|-------------------------------|------------------|-----|---|------|----|------|
|                     |                               |                  |     | E                                       |      | F  |      |
|                     |                               |                  |     | Nº                                      | %    | Nº | %    |
| Junho/78            | 44                            | 0                | 0,0 | 0                                       | 0,0  | 0  | 0,0  |
| Janeiro/79          | 56                            | 4                | 7,1 | 3                                       | 75,0 | 1  | 25,0 |
| TOTAL               | 100                           | 4                | 4,0 | 3                                       | 75,0 | 1  | 25,0 |

Nesta espécie, a presença de *C. botulinum* foi muito menos freqüente, com apenas 4,0% de amostras tóxicas, e, mais uma vez, com a predominância do tipo E (75,% das culturas tóxicas) e com apenas um isolamento do tipo F. Ao contrário da pescada-foguete e principalmente do bagre-do-mar, a sardinha-verdadeira é uma espécie pelágica, alimentando-se predominantemente de plâncton e não incluindo em sua dieta alimentar o lodo, sedimentos ou animais mortos. É possível que esta diversidade de hábitos alimentares contribua para os menores índices de contaminação dessa espécie.



Comparando-se estes resultados com os obtidos por HUSS & PEDERSEN, 1979, observa-se uma grande similaridade. Assim, aqueles autores obtiveram 18% de positividade média para *C. botulinum* em espécies pelágicas coletadas no mar Báltico; 0,0% naquelas coletadas no mar do Norte e 1,0% nas coletadas no Atlântico Norte.

A pesquisa conduzida em amostras de crustáceos (camarão - sete-barbas) evidenciou níveis de positividade de 35,0% para estas amostras, também coletadas em duas épocas diferentes (Tabelas 8 e 9).

A exemplo do relatado para o bagre-do-mar, houve uma acentuada diversidade nos tipos de *C. botulinum* isolados, tanto nos extratos de culturas como a partir dos sedimentos. O tipo E predominou (28,5%), seguido dos tipos F, A e B com 20,0, 17,1 e 17,1% de isolamentos, respectivamente.

No entanto, quando se pesquisou os sedimentos obtidos da centrifugação do meio de enriquecimento, consta - tou-se a presença de mais de um tipo de *C. botulinum* em algumas amostras (Tabela 9), usualmente com a ocorrência dos tipos A e B, A e F e B e tipo não identificado; além disso, em 8,5% dos isolamentos não foi possível a caracterização do tipo, indicando, portanto a presença dos tipos C ou D.

Os camarões apresentam hábitos alimentares mais complexos, incluindo na sua dieta o consumo de animais mortos; além disso, habitam principalmente áreas lagunares, ricas em matéria orgânica e detritos diversos, sendo portanto de se es

TABELA 8. Positividade para *C. botulinum* em extratos obtidos a partir da inoculação de vísceras cefalotórax de camarão-sete-barbas em meio de enriquecimento

| Época de Amostragem | Número de Amostras examinadas | Amostras tóxicas | Tipos de <i>C. botulinum</i> detectados |   |      |   |      |    |      |   |                   |   |      |
|---------------------|-------------------------------|------------------|---|---|------|---|------|----|------|---|-------------------|---|------|
|                     |                               |                  | A                                       |   | B    |   | E    |    | F    |   | Não identificados |   |      |
|                     |                               |                  | Nº                                      | % | Nº   | % | Nº   | %  | Nº   | % | Nº                | % |      |
| Janeiro/79          | 50                            | 16               | 32,0                                    | 3 | 18,7 | 3 | 18,7 | 6  | 37,5 | 2 | 12,5              | 2 | 12,5 |
| Julho/79            | 50                            | 19               | 38,0                                    | 3 | 15,7 | 3 | 15,7 | 4  | 21,0 | 5 | 26,3              | 4 | 21,0 |
| TOTAL               | 100                           | 35               | 35,0                                    | 6 | 17,1 | 6 | 17,1 | 10 | 28,5 | 7 | 20,0              | 6 | 17,1 |

TABELA 9. Isolamento de *C. botulinum* a partir da inoculação de sedimentos de culturas de vísceras e cefalotórax de camarão-sete-barbas em meio de isolamento.

| Época de Amostragem | Amostras examinadas tóxicas |      | Tipos de <i>C. botulinum</i> detectados |      |   |      |     |      |                    |      |    |     |    |     |   |      |
|---------------------|-----------------------------|------|---|------|---|------|-----|------|--------------------|------|----|-----|----|-----|---|------|
|                     | Nº                          | %    | A                                       | B    | E | F    | A+E | A+F  | B <sup>+</sup> NI* | NI*  | Nº | %   | Nº | %   |   |      |
| Janeiro/79          | 50                          | 32,0 | 3                                       | 18,7 | 3 | 18,7 | 6   | 37,5 | 3                  | 18,7 | 1  | 6,2 | 0  | 0,0 | 0 | 0,0  |
| Julho/79            | 50                          | 38,0 | 3                                       | 15,7 | 3 | 15,7 | 4   | 21,0 | 4                  | 21,0 | 0  | 0,0 | 1  | 5,2 | 3 | 15,7 |
| TOTAL               | 100                         | 35   | 6                                       | 17,1 | 6 | 17,1 | 10  | 28,5 | 7                  | 20,0 | 1  | 2,8 | 1  | 2,8 | 3 | 8,5  |

\* não identificado.

perar que nestes animais a presença de *C. botulinum* seja relativamente freqüente. Pesquisas conduzidas por outros autores, em outros países, confirmam estas afirmativas. Assim, CARROLL *et alii*, 1966, examinando um reduzido número de amostras de camarão coletadas no Golfo da Venezuela e Golfo de Darién, na Venezuela, obtiveram recuperação de 13% de *C. botulinum* tipo A, 13,0% das amostras contendo os tipos A e E, 13,0% contendo o tipo C, 4,3% o tipo B e 4,3% o tipo E.

A última espécie de pescado estudada foi a ostra, molusco freqüente em águas estuarinas e cultivado comercialmente. Estes animais vivem usualmente em águas ricas em matéria orgânica, acrescido do fato de que na sua atividade fisiológica absorvem e expelem um volume muito grande de água visando à obtenção e ao acúmulo de nutrientes nela dissolvidos. Também, neste caso, seria de se esperar índices elevados de contaminação por *C. botulinum*; no entanto estes não foram superiores a 34,0%, e novamente com a predominância do tipo E (29,4% dos isolamentos) ao lado da ocorrência dos tipos A, B, F e não identificados (Tabela 10).

A exemplo do mencionado para as amostras de camarão, alguns sedimentos de cultivo evidenciaram a presença de mais de um tipo de *C. botulinum*, particularmente combinações do tipo A com os tipos B e E, além da ocorrência dos tipos E e F, como mostra a Tabela 11.

A ocorrência de *C. botulinum* em moluscos é relatada por vários autores: CRAIG *et alii*, 1967, nos Estados

TABELA 10. Positividade para *C. botulinum* em extratos obtidos a partir da inoculação de ostras em meio de enriquecimento.

| Época de Amostragem | Número de Amostras examinadas |      | Tipos de <i>C. botulinum</i> detectados |     |    |      |                   |      |   |      |    |      |
|---------------------|-------------------------------|------|---|-----|----|------|-------------------|------|---|------|----|------|
|                     | Amostras tóxicas              |      | B                                       |     | E  |      | Não identificados |      |   |      |    |      |
|                     | Nº                            | %    | Nº                                      | %   | Nº | %    | Nº                | %    |   |      |    |      |
| Novembro/79         | 30                            | 43,3 | 1                                       | 7,6 | 0  | 0,0  | 3                 | 23,0 | 2 | 15,3 | 7  | 53,8 |
| Junho/80            | 70                            | 30,0 | 2                                       | 9,5 | 5  | 24,0 | 7                 | 33,3 | 4 | 19,0 | 3  | 14,2 |
| TOTAL               | 100                           | 34,0 | 3                                       | 6,8 | 5  | 14,7 | 10                | 29,4 | 6 | 17,6 | 10 | 29,4 |

TABELA 11. Isolamento de *C. botulinum* a partir de sedimentos de culturas de ostras inteiras em meio de isolamento

| Época de amostragem | Amostras Examinadas |      | Tipos de <i>C. botulinum</i> detectados |     |     |      |      |      |      |      |       |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------|---------------------|------|---|-----|-----|------|------|------|------|------|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                     | Nº                  | %    | A                                       | B   | E   | F    | NI*  | A+B  | A+E  | E+F  | E+NI* |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Novembro/79         | 30                  | 43,3 | 1                                       | 7,6 | 0   | 0,0  | 3    | 23,0 | 4    | 30,7 | 2     | 15,3 | 1   | 7,6 | 0   | 0,0 | 1   | 7,6 |     |     |     |
| Junho/79            | 70                  | 30,0 | 2                                       | 9,5 | 5   | 23,8 | 7    | 33,3 | 5    | 23,8 | 1     | 4,7  | 0   | 0,0 | 0   | 0,0 | 1   | 4,7 | 0   | 0,0 |     |
| TOTAL               | 100                 | 34   | 34,0                                    | 3   | 8,8 | 5    | 14,7 | 10   | 29,4 | 9    | 26,4  | 3    | 8,8 | 1   | 2,9 | 1   | 2,9 | 1   | 2,9 | 1   | 2,9 |

\* não identificado

Unidos da América do Norte, constataram uma ocorrência desta bactéria em 31,2% de amostras de ostras examinadas, enquanto que PRESSNELL et alii, 1962, naquela mesmo país, verificaram uma ocorrência de *C. botulinum* tipo E em 2,7% das ostras examinadas. Entretanto, em amostras de moluscos capturados no litoral inglês, CANN et alii, 1967, não conseguiram isolar esta bactéria.

Algumas considerações poderiam ser feitas com relação a metodologia empregada no isolamento de culturas puras, a partir de amostras de sedimentos obtidos pela centrifugação dos meios de enriquecimento. Sabe-se que a caracterização de *C. botulinum* é baseada principalmente no desenvolvimento de um halo opalescente observado em meios contendo gema de ovo. Este halo, resultante da degradação da lecitina e constituído principalmente de proteínas insolúveis, foi claramente observado no meio de Trypticase-Sal-ágar-gema de ovo (TS-gema de ovo), bem como no meio de Trypticase-extrato de levedura-gema de ovo (TPEG-gema de ovo). Este último meio, sem incorporação de gema de ovo, vem sendo recomendado principalmente no isolamento e manutenção de *C. botulinum* tipo E (STIEBERS, 1967 e CRAIG et alii, 1967); no entanto, a incorporação de gema de ovo revelou-se altamente vantajosa, possibilitando o desenvolvimento de colônias grandes (0,2 a 0,4 mm de diâmetro); circulares, com halos de precipitação nítidos e uniformes, mostrando-se mais adequado que o meio de TS-gema de ovo, no qual as colônias eram menores e os halos de precipitação

bastante grandes, irregulares, em torno de 10,0 mm de diâmetro e geralmente confluentes, conforme evidenciado nas Figuras 2 e 4, enquanto que as Figuras 3 e 5 mostram as características morfológicas de colônias de *C. botulinum* tipo B em meio de TPEG-gema de ovo e TS-gema de ovo.

Outra característica cultural importante de *C. botulinum* é a formação da camada aperolada ("pearly layer"), evidenciada pelo brilho típico da colônia e devida à produção de ácidos graxos livres, formados pela degradação dos lípidos neutros (HOBBS et alii, 1971). Esta característica foi observada nos meios de TS-gema de ovo e TPEG-gema de ovo.

Resultados muito satisfatórios foram obtidos em relação à caracterização de *C. botulinum* tipo E mediante o teste de iodo, efetuado a partir das colônias isoladas em meio de Sacarose-gema de ovo. Este teste preconizado por STIEBERS, 1967, mostrou-se altamente eficiente na identificação presumtiva deste tipo, o qual, dentre todos os testados, foi o único a apresentar reação positiva como evidenciado nas Figuras 6 e 7.





FIGURA 2. Morfologia das colônias de *C. botulinum* tipo B em meio de TS gema de ovo.

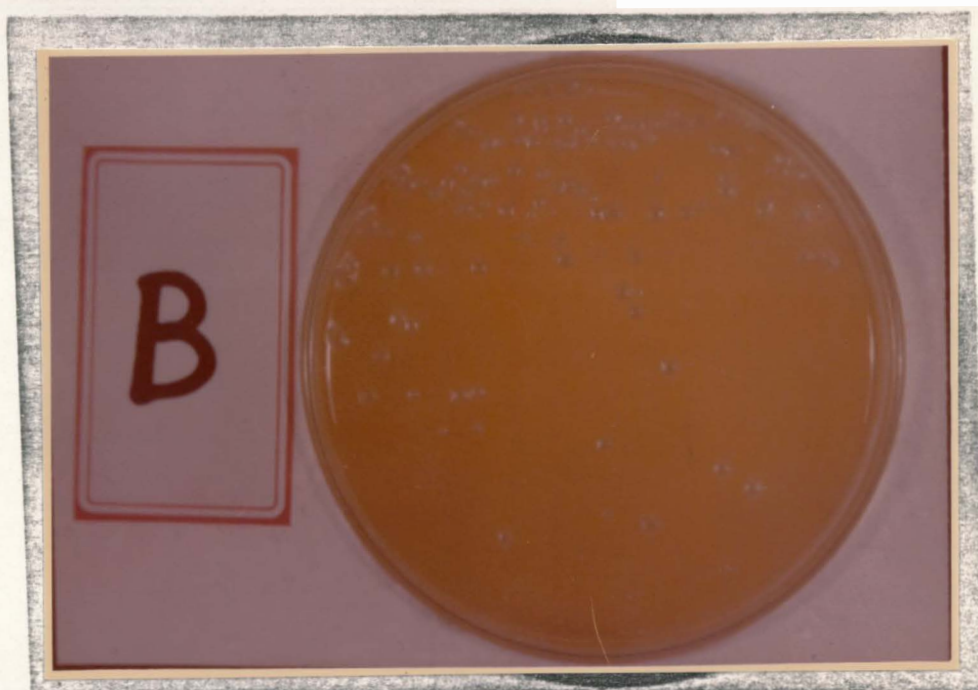


FIGURA 3. Morfologia das colônias de *C. botulinum* tipo B em meio de TPEG-gema de ovo.



FIGURA 4. Características morfológicas das colônias de *C. botulinum* tipo B em meio de TS-gema de ovo.

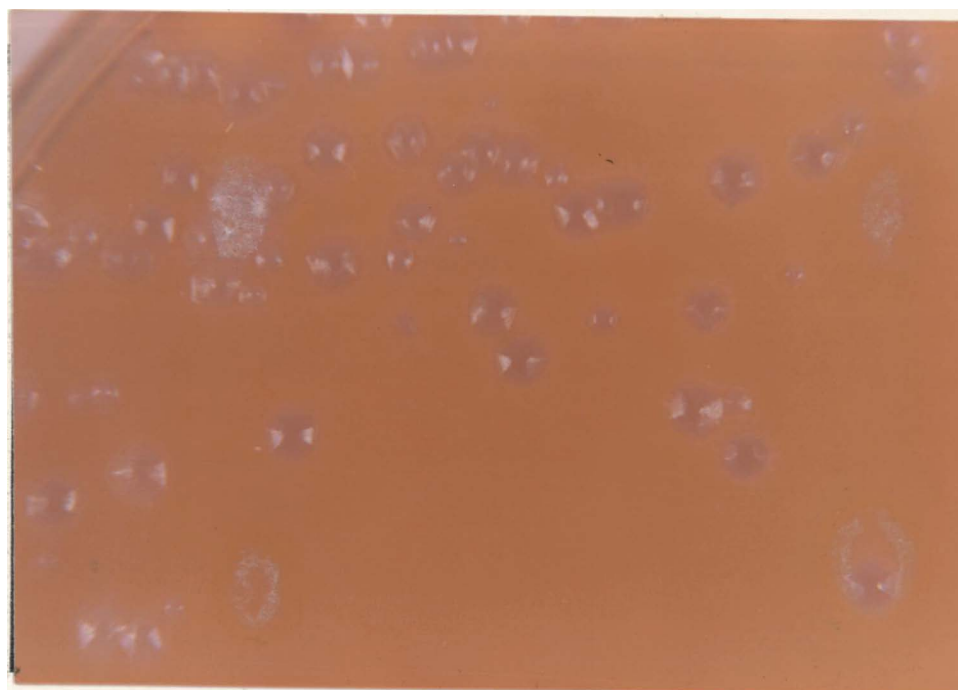


FIGURA 5. Características morfológicas das colônias de *C. botulinum* tipo B em meio de TPEG-gema de ovo.



FIGURA 6. Colônias de *C. botulinum* tipo E em Sacarose-gema de ovo.



FIGURA 7. Colônias de *C. botulinum* tipo E após a adição de lugol em meio de Sacarose-gema de ovo.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados da presente pesquisa, embora limitados e restritos a algumas espécies de pescado capturados principalmente no litoral do Estado de São Paulo, permitem algumas considerações de importância no estudo da ocorrência de *C. botulinum* em nosso meio.

Preliminarmente os resultados deixam patente que a ocorrência da bactéria parece ser bastante freqüente no ambiente marinho; os dados obtidos com algumas espécies de pescado, coletadas em locais e épocas diferentes, nas quais o *C. botulinum* foi isolado, confirmam esta afirmativa.

Fatores como os hábitos alimentares e habitat exercem uma marcada influência nos níveis de contaminação do pescado, sendo maiores nas espécies demersais, como a pescada-foguete e bagre-do-mar, e menores nas espécies pelágicas, como a sardinha-verdadeira. Em ostras e camarões foi observada uma grande ocorrência da bactéria, provavelmente devido às condições de habitat.

Um outro aspecto de importância é que os dados da presente pesquisa divergem frontalmente das observações de outros autores (HUSS & PEDERSEN, 1979), que afirmam ser o *C. botulinum* tipo E pouco freqüente em águas tropicais do litoral sul americano, com predominância do tipo C; embora este último pareça ocorrer em nosso ambiente aquático, os resultados positivaram a ampla predominância do tipo E em todas as espécies de pescado estudadas.

Sugere-se a utilização do meio de TPEG-gema de ovo para o isolamento da bactéria a partir de centrifugados da cultura em estudo, o que permite uma melhor visualização das colônias, as quais são mais facilmente isoladas devido principalmente ao fato de seus halos de precipitação serem bem menores, diminuindo a proporção de colônias confluentes.

Sugere-se, também, a utilização do teste de iodo aplicado às placas de Sacarose-gema de ovo para a detecção presuntiva de *C. botulinum* tipo E, principalmente quando se trabalha com amostras de origem marinha.

Finalmente, os resultados devem ser considerados também nos aspectos tecnológico e de saúde pública. A confirmação da bactéria em pescado e suas implicações como patógeno de extrema importância realçam a necessidade e a premência da utilização de técnicas de processamento industrial que possibilitem a sua destruição, ou que se assegure a inibição

de seu desenvolvimento mediante o emprego de métodos físicos e químicos de preservação.

## 6. LITERATURA CITADA

ABRAHANSSON, K., B. GULLMAR e N. MOLIN, 1966. The Effect of Temperatura on Toxin Formation and Toxin Stability of *Clostridium botulinum* type E in Different Environments. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 12: 385-393.

ABRAMS, A., G. KEGELES e G.A. HOTTLE, 1946. The Purification of Toxin from *Clostridium botulinum* type A. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, 164: 63-78.

AJMAL, M. e B.C. HOBBS, 1967. Incidence and Significance of Colonial Variation in *Clostridium botulinum* Type A. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium of Food Microbiology, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited. London, p.459-476.

BARROW, G.I., 1973. Marine Microorganism and Food Poisoning. IN: HOBBS, B.C. e J.H. CHRISTIAN. Ed. The Microbial Safety of Foods. London, Academic Press Inc., p.181 - 196.

- BOTT, T.L., J.S. DEFFNER e E.M. FOSTER, 1967. Occurrence of *Clostridium botulinum* type E in Fish from the Great Lakes, with special Reference for Certain Large Bays. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS. Ed. Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium of Food Microbiology, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited, London p.21-24.
- BOTT, T.L., J.S. DEFFNER, E.M. FOSTER e E.E. McCOY, 1964. Ecology of *Clostridium botulinum* in the Great Lakes. IN: LEWIS, K. e K.J. CASSEL, Ed., Botulism. Proceedings of a Symposium. Cincinnati, 1964. United States Department Of Health, Education and Welfare, p.221-235.
- BONVENTRE, P.F. e L.L. KEMPE, 1959. Physiology of Toxin Production by *Clostridium botulinum* types A and B. III. Effect of pH and Temperature During Incubation on Growth, Autolysis and Toxin Production. Applied Microbiology, Washington, 7: 374-377.
- BONVENTRE, P.F. e L.L. KEMPE, 1960. Physiology of Toxin Production by *Clostridium botulinum* Types A and B. I. Growth, Autolysis and Toxin Production. Journal of Bacteriology, Baltimore, 79: 18-23.
- BOROFF, D.A. e B.R. DAS GUPTA, 1971, Botulism Toxin. IN: KADIS, S., F.C. MONTIE e S.J. AJL, Ed., Microbial Toxins. New York. Academic Press, p.1-68.
- BURNS, G.F. e H. WILLIAMS, 1975. *Clostridium botulinum* in Scottish Fish Farm and Farmed Trout. Journal of Hygiene. London, 74: 1-6.
- CANN, D.C., L.Y. TAYLOR e G. HOBBS, 1975. The incidence of *Clostridium botulinum* in Farmed Trout Raised in Great Britain. Journal of Applied Bacteriology, London, 39: 331-336.



- CANN, D.C., B.B. WILSON, G. HOBBS e J.M. SHEWAN, 1967. *Clostridium botulinum* Type E in the Marine Environment of Great Britain. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium on Food Microbiology. Moscow, July, 1966, Chapman and Hall Limited, London, p.62-65.
- CARROLL, B.J., E. GARRETT, G.B. REESE e B.Q. WARD, 1966. Presence of *Clostridium botulinum* in the Gulf of Venezuela, and the Gulf of Darién. Applied Microbiology, Washington, 14: 837-838.
- CARDELLA, M.A., J.J. DUFF, L. GOTTFRIED e J.S. BEGEL, 1958. Studies on the Immunity to Toxin of *Clostridium botulinum*. IV. Production and Purification of Type C Toxin for Conversion to Toxoids. Journal of Bacteriology. Baltimore, 75: 360-365.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1963-a. Epidemic botulism related to Smoke Fish Ingestion. Morbidity and Mortality Report, Atlanta, 12: 329-330. Weekly
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1963-b. Botulism. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 12: 337-339.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1963-c. Botulism: Smoked Fish Product. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 12: 358.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1963-d. Botulism. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 12: 429-430.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1967. Type E botulism: Chicago, Illinois. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 16: 193.

CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1977. Annual Summary, 1976. Reported Morbidity and Mortality in United States, 1976. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 25: 2-7.

CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1978-a. Annual Summary, 1977. Reported Morbidity and Mortality in United States, 1977. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 26: 2-6.

CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1978-b. Botulism: California. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 27: 501-502.

CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1979-a. Annual Summary, 1978. Reported Morbidity and Mortality in United States, 1978. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 27: 3-6.

CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1979-b. Botulism. United States, 1978. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 28: 73-75.

CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1980. Annual Summary, 1979. Reported Morbidity and Mortality in United States, 1979. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 28: 10-17.

CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1981. Botulism, United States 1979-1980. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, 30: 121-122.

CHAPMAN, H.M. e H.B. NAYLOR, 1966. Isolation of *Clostridium botulinum* Type E from Cayuga Lake Fish. Applied Microbiology, Washington, 14: 301-302.

- CHRISTIANSEN, L.N., R.W. JOHNSTON, D.A. KAUTTER, J.W. HOWARD e J.W. AUNAN, 1973. Effect of Nitrate and Nitrite on Toxin Production by *Clostridium botulinum* and on Nitrosamine formation in Perishable canned comminuted cured meat. Applied Microbiology, Washington, 25: 357-362.
- CHRISTIANSEN, L.N., R.B. TOMPKIN, A.B. SHAPARIS, F.V. KUEDER, R.W. JOHNSTON, D.A. KAUTTER e Q.I. KOLARI, 1974. Effect of Sodium Nitrate on Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Bacon. Applied Microbiology, Washington, 27: 733-737.
- CRAIG, J.M. e K.S. PILCHER, 1967. The Natural Distribution of *Clostridium botulinum* Type E in the Pacific Coast Areas of the United States. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium of Food Microbiology, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited, London, p.56-61.
- CRAIG, J.M., S. HAYNES e K.S. PILCHER, 1968. Incidence of *Clostridium botulinum* Type E in Salmon and Other Marine Fish in the Pacific Northwest. Applied Microbiology, Washington, 16: 553-557.
- DOLMAN, C.F., 1964. Botulism as a World Problem. IN: LEWIS, R.H. e K.Jr. CASSELL, Ed., Botulism. Proceedings of a Symposium. Cincinnati, 1964. United States Department of Health, Education and Welfare, p.3-32.
- DOWELL, V.R.Jr, E.J. GANGAROSA e R.W. ARMSTRONG, 1968. Clinical and Epidemiological Aspects of Botulism in the United States. IN: HERZBERG, M. Ed., Toxic Micro-Organisms. Washington, United States Department of Interior, p. 360-364.

- DUFF, J.T., G.G. WRIGHT e A. YARINSKY, 1956. Activation of *Clostridium botulinum* Type E Toxin by Trypsin. Journal of Bacteriology, Baltimore, 72: 455-460.
- DUFF, J.T., G.G. WRIGHT, J. KLERER, D.E. MOORE e H. BIBLER, 1957. Studies on the Immunity to Toxin of *Clostridium botulinum*. I. A simplified procedure in Isolation of Type A Toxin. Journal of Bacteriology, Baltimore, 73: 42-47.
- EISENBERG, M.S. e T.R. BENDER, 1976. Plastic Bags and Botulism. A New Twist to and Old Harzard on the North. Alaska Medicine, Juneau, p.17-19.
- EKLUND, M.W. e F.T. PDYSKY, 1967. Incidence of *Clostridium botulinum* Type E from the Pacific Coast of United States. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of Fifty International Symposium on Food Microbiology Moscow, 1966. Chapman and Hall Limited, London, p.49-55.
- EKLUND, M.W. e F.T. PDYSKY, 1972. Activation of a Toxic Component of *Clostridium botulinum* type C and D by trypsin. Applied Microbiology, Washington, 24: 108-113.
- 'FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1964. Botulism Outbreak From Smokedd White Fish. Food Technology, Chicago, 18: 71-72, 74.
- FRAZIER, W.C., 1967. Food Microbiology. McGraw Hill Book Co., New York, 537p.
- GERWING, J., C.E. DDLMAN e D.A. ARNDTT, 1962. Activation Phenomenon of *Clostridium botulinum* Type E Toxin. Journal of Bacteriology, Baltimore, 84: 302-305.

- GERWING, J., C.E. DOLMAN, D.A. ARNOTT e A.KO, 1965. Mechanism of Tryptic Activation of *Clostridium botulinum* Type E. Journal of Bacteriology, Baltimore, 89: 1176-1179.
- GIMEZES, D.F. e A.S. CICCARELLI, 1967. A New Type of *Clostridium botulinum*. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium of Food Microbiology, Moscow, 1966. Chapman and Hall limited, London, p.455-458.
- GRAIKOSKY, J.T., E.W. BOWMAN, R.A. ROBDHM e R.A. KOCK, 1968. Distribution of *Clostridium botulinum* in the Ecosystem of the Great Lakes. IN: HERZBERG, M., Ed., Toxic Micro-Organisms. Washington, United States Department of Interior, p.271-279.
- GREENBERG, R.A., J.H. SILLIKER e L.D. FATTA, 1959. The influence of NaCl on Toxin Production and Organoleptic Breakdown in Perishable Cured Meat Inoculated With *Clostridium botulinum*. Food Technology, Chicago, 13: 509-511.
- HALBINGER, R.E., 1973. *Clostridium botulinum* in Fishery Products. IN: CHICHESTER, C.D. e H.D. GRAHAM, Ed. Microbial Safety of Fishery Products. Academic Press, New York, p. 191-202.
- HARRIGAN, W.F. e M.E. MacCANCE, 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, New York, 452p.
- HAUSCHILD, A.H.W., B.J. ARIS e R. HILSHEIMER, 1975. *Clostridium botulinum* in marinated Products. Canadian Institute of Food Science and Technology, Ottawa, 8: 84-87.

- HOBBS, G., K. WILLIAMS e A.T. WILLIS, 1971. Basic Methods for the Isolation of *Clostridium*. IN: SHAPTON, D.A. e D.R. BOARD. Ed., Isolation of Anaerobes, New York, Academic Press, p.1-22.
- HOLDERMAN, L.V. e W.E.C. MOORE, 1972. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnique Institute and State University Blanching, Virginia, 130p.
- HOUGHTBY, G.A. e C.A. KAYSNER, 1969. Incidence of *Clostridium botulinum* Type E in Alaskan Salmon. Applied Microbiology, Washington, 18: 950-951.
- HUSS, H.H. e A. PEDERSEN, 1979. *Clostridium botulinum* in Fish. Nordisk Veterinaermedicin, Copehagen, 31: 214-221.
- HUSS, H.H., A. PEDERSEN e D.C. CANN, 1974-a. The incidente of *Clostridium botulinum* in Danish Trout Farms. Food Technology, Chicago, 9: 445-450.
- HUSS, H.H., A. PEDERSEN e D.C. CANN, 1974-b. The incidence of *Clostridium botulinum* in Danish Trout Farms. II. Measures to Reduce Contamination of Fish. Food Technology, Chigado, 9: 451-458.
- INTERNATIONAL COMMISION ON MICROBIDLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1978. Micro-organisms in Foods. 1. Their Significance and Methods of Ennumeration, 2<sup>nd</sup> Ed., University of Toronto Press, Toronto, 434p.
- ITO, K.I., I.K. CHEN, P.A. LERKE, M.L., SEEGER e J.A. UNVERFERTH, 1976. Effect of Acid and Salt Concentration in Fresh-Pack Pickled on the Growth of *Clostridium botulinum* spores. Applied on Environmental Microbiology, Washington, 32: 121-124.

- JAY, J.M., 1970. Modern Food Microbiology. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 328p.
- JEFFMAN, T., 1960. Aspectos Bacteriológicos Relacionados com o Anaerônio Responsável pelo Surto de Botulismo em Porto Alegre, 1958. Revista da Escola de Agronomia e Veterinária, Porto Alegre, III: 37-43.
- JOHANSEN, A., 1963. *Clostridium botulinum* in Sweden and Adjacent Waters. Journal of Applied Bacteriology, London, 26: 43-47.
- KANZAWA, K., T. ONO, T. KARASHIMADA e H. IIDA, 1968. Distribution of *Clostridium botulinum* Type E in Hokkaido, Japan. IN: HERZBERG, M., Ed., Toxic Micro-Organisms, Washington, United States Department of Interior, p.229-303.
- KAUTTER, D.A. e R.K.Jr. LYNT, 1976. *Clostridium botulinum*. IN: SPECK, M.L., Ed., Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, p.424-436.
- KAUTTER, D.A., R.K.Jr. LYNT, H.M. SOLDMON e T.Jr. LILLY, 1968. The Detection, Identification and Isolation of *Clostridium botulinum*. IN: HERZBERG, M., Ed., Toxic Micro - Organism, Washington, United States Department of Interior, p.236-246.
- KAWABATA, T. e G. SAKAGUCHI, 1963. The problem of Type E Botulism on Japan. IN: SLANETZ, L.N., C.O. CHICHESTER, A.R. GAUFIN e Z.J. DRDAL, Ed., Microbial Quality of Foods. Academic Press, New York, p.71-76.

- KRAVCHENKO, A.T. e L.M. SHISHULINA, 1967. Distribution of *Clostridium botulinum* in soil and waters of the USSR. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifth International Symposium of Food Microbiology, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited, London, p.13-15.
- LAYCOCK, R.A. e D.H. LORING, 1972. Distribution of *Clostridium botulinum* Type E in Gulf of St. Lawrence in Relation to the Physical Environment. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 18: 763-773.
- LECHOWICH, K.V., 1968. The Effect of Chemicals Upon the Growth of *Clostridium botulinum*. IN: HERZBERG, M. Ed., Toxic Micro-Organisms Washington, United States Department of Interior, p.468-478.
- LECHOWICH, R.V., W.L. BROWN, R.H. DEIBEL e I.J. SOMMERS, 1978. The role of Nitrite in the Production of Canned Cured Meat Products. Food Technology, Chicago, 32: 45-48.
- LEGROUX, R., J.C. LEVADITI e C. JÉRAMEC, 1947. Le Botulisme en France Pendant L'Ocupation. La Presse Medicale, Paris, 55: 107-110.
- LYNT, R.K., D.A. KAUTTER e R.B.Jr. READ, 1975. Botulism in Commercially Canned Foods. Journal of Milk and Food Technology, Ames, 38: 546-550.
- MATVEEV, E.I., N.P. NEFEDTEVA, T.I., BULATOVA e I.S. SOKOLOV, 1967. Epidimiology of Botulism in USSR. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium of Food Microbiology, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited, London, p.1-10.



- MORTOJUDD, J.W., E.G. SIAGIN, F. SUHADI e B.Q. WARD, 1973. The presence of *Clostridium botulinum* in Indonesian Waters. Journal of Applied Bacteriology, London, 36: 437-440.
- NICKERSON, J.T.R., S.A. GOLBLITH, D. DIGIONA e W.W. BISHOP, 1967. The Prevalence of *Clostridium botulinum* Type E in Fish and Mud Taken From the Gulf of Maine. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed. Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium on Food Microbiology, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited, London. p.25-33.
- ODLAUG, T.E. e I.J. PFLUG, 1978. *Clostridium botulinum* in Acid Foods. Journal of Food Protection, Ames, 41: 566-573.
- DHYE, D.F. e J.H.B. CHRISTIAN, 1967. Combined Effect of the Temperature, pH and Water Acitivity on Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* Types A, B and E. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium of Food Microbiology, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited, London, p.217-223.
- DHYE, D.F., J.H.B. CHRISTIAN e W.J. SCOTT, 1967. Influence of Temperature in the Water Relation of Growth of *Clostridium botulinum* Type E. IN: INGRAM, M. e T.A. ROBERTS, Ed., Botulism, 1966. Proceedings of the Fifty International Symposium on Food Microbiologu, Moscow, July, 1966. Chapman and Hall Limited, London, p.136-143.
- PRESNELL, M.W., J.J. MIESCIER e W.F.Jr. HILL, 1967. *Clostridium botulinum* in Marine Sediments and in the Oyster (*Crassostrea virginica*) From the Mobile Bay. Applied Microbiology, Washington, 15: 668-669.

- PRÉVOT, A.R., 1966. Manual for the Classification and Determination of the Anaerobic Bacteria. Traduzido por FREDETTE, V., 1<sup>st</sup> Ed., Philadelphia. Lea & Febiger, Philadelphia, 402p.
- READ, R.B.Jr., D.A. KAUTTER, R.K. LYNT e J.G. BRADSHAW, 1974. The Botulism Harzard in Canned Mushrooms. U.S. Experiences Proceedings of the IV International Congress of Food Science and Technology, Madrid, III: p.66-70.
- RIEMANN, H., 1969. Botulism Types A, B and F. IN: RIEMANN, H., Ed., Food-Borne Infection and Intoxication. New York, Academic Press, p.291-327.
- RIEMANN, H., 1973. Botulism Food Poisoning. Canadian Institute of Food Science and Technology, Ottawa, 6: 11-125.
- ROBERTS, T.A. e G. HOBBS, 1968. Low Temperature Growth Characteristics of Clostridia. Journal of Applied Bacteriology, London, 31: 75-88.
- ROBERTS, T.A., B. JARVIS e A.C. RHODES, 1976. Inhibition of *Clostridium botulinum* by Curing Salts in Pasteurized Pork Slurry. Food Technology, Chicago, 11: 25-40.
- ROGERS, D.E., M.G. KOENING e A. SPICKARD, 1964. Clinical and Laboratory Manifestation of Type E Botulism in Man. IN: Botulism. Proceedings of a Symposium, Cincinnati, 1964. United States Department of Health, Education and Welfare, p.133-146.
- SAKAGUCHI, G., 1979. Botulism. IN: RIEMANN, H. Ed. Food-Borne Infection and Intoxication, 2<sup>nd</sup> Ed., New York, Academic Press, p.389-442.

- SMITH, L.O., 1979. Botulism, The Organic, its Toxin, the Disease. Charles C. Thomas Publishers, Illinois, 236p.
- SMITH, G.R. e C.J. MORRYSON, 1977. The Low Prevalence of *Clostridium botulinum* in the Lakes, Marshes and Waters-Ways of Camargue. Journal of Hygiene, London, 78: 33-38.
- SMITH, L.O. e G. HOBBS, 1974. *Clostridium*. IN: BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBON, Ed., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed., Baltimore. The Williams & Wilkins Company, p.551-572.
- SMITH, G.R., R.A. MILLIGAN e C.J. MORRISON, 1978. *Clostridium botulinum* in Aquatic Environment in Great Briatin and Ireland. Journal of Hygiene, London, 80: 431-438.
- SOFDS, J.N., F.I. BUSTA e C.E. ALLEN, 1979. Botulism Control by Nitrite and Sorbate in Cured Meat. A Review. Journal of Food Protection, Ames, 42: 739-770.
- STIEBERS, A., 1967. A Comparative Study of *Clostridium botulinum* Strains Using a Differential Egg Yolk Media. Corvallis, Oregon State University, M.S. Thesis 62p.
- SUTTON, G.A., 1973. Food Poisoning and *Salmonella* Infection in Austrália. IN: HOBBS, B.C. e J.H.B. CHRISTIAN, Ed., The Microbial Safety of Foods. London, Academic Press, London, p.153-164.
- SUGYIAMA, H., T.L. BOTT e E.M. FOSTER, 1968. *Clostridium botulinum* Type E in an Island Bay (Green Bay of Lake Michigan). IN: HERZBERG, M., Ed., Toxic Micro-Organisms. Washington, United States Department of Interior, p.287-291.

- TOOD, E.C.B., 1978. Food Borne Disease in Six Countries. A Comparison. Journal of Food Protection, Ames, 41: 559-665.
- TOMPKIN, R.B. e L.N. CHRISTIANSEN, 1976. *Clostridium botulinum*. IN: DE FIGUEIREDO, M.P. e D.F. SPLITTSTOESSER, Ed., Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects. Westport. The Avi Publishing Co., Westport, Connecticut, p.156 -169.
- TOWNSEND, C.T., L.YEE e W.A. MERCER, 1954. Inhibition of the Growth of *Clostridium botulinum* by Acidification. Food Research, Champagn, 19: 536-542.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, 1978. Bacteriological Analytical Manual for Foods. Food and Drug Administration, U.S.D.H.E.W., 5<sup>th</sup> Ed., XIV: 1-16.
- WARD, B.Q. e B.J. CARROLL, 1965. Presence of *Clostridium botulinum* Type E in Estuarine Waters of the Gulf of Mexico. Applied Microbiology, Washington, 13: 502.
- WARD, B.Q., B.J. CARROLL, E.S. GARRETT e C.R. REESE, 1967-a. Survey of the Atlantic Coast and Estuaries From Key Largo to Staten Island for the Presence of *Clostridium botulinum*. Applied Microbiology, Washington, 15: 964-965.
- WARD, B.Q., B.J. CARROLL, E.S. GARRETT e C.B. REESE, 1967-b. Survey of the US Gulf Coast for the Presence of *Clostridium botulinum*. Journal of Applied Microbiology, Washington, 15: 629-636.
- WARD, B.Q., E.S. GARRETT e C.B. REESE, 1967-c. Further Indication of *Clostridium botulinum* in Latin America Waters. Journal of Applied Microbiology, Washington, 15: 1509.

WIRAHADIKUMAH, 1968. Preventing *Clostridium botulinum* Type E Poisoning and Fat Rancidity Silage Fermentation. Annals of the Agricultural College of Sweden, Uppsala, 34:551-689.

ZOTTOLA, E.A., 1972. Botulism. Agricultural Extension Service of the University of Minnesota, Minneapolis. Extension Bulletin, 32, 21p.