UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras (*Crassostrea brasiliana*) cruas cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo

Paulo de Souza Costa Sobrinho

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Costa Sobrinho, Paulo de Souza
C838a Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus,* associado ao consumo de ostras (*Crassostrea brasiliana*) cruas cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo / Paulo de Souza Costa Sobrinho. -- São Paulo, 2007.
133p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador: Landgraf, Mariza

1. Microbiologia de alimentos 2. Ostra : Ciências dos alimentos I. T. II. Landgraf, Mariza, orientador.

664.07 CDD

Paulo de Souza Costa Sobrinho

Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras (*Crassostrea brasiliana*) cruas cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Assoc. Mariza Landgraf
Orientadora/Presidente

José Benício Paes Chaves
Departamento de Tecnologia de Alimentos (UFV)
1º. examinador

Edson Zangiacomi Martinez
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP)
2º. examinador

Ivone Delazari
3º. examinador

Bernadette D. G. M. Franco
Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP)
4º. examinador

São Paulo, 03 de agosto de 2007

Paulo de Souza Costa Sobrinho

Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras (*Crassostrea brasiliana*) cruas cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo

Tese apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo
2007

DEDICATÓRIA

A Eva (Evanita), minha irmã, com amor e gratidão por seu estímulo, carinho, presença e apoio no período mais difícil de minha vida, que não foi o doutorado. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque não sou dono do mundo, mas com certeza sou filho do dono.

À Profa. Mariza Landgraf, por me aturar durante o desenvolvimento dessa pesquisa, pelo aprendizado, apoio, pelas discussões e confiança. Obrigado, "Chefe".

À Profa. Bernadette Franco, e à Profa. Maria Teresa Destro, pelo incentivo, aprendizado, apoio e sugestões nos momentos de dúvidas.

À Kátia e à Lúcia, funcionárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo apoio e carinho com que me receberam e pelo prazeroso convívio ao longo desses anos.

Às amigas Alcina, Ana, Cecília, Daniela Horota, Cristina, Eb, Gabriela, Janine, Lina, Marildes, Monika, Tatiana, Vanessa Tsuhako, Vanessa Bíscola, e aos amigos Ricardo Sakate, Hans, Cristiano, Vinícius, Gunnar, pelo prazeroso convívio, graças a vocês o desenvolvimento desse trabalho ficou mais leve.

À Renata R. Diório, minha namorada, pelo carinho, amor e compreensão.

À Ediná, minha irmã, pelo amor, estímulo e exemplo ao longo dessa caminhada.

Finalmente, mas não menos importante, à minha família paulistana: Dário, Noemia, Soraia, Emerson e Valdo pelo carinho, apoio e acolhimento ao longo desses anos.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (03/08306-0) e do auxílio à pesquisa (04/03181-7).

À Letícia Furusawa, funcionária do Instituto Oceanográfico (IO), pelo carinho e suporte no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Sr. Gilberto, funcionário do IO, pela ajuda com as análises da salinidade da água.

Ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, pelas informações, disponibilidade e suporte durante o desenvolvimento desse trabalho.

A John Bowers (*FDA*) pela disponibilidade e pelos esclarecimentos na etapa de modelagem estatística.

A Todos vocês, um forte abraço e meu muito obrigado!

"Uncertainty is an integral part of our life"

Vose Consulting

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE TABELAS xii

RESUMO xiv

ABSTRACT xvi

1. Introdução 1
   1.1. Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus,* associado ao consumo de ostra crua. 7
      1.1.1. Identificação do perigo 7
      1.1.2. Caracterização do perigo representado por *V. parahaemolyticus* associado ao consumo de ostras cruas 20
   1.2. Processo de produção de ostra na região Cananéia, São Paulo 22

2. Objetivos 25

3. Material e Métodos 26
   3.1. Ostras 26
   3.2. Coleta das amostras de ostras nos diversos pontos da cadeia produtiva 26
      3.2.1. Coleta de amostras de ostras nos locais de cultivo 26
      3.2.2. Coleta de amostras de ostras na indústria para avaliação do processo de depuração 27
      3.2.3. Coleta de amostras de ostras nos locais de consumo 27
   3.3. Procedimentos de coleta de amostras de ostras ao longo da cadeia produtiva 27
      3.3.1. Procedimento de coleta de amostras de ostras nos locais de cultivo 28
      3.3.2. Procedimento de coleta de amostras de ostras na indústria para avaliação do processo de depuração 28
      3.3.3. Procedimento de coleta de amostras de ostras nos locais de consumo 29
   3.4. Preparo das amostras de ostras para enumeração da população de *Vibrio parahaemolyticus*. 29
   3.5. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* das amostras de ostras coletadas (Elliot et al., 1998; Kaysner e DePaola, 2004). 29
      3.5.1. Nas amostras coletadas nos locais de cultivo 29
      3.5.2. Nas amostras coletadas na indústria para avaliação do processo de depuração 30

3.5.3. Nas amostras coletadas nos locais de consumo 30
3.5.3.1.1. Isolamento do DNA de Vp 31
3.5.3.1.2. Reação de polimerização em cadeia (PCR) para identificação de Vp e detecção de genes que codificam para os fatores de virulência 31
3.6. Estudo dos fatores de virulência em *V. parahaemolyticus.* 32
3.6.1. Isolados obtidos das amostras de ostras coletadas nos locais de cultivo 32
3.6.2. Isolados obtidos das amostras de ostras coletadas nos locais de consumo 33
3.7. Temperatura da água do mar e do ar no município de Cananéia 33
3.8. Condições e tempo de coleta e transporte e armazenamento nos locais de consumo 33
3.9. Análise Estatística 34
4. Resultados 37
4.1. Avaliação da exposição humana a *V. parahaemolyticus* associado ao consumo de ostras cruas 37
4.1.1. Resultados da avaliação da exposição na etapa de cultivo 39
4.1.1.1. Distribuição da temperatura da água 41
4.1.1.2. Relação entre a população de *V. parahaemolyticus* em ostras e a temperatura e a salinidade da água do mar 46
4.1.1.3. Estimativa da distribuição da porcentagem da população de *V. parahaemolyticus* patogênico 49
4.1.1.4. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras no momento nos locais de cultivo 51
4.1.2. Resultados da avaliação da exposição na etapa pós-coleta 56
4.1.3. Resultados da avaliação da exposição na etapa de consumo 75
4.2. Caracterização do risco de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas 78
4.2.1. Dose-resposta 78
4.2.2. Probabilidade de doença, causada por *V. parahaemolyticus,* associada ao consumo de uma porção de ostras cruas 80
4.2.3. Número de casos de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, por ano associado ao consumo de ostras cruas 84
4.2.4. Análise de sensibilidade da probabilidade de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, associada ao consumo de ostras cruas 85
Apêndice A 108
Apêndice B 115
Apêndice C 116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de uma análise de risco (FAO/WHO, 1999)..... 3

Figura 2. Exemplo de estrutura de avaliação de risco microbiológico como ferramenta para garantir a inocuidade de alimentos (modificado de Wachsmuth et al., 2003). 6

Figura 3. Viveiro de engorda de ostras na região de Cananéia, São Paulo..... 23

Figura 4. Fluxograma de produção de ostras na região de Cananéia, São Paulo..... 24

Figura 5. Locais de coleta de amostras de ostras na região estuarino-lagunar de Cananéia (25ºS; 48ºW), São Paulo..... 27

Figura 6. Modelo conceitual para a avaliação da exposição humana a *Vibrio parahaemolyticus* em ostras, do cultivo ao consumo (modificado de United States, 2005b). 39

Figura 7. Distribuição mensal da temperatura média diária da água nos anos de 2002 a 2004, no município de Cananéia, SP. A barra de erro expressa um desvio padrão. 42

Figura 8. Distribuição sazonal da temperatura média diária da água no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004..... 43

Figura 9. Distribuição da temperatura média diária e do respectivo desvio padrão da água do mar, entre os anos de 2001 e 2004, com um total de 1255 dias..... 44

Figura 10. Variação da média e do desvio padrão da distribuição de temperatura média diária nas estações do ano para os anos de 2001 a 2004, no município de Cananéia, SP. 45

Figura 11. Distribuição da população de *V. parahaemolyticus* em ostras em função da salinidade da água do mar. 47

Figura 12. Ajuste do modelo de regressão da população de *V. parahaemolyticus* em ostras em função da temperatura da água do mar..... 48

Figura 13. Distribuição da porcentagem de isolados patogênicos de *V. parahaemolyticus*. 51

Figura 14. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante o inverno..... 53

Figura 15. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante a primavera. 54

Figura 16. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante o verão. 54

Figura 17. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante o outono. 55

Figura 18. Freqüência da população de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura da água no momento da coleta. 56

Figura 19. Distribuição de probabilidade para o tempo de coleta de ostras. 58

Figura 20. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004, no verão. 61

Figura 21. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004, no outono. 61

Figura 22. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004, na primavera. 62

Figura 23. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP entre os anos de 2001 e 2004, no inverno. 62

Figura 24. Distribuição da redução da população de *V. parahaemolyticus* em ostras obtida com os processos de depuração. 65

Figura 25. Distribuição da temperatura média diária do transporte de ostras até o comércio. A barra em cada ponto representa um desvio padrão, acima e abaixo, da temperatura média diária. 66

Figura 26. Comparativo da distribuição de temperatura durante o transporte das ostras até o varejo entre as empresas pesquisadas. 67

Figura 27. Rótulo da embalagem de comercialização de ostras de uma das empresas. 69

Figura 28. População de *V. parahaemolyticus* total observada no varejo comparado com a estimada pelo modelo, obtida com 1 simulação de 10.000 iterações. A barra de erro indica um desvio padrão abaixo e acima da média. 72

Figura 29. População de *V. parahaemolyticus* total observada no varejo comparado com a estimada pelo modelo, obtida com 500 simulações de 5000 iterações. A barra de erro indica um desvio padrão abaixo e acima da média. 73

Figura 30. População de *V. parahaemolyticus* patogênico observada no varejo comparado com a estimada pelo modelo, obtida com 500 simulações de 5000 iterações. A barra de erro indica um desvio padrão abaixo e acima da média. A média experimental foi estimada como o limite de detecção do método 0,48 $\log_{10}$(NMP/g). 74

Figura 31. Distribuição do peso (g) por ostra consumida obtida de amostras coletadas no comércio. 76

Figura 32. Distribuição do peso (g) por porção de ostra consumida obtida por simulação de Monte Carlo com 5000 iterações. 76

Figura 33. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida no inverno. 86

Figura 34. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida no outono. 87

Figura 35. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida na primavera. 87

Figura 36. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida no verão. 88

Figura 37. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida no inverno. 89

Figura 38. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida no outono. 89

Figura 39. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida na primavera. 90

Figura 40. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida no verão. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conjuntos de “primers” utilizados na identificação e determinação de fatores de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* de acordo com Kaysner e DePaola (2001; 2004)..... 32

Tabela 2. População de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras em pontos da cadeia produtiva das ostras produzidas em Cananéia, SP..... 38

Tabela 3. Distribuição sazonal da temperatura média diária da água do mar no município de Cananéia, São Paulo, entre os anos de 2001 e 2004..... 46

Tabela 4. Estimativa dos coeficientes do modelo* de regressão linear de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura da água do mar (Tágua)..... 47

Tabela 5. Matriz de variância-covariância estimada para os coeficientes do modelo de regressão linear de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura da água do mar..... 49

Tabela 6. População sazonal de *V. parahaemolyticus* em 123 amostras de ostras analisadas na etapa de cultivo, coletadas em Cananéia, SP..... 52

Tabela 7. Estimativa da população sazonal de *V. parahaemolyticus*, total de isolados e isolados patogênicos, em ostras *(Crassostrea brasiliana)* na etapa de cultivo, obtidas por simulação de Monte Carlo, com 5000 iterações..... 53

Tabela 8. Distribuição sazonal da diferença entre a temperatura média diária do ar e a temperatura média da água do mar, no município de Cananéia, SP, de 2001 a 2004..... 60

Tabela 9. Estimativa da distribuição da redução na população de Vp em ostras, obtida pelos diferentes processos de depuração..... 64

Tabela 10. Estimativa da distribuição de incerteza da população de Vp total e patogênico em ostras no momento do consumo em $\log_{10}$(NMP/g), obtidas com 500 simulações* pelo método de simulação de Monte Carlo..... 71

Tabela 11. População sazonal de Vp total e patogênico em 74 amostras de ostras analisadas na etapa consumo..... 71

Tabela 12. Estimativa da população (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* total e patogênico, por porção de ostras, servida no momento do consumo, considerando a população máxima de 7 $\log_{10}$(NMP/g)..... 77

Tabela 13. Estimativa da população (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* total e patogênico, por porção de ostras, servida no momento do consumo, considerando a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g)..... 77

Tabela 14. Quantidade* anual de ostras comercializadas pela empresas pesquisadas..... 78

Tabela 15. Estimativa média do risco por porção servida associado com o consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 7 $\log_{10}$(NMP/g)..... 80

Tabela 16. Estimativa média do risco por porção servida associado com o consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g). .. 81

Tabela 17. Camparativo do risco de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas obtido por esse trabalho e o obtido pelo FDA para a região da Costa do Golfo (United States, 2005b). 83

Tabela 18. Estimativa anual do número de casos de doença associado ao consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 7 $\log_{10}$(NMP/g). 84

Tabela 19. Estimativa anual do número de casos de doença associado ao consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g). .. 85

Tabela 20. Descrição do modelo desenvolvido em planilha do Microsoft Excel (apresentada a seguir) para avaliação do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas na primavera, os procedimentos nas demais estações do ano são semelhantes. 108

RESUMO

Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras (*Crassostrea brasiliana*) cruas cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo.

Vibrio parahaemolyticus (Vp) é uma bactéria naturalmente presente em regiões estuarinas, sendo a principal causa de gastrenterite de origem bacteriana associada a pescados, principalmente ostras cruas. Nesta pesquisa, foi desenvolvida uma avaliação quantitativa de risco para avaliar a probabilidade de Vp causar doença após o consumo de ostra crua, produzida e comercializada no Estado de São Paulo. O estudo incluiu a identificação e caracterização do perigo, a avaliação da exposição e a caracterização do risco. Um modelo matemático foi desenvolvido. Este modelo leva em consideração o comportamento de Vp em ostras na cadeia produtiva, em cada estação do ano, além da relação entre a dose de Vp ingerida e a probabilidade de desenvolver a doença. A avaliação da exposição foi desenvolvida em três etapas: cultivo, pós-coleta e consumo. Na etapa de cultivo foram considerados os fatores que influenciam a prevalência e o número de Vp em ostras no momento da coleta. Na etapa pós-coleta, foram descritas as práticas da indústria e foram considerados os fatores associados ao processamento, transporte e manipulação. Já na etapa de consumo foram considerados os fatores como a quantidade de ostras consumidas por porção, o peso médio por ostra consumida e a população de Vp patogênico no momento do consumo. O resultado do modelo quantitativo da avaliação da exposição foi, então, integrado ao modelo dose-resposta, Beta-Poisson, para se obter uma estimativa do risco. Esta estimativa expressa o impacto da exposição humana a Vp, sobre a saúde pública, associada ao consumo de ostras. A simulação de Monte Carlo foi utilizada para avaliar o efeito da variabilidade e incerteza das variáveis do modelo sobre a estimativa do risco. O modelo prediz uma probabilidade de ocorrência de doença de $4{,}6 \times 10^{-4}$, por porção de ostra, consumida ao longo do ano. As variáveis que possuem maior influência sobre o risco de ocorrência de doença são a população de Vp em ostras no cultivo, a temperatura de transporte das ostras até o varejo e a porcentagem de Vp patogênico em ostra, no momento do seu consumo. O modelo evidencia que uma das maneiras de reduzir o risco de ocorrência de doença seria intervir nas condições de transporte de ostras até o varejo por meio da sua refrigeração. Com o modelo é possível identificar fatores e

simular cenários para avaliar o comportamento de *V. parahaemolyticus* como um perigo microbiológico, ao longo da cadeia produtiva de ostra até o momento do seu consumo. Também é possível avaliar o impacto de medidas de intervenção na cadeia produtiva. As suposições adotadas limitam a aplicabilidade do modelo. Portanto, é necessário que o modelo seja validado, particularmente com relação ao número de casos de doença causados por Vp, cujos dados de vigilância epidemiológica inexistem no Brasil.

Palavras-chave: Avaliação de risco microbiológico, *Vibrio parahaemolyticus*, ostras.

ABSTRACT

Quantitative risk assessment of illness, caused by *Vibrio parahaemolyticus*, associated with the consumption of raw oysters (*Crassostrea brasiliana*) farmed and commercialized in the State of São Paulo.

Vibrio parahaemolyticus (Vp) is naturally present in estuarine regions and is the main cause of gastroenteritis associated with the consumption of bivalve molluscan shellfish, specially raw oysters. In this research, a quantitative risk assessment was developed to evaluate the probability of Vp causing disease after consumption of raw oyster, produced and commercialized in the state of Sao Paulo. The study included the identification and characterization of the hazard, exposure assessment and risk characterization. A mathematical model was developed. This model takes into account the behavior of Vp in oysters in the productive chain, for each season of the year, besides the relationship between the number of cells of Vp ingested and the probability of developing the disease. The exposure assessment was done in three steps: farming, after harvesting and consumption. At the farming step, the factors that influence the prevalence and the population of Vp at the time of harvesting were considered. At the after harvesting step, the factors associated with transportation, handling and processing were considered. At the consumption step, factors related to the amount of oysters and the average weight per oyster consumed and the density of pathogenic Vp at the time of consumption were considered. Then, the quantitative model of exposure assessment was integrated to the dose-response model, Beta-Poisson, in order to obtain a risk estimate. This calculation expresses the impact of the human exposure to Vp associated with the consumption of oysters on public health. The Monte Carlo simulation was used to evaluate the effect of variability and uncertainty of variables of the model in the risk estimation. The model predicts a probability of occurrence of the disease of $4{,}6 \times 10^{-4}$ per serving of oyster consumed during one year. The variables showing the greatest influence on the risk of occurrence of disease are the density of Vp in oyster in the farming step, the temperature during transportation of oysters to the retail market and the percentage of pathogenic Vp strains in oysters, at the moment of consumption. The model indicates that the use of refrigeration during transportation of oysters to retail could

reduce the risk of disease. The model allows the identification of factors and the simulation of scenarios in order to evaluate the behavior of *V. parahaemolyticus,* as a microbiological hazard, in the productive chain of oyster to the consumption. It is also possible to evaluate the impact of intervention measures in the productive chain. The assumptions limit the application of the model. Therefore, it is necessary to validate the model, particularly in relation to the number of cases of disease caused by *V. parahaemolyticus* of which the data on epidemiologic surveillance do not exist in Brazil.

Key words: Microbiological risk assessment, *Vibrio parahaemolyticus*, oysters.

1. Introdução

Inocuidade de alimentos é uma questão de saúde pública essencial em todos os países. Enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) são comuns e representam uma séria ameaça à saúde humana, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002a), aproximadamente, dois milhões de pessoas vão a óbito devido a doenças diarréicas, enquanto centenas de milhões sofrem de episódios freqüentes de diarréia e suas conseqüências debilitantes, com a grande maioria sendo causada por microrganismos veiculados por alimentos ou água. Diarréia é o sintoma mais comum das doenças transmitidas por alimentos, mas existem outras conseqüências sérias como deficiência renal, desordens neurológicas (WHO, 2002a).

A contaminação de alimentos gera um enorme prejuízo social e econômico. O ressurgimento da cólera no Peru, em 1991, resultou em perdas de 500 milhões de dólares, por ano, na exportação de pescado (WHO, 2002a). Nos Estados Unidos, estima-se que alimentos contaminados causem 76 milhões de casos de doença, 325 mil hospitalizações e 5.200 mortes por ano (DeWall, 2003). Somente a salmonelose, uma de várias infecções de origem alimentar, tem os custos médicos e de perda de produtividade estimados em mais de 1 bilhão de dólares por ano (United States, 2005). Na Austrália, calcula-se um custo anual de 2,6 milhões de dólares devido a enfermidades transmitidas por alimentos (WHO, 2002a) e estima-se que ocorram, a cada ano, 5,4 milhões de casos de gastrenterites de origem alimentar (Flint et al., 2005).

Dados disponíveis indicam que a freqüência de enfermidades transmitidas por alimentos aumentou em todo o mundo nos últimos 20 anos. Na década de 90, microrganismos patogênicos denominados emergentes ou re-emergentes (por exemplo: *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*) ocasionaram novos problemas (Tauxe, 1997). De acordo com Mead et al. (1999), cerca de 30% da população em países industrializados podem ser afetados por enfermidades transmitidas por alimentos a cada ano e é provável que os problemas sejam ainda mais sérios em países em desenvolvimento.

As mudanças epidemiológicas das enfermidades transmitidas por alimentos são resultados de interações complexas e variações entre microrganismos patogênicos, composição do alimento, distribuição e consumo de alimentos, e imunidade da população (Altekruse et al., 1997; Smith e Fratamico, 1995; WHO, 2002b). Aspectos do processamento do alimento e do sistema de distribuição podem ampliar ou atenuar um perigo potencial à saúde. Embora um entendimento completo sobre a contaminação, infecção e sobrevivência de um microrganismo patogênico nos alimentos seja difícil, uma abordagem sistemática que possibilite medir as consequências da exposição humana ao patógeno pode melhorar a qualidade das decisões a serem tomadas na área da saúde pública (Rodricks, 1994).

Até pouco tempo, os critérios para julgar a inocuidade de um alimento eram considerados subjetivos, o que não satisfazia o comércio internacional de alimentos. Assim, profissionais da área começaram a buscar métodos mais objetivos para avaliar o risco representado por um alimento importado. Essa necessidade ficou bem clara nos acordos internacionais resultantes da rodada Uruguaia do Acordo Geral de Tarifas e Comércio (GAAT) (ICMSF, 1998). O acordo da Organização Mundial do Comércio sobre medidas sanitárias e fito-sanitárias estabelece que a inocuidade de alimentos deve ser baseada em conhecimentos científicos por parte dos países importadores e exportadores.

Para aumentar e garantir a inocuidade de um alimento foi desenvolvido o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). Atualmente, não existe indústria exportadora de alimentos que não tenha implementado em suas plantas processadoras esse sistema. Porém, ele não permite que se meça diretamente a sua eficácia em termos de prevenção de doenças, tendo como conseqüências, a limitação no estabelecimento de limites críticos e a dificuldade para estabelecer se diferentes sistemas HACCP podem ser comparados em termos da equivalência da proteção do consumidor (Buchanan e Whiting, 1998; ICMSF, 1998). Os avanços recentes nos conceitos de avaliação de risco microbiológico têm intensificado sua utilização no gerenciamento da inocuidade alimentar através do sistema HACCP, particularmente para superar as limitações descritas acima.

Desse modo, quer seja por motivos econômicos e políticos ou por questões de saúde pública, a Comissão do *Codex Alimentarius* considera o uso de técnicas quantitativas de análise de risco para determinar a inocuidade microbiológica de alimentos uma área de trabalho prioritária (FAO/WHO, 1995).

A avaliação de risco é um dos três componentes que interagem no processo de análise de risco que tem por objetivo garantir a proteção da saúde pública. Os outros dois componentes são a gestão de risco e a comunicação do risco (FAO/WHO, 1999) (Figura 1).

Figura 1. Componentes de uma análise de risco (FAO/WHO, 1999).

De acordo com Lammerding e Fazil (2000), a avaliação de risco é um processo que fornece uma estimativa da probabilidade de ocorrência e do impacto de efeitos adversos à saúde, atribuíveis a alimentos potencialmente contaminados por microrganismos patogênicos ou suas toxinas.

A Avaliação de Risco Microbiológico (MRA - *Microbiological Risk Assessment*) tem potencial para tornar-se uma poderosa ferramenta de saúde pública para melhorar a inocuidade de alimentos por possibilitar aos gestores de risco a identificação de estratégias mais eficientes para controlar perigos e prevenir enfermidades transmitidas por alimentos (Wachsmuth et al., 2003). Permite, também, a avaliação da eficiência de intervenções para prevenir ou reduzir enfermidades de origem alimentar, a ponderação de políticas alternativas, a seleção e a implementação de ações apropriadas para garantir a proteção da saúde da população. A avaliação de risco microbiológico também pode ser utilizada para a identificação de dados necessários para compreender os riscos de microrganismos patogênicos veiculados por alimentos e, desta forma, ajudar a determinar pontos prioritários para a pesquisa na área de inocuidade de alimentos. Pode, ainda, de acordo com Buchanan e Whiting, (1998), Lammerding et al. (2001) e Wachsmuth et

al., (2003), fortalecer os esforços da indústria para desenvolver planos de análise de perigos e pontos críticos de controle (HACCP) mais efetivos.

Segundo o *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 1999), a avaliação de risco para perigos microbiológicos é definida como um processo de avaliação baseado em dados científicos relativos aos efeitos potencialmente adversos à saúde que resulta da exposição humana a perigos de origem alimentar. Esta avaliação deve considerar a dinâmica de multiplicação, sobrevivência e morte microbiana nos alimentos. O processo consiste das seguintes etapas: (i) identificação do perigo; (ii) caracterização do perigo; (iii) avaliação da exposição ao perigo; e (iv) caracterização do risco.

O componente "identificação do perigo" de uma avaliação de risco microbiológico consiste na identificação do microrganismo patogênico que pode estar presente em um alimento ou grupo de alimentos e que é capaz de causar efeitos adversos à saúde do consumidor. As informações relevantes podem ser obtidas a partir de estudos clínicos, epidemiológicos e de vigilância, estudos com animais de laboratório, investigações das características do microrganismo e de suas interações com o meio ambiente na cadeia alimentar, desde a produção primária até o consumo.

A "caracterização do perigo" é o componente da avaliação de risco que fornece uma descrição qualitativa e quantitativa da severidade e duração de efeitos adversos que podem resultar da ingestão de microrganismos patogênicos ou de suas toxinas presentes no alimento. Uma avaliação da dose-resposta (relação entre a quantidade de microrganismo ingerida e a resposta observada) deverá ser realizada sempre que houver dados disponíveis.

Existem vários fatores importantes relacionados ao microrganismo e ao hospedeiro que precisam ser considerados na caracterização do perigo. Em relação ao microrganismo, algumas questões importantes são: a capacidade de multiplicação do microrganismo no alimento, a virulência do microrganismo, que pode mudar dependendo de sua interação com o ambiente, o material genético desse microrganismo que pode ser transferido entre os microrganismos, doses baixas de alguns microrganismos que podem, em alguns casos, causar um efeito grave, etc. Já com relação ao hospedeiro, os seguintes fatores merecem destaque: fatores genéticos, aumento de susceptibilidade devido ao desarranjo de barreiras fisiológicas, características individuais do hospedeiro tais como idade, nutrição,

gravidez, estado imunológico, etc. que lhe conferem maior ou menor susceptibilidade ao microrganismo (FAO/WHO, 1999).

O componente “avaliação da exposição” consiste na avaliação dos níveis de exposição do consumidor ao perigo microbiológico presente no alimento, no momento do consumo. A freqüência e o nível de contaminação do perigo no alimento ao longo do tempo são fatores que devem ser levados em consideração para a avaliação da exposição. Estes fatores são influenciados pelas características do microrganismo patogênico, ecologia microbiana do alimento, interação dos fatores intrínsecos e extrínsecos da microbiota que contamina o alimento, efeito das condições de processamento nessa microbiota, níveis de contaminação das matérias-primas, métodos de processamento, embalagem, distribuição e armazenamento do alimento, bem como das etapas de preparo tais como cozimento e manipulação. Outro fator que deve ser considerado é o padrão de consumo. A avaliação da exposição microbiana é, portanto, uma avaliação qualitativa ou quantitativa da provável ocorrência e ingestão de agentes patogênicos através do consumo de alimentos.

Por fim, a caracterização de risco representa a integração das informações obtidas nas etapas anteriores (identificação do perigo, caracterização do perigo e avaliação da exposição), que possibilita uma estimativa qualitativa ou quantitativa da probabilidade de ocorrência e severidade dos efeitos adversos em uma dada população, incluindo uma descrição das incertezas associadas com a estimativa de risco determinada. A Figura 2 ilustra o papel da avaliação de risco microbiológico no contexto da inocuidade de alimentos com vista à proteção da saúde da população.

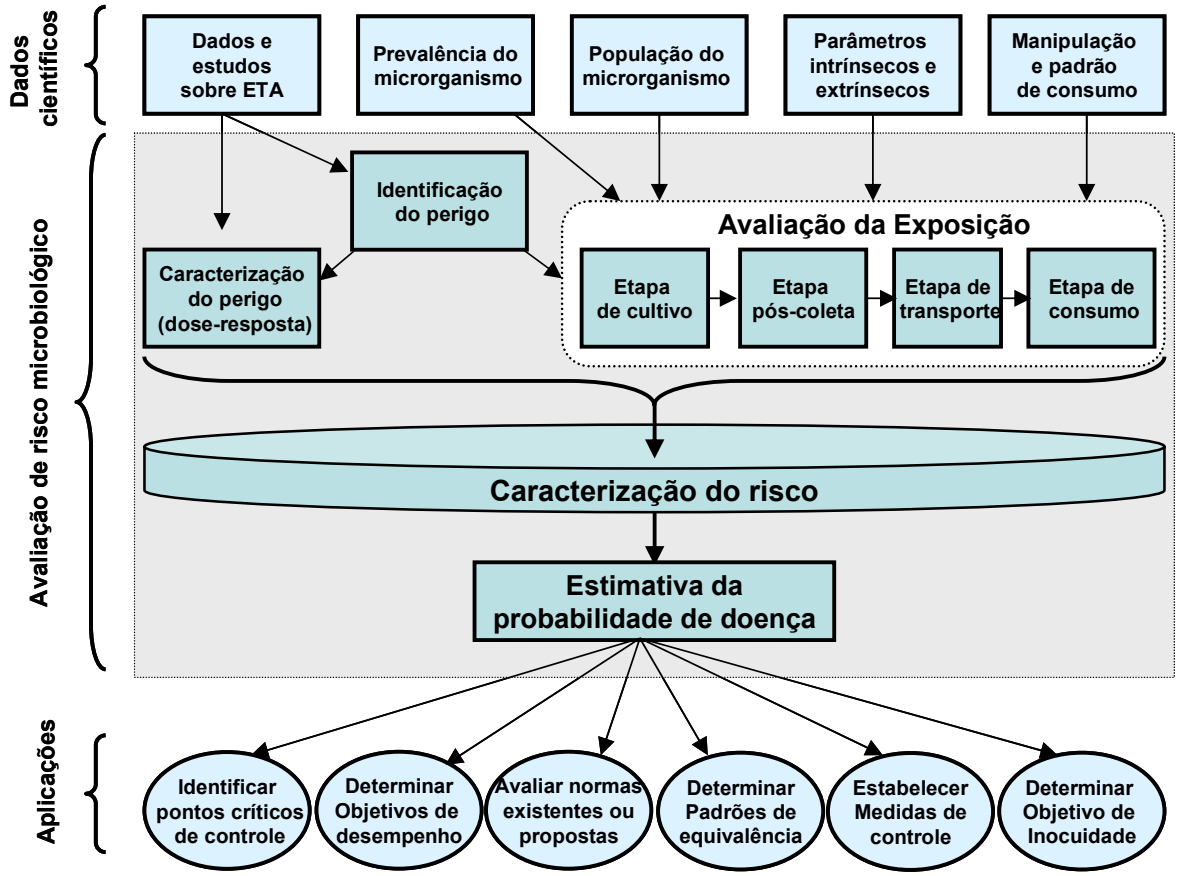


Figura 2. Exemplo de estrutura de avaliação de risco microbiológico como ferramenta para garantir a inocuidade de alimentos (modificado de Wachsmuth et al., 2003).

Em sua trigésima segunda sessão, o Comitê do *Codex Alimentarius* para Higiene de Alimentos (CCFH) identificou uma lista de combinações de microrganismos patogênicos e de alimentos de grande consumo consideradas prioritárias para o desenvolvimento de avaliação de risco. Constava dessa lista a associação da bactéria *Vibrio parahaemolyticus* a pescados (FAO, 1999).

As informações disponíveis sobre avaliação de risco de *V. parahaemolyticus* em pescados estão concentradas nos documentos preparados pela FAO/WHO (FAO e WHO, 2002) e pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (United States, 2005b) que abordam especificamente as ostras consumidas cruas. Na discussão sobre as estratégias de gestão de risco para *Vibrio* spp. em pescado, o Comitê do *Codex Alimentarius* para Higiene de Alimentos (CCFH) ressalta a falta de dados sobre a incidência e a população de *V. parahaemolyticus* em pescado e a necessidade de obtenção desses dados em escala mundial (FAO/WHO, 2003c).

Com o intuito de contribuir para o preenchimento dessa lacuna, desenvolvemos o presente projeto de pesquisa que consistiu na avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus,* associado ao consumo de ostras cruas cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo.

1.1. Avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus,* associado ao consumo de ostra crua.

1.1.1. Identificação do perigo

Vibrio parahaemolyticus (Vp) é uma bactéria do gênero *Vibrio* pertencente à família *Vibrionaceae*. Apresenta-se na forma de bastonetes curtos, retos ou curvos, é Gram-negativa e não formadora de esporo. O microrganismo é móvel por meio de um flagelo polar, quando cresce em meio líquido, ou mais de um flagelo quando em meio sólido; produz as enzimas oxidase e catalase, fermenta glicose sem produção de gás, é quimiorganotrófica, aeróbia facultativa com metabolismo oxidativo e fermentativo. Desenvolve-se melhor em condições alcalinas e é estritamente halofílica (Kaysner e DePaola, 2001; Oliver e Kaper, 2001). Vp está amplamente distribuído ao longo das águas costeiras ao redor do mundo. Esta bactéria é considerada um habitante comum dos estuários, sendo encontrada em todo o ambiente estuarino incluindo água, sedimentos, partículas suspensas, plâncton, peixes e moluscos, e é raramente encontrado em água doce (Oliver e Kaper, 2001). Comparado às outras bactérias patogênicas, Vp é um microrganismo relativamente sensível a tratamentos físico-químicos.

A identificação de sorotipos de Vp é baseada nas diferentes estruturas de dois grupos antigênicos, um antígeno termoestável somático O e um antígeno termolábil capsular K. O antígeno O é um lipopolissacarídeo que contém glicose, galactose, glucosamina, fósforo, éster de ácido graxo e compostos nitrogenados. O antígeno K é um polissacarídeo que contém vários açúcares, entre eles pentoses, hexoses, hexosaminas com a composição percentual que varia entre os antígenos (Twedt, 1989).

Vp pode ser classificado em 13 sorotipos O e 71 sorotipos K. Historicamente, as infecções por Vp foram caracterizadas por casos esporádicos causados por vários sorotipos. Entretanto, um número grande de casos clínicos observado após o

ano de 1996 foram associados com um único clone de Vp do sorotipo O3:K6 (Matsumoto et al., 2000; Okuda et al., 1997; Daniels et al., 2000; Parvathi et al., 2006).

A associação desse novo clone à grande maioria das infecções por Vp na Índia, Taiwan, Laos, Japão, Tailândia, Coréia, e nos Estados Unidos, entre 1997 e 1998, sugere que o microrganismo pode ter desenvolvido uma capacidade incomum para transmissão via alimento e que possui potencial pandêmico (Matsumoto et al., 2000). A ocorrência tão difundida de um único sorotipo de Vp não havia sido relatada anteriormente.

Outros dois sorotipos O4:K68 e O1:KUT ganharam importância a partir de 1998, quando começaram a ser detectados com maior freqüência em pacientes com diarréia em diferentes partes do mundo (Matsumoto et al., 2000; Chowdhury et al., 2000; Laohaprertthisan et al., 2003). O conteúdo genético desses isolados O4:K68 e O1:KUT é quase indistinguível daquele da cepa pandêmica O3:K6 e sugere que eles podem ter divergido desta cepa pandêmica pela alteração dos antígenos O:K (Matsumoto et al., 2000; Chowdhury et al., 2000).

Os mecanismos de patogenicidade são pouco compreendidos para a maioria das espécies de *Vibrio,* exceto para *V. cholerae* O1 e O139. Para outras espécies, no entanto, cepas individuais podem ou não possuir fatores de virulência ou até mesmo estarem presentes mas ainda não serem identificados. Tais espécies são, portanto, consideradas potencialmente patogênicas. Vp tem sido reconhecido como um agente de gastrenterite associada ao consumo de pescado, mas nem todas as cepas desta espécie são consideradas verdadeiramente patogênicas.

Um fator de virulência de Vp, por longo tempo associado epidemiologicamente à doença, é a presença de uma hemolisina produzida por algumas cepas de Vp. Essas cepas, por meio desta hemolisina, exibem hemólise tipo-beta sobre um meio de cultura contendo sangue, específico para esse fim, denominado ágar Wagatsuma. Quase todas as cepas de Vp isoladas de amostras clínicas demonstram esta atividade hemolítica, que tem sido chamada de fenômeno Kanagawa (KP), ao passo que somente 1 a 2% das cepas de fontes não clínicas são KP positivas (DePaola et al., 1990; Kelly e Stroh, 1988). Portanto, esta hemolisina é considerada um fator de virulência importante e, a reação de Kanagawa utilizada como um marcador para cepas virulentas (Levin, 2006; Shirai et al., 1990; Zhang e

Austin, 2005). Por esta razão, esta hemolisina é tema de extensos estudos por vários pesquisadores.

A hemolisina foi chamada Hemolisina Termoestável Direta (TDH – Thermostable Direct Hemolysin) baseado no fato de não ser inativada por aquecimento a 100ºC por 10 minutos. Além disso, a atividade hemolítica não foi intensificada com a adição de lecitina, o que indica uma ação direta sobre os eritrócitos. As atividades biológicas da TDH incluem hemólise de várias espécies de eritrócitos, citotoxicidade e aumento da permeabilidade vascular em pele de coelho (Nishibuchi e Kaper, 1995).

A evidência definitiva quanto à importância da TDH na enteropatogenicidade de Vp somente foi obtida recentemente ao se utilizar métodos mais sensíveis de análise. Os estudos moleculares do gene que codifica para a TDH (*tdh*) também têm revelado outros aspectos interessantes em relação à diversidade, mobilidade e regulação desse gene (Matsumoto et al., 2000; Nishibuchi e Kaper, 1995).

O gene *tdh* foi o primeiro a ser reproduzido a partir de uma cepa KP-positiva, e a produção de sondas derivadas deste gene facilitou a detecção e a análise de seus variantes (*tdh*1 e *tdh*2) em várias outras cepas, conforme demonstrado por Nishibuchi e Kaper (1990). Esses autores observaram também que os genes *tdh* são normalmente, mas não exclusivamente, localizados no cromossomo e que a expressão do fenômeno Kanagawa deve-se ao alto nível de transcrição do gene *tdh*2, mas não do *tdh*1. Esse alto nível de transcrição é devido, principalmente, a um promotor caracterizado por ter uma simples diferença de base de outros genes *tdh* (Okuda e Nishibuchi, 1998).

Algumas cepas de Vp, porém, apresentaram reação fraca de hemólise sobre ágar Wagatsuma, o que provoca dúvidas. Nishibuchi et al. (1985), ao estudarem cepas apresentando esse fenômeno, verificaram que 86% delas apresentaram o gene *tdh*. Entretanto, em contraste com a duplicação do gene encontrado em cepas KP positivas, aquelas cepas apresentaram somente uma cópia do gene *tdh* (Nishibuchi e Kaper, 1995).

Das cepas que não mostraram nenhuma hemólise sobre ágar Wagatsuma (KP-negativas), somente 16% delas foram positivas para o gene *tdh* em teste de hibridização de DNA, indicando que a maioria das cepas KP-negativas não possuem o potencial genético para produzir TDH (Nishibuchi et al., 1985).

Cepas *tdh*-positivas e KP-negativas, geralmente, têm uma cópia do gene *tdh*. Após a reprodução e caracterização destes genes, verificou-se que, apesar das variações na seqüência de nucleotídeos, os genes destas cepas KP-negativas codificavam proteínas TDH muito semelhantes às proteínas TDH codificadas pelos dois genes das cepas KP-positivas, isto é, elas apresentaram atividade hemolítica e foram imunologicamente indistinguíveis. Estes resultados sugerem que a expressão de baixos níveis dos genes *tdh* pode ser a razão para o fenótipo KP-negativo das cepas *tdh*-positivas (Nishibuchi e Kaper, 1990).

Em um trabalho posterior, Nishibuchi e Kaper (1995) relataram a existência de mais três variantes do gene *tdh*. Posteriormente, Okuda e Nishibuchi (1998) reproduziram as variantes *tdh*3 e *tdh*5, a partir de cepas Kanagawa negativas, e verificaram que essas variantes apresentaram níveis de transcrição tão baixos quanto os do gene *tdh*1.

Honda et al. (1988), Kelly e Stroh (1989), Magalhães et al. (1992) e Okuda e Nishibuchi (1998), observaram a produção de uma hemolisina diferente da TDH em cepas Kanagawa negativas causadoras de doença. Essa hemolisina, observada em várias dessas cepas, foi denominada de hemolisina termoestável relativa (TRH) e é codificada pelo gene *trh*. As duas hemolisinas, TDH e TRH, são compostas por 165 aminoácidos, possuem homologia de 67% e têm características físico-químicas, imunológicas e biológicas semelhantes, mas não idênticas. Isto sugere que os genes *trh* e *tdh* provavelmente evoluíram de um ancestral comum por uma simples mudança de base, de modo que a estrutura fundamental da proteína foi mantida. Essas hemolisinas são reconhecidas como os principais fatores de virulência de Vp, evidência esta comprovada pela presença de um ou dos dois genes na maioria das cepas clínicas desse microrganismo, mas não em cepas provenientes de alimentos (Nishibuchi e Kaper, 1995).

A expressão fenotípica da TRH ainda é incerta, porém, estudos demonstram uma forte relação entre as cepas uréase positiva e os genes responsáveis pela produção da TRH. A uréase tem um papel importante no mecanismo de virulência de algumas bactérias, como por exemplo, *Helicobacter pilori* (Okuda et al., 1997a; Magalhães et al., 1992; Parvathi et al., 2006; Park et al.,2000).

Apesar da correlação entre patogenicidade e o fenômeno Kanagawa, e o trabalho extenso relativo à associação entre fenômeno Kanagawa, hemolisina (TDH) e os genes *tdh* e *trh*, nenhum mecanismo preciso foi demonstrado até o momento.

Pode ser que vários fatores estejam envolvidos na patogenicidade, e o mecanismo possa variar de uma cepa para outra, como é observado para *V. cholerae* O1 e não-O1. Os estudos de Pace e Chai (1989) mostraram que cepas de Vp KP-positivas e Vp KP-negativas diferem em seus perfis de proteínas celulares e níveis de lipopolissacarídeos sob certas condições de multiplicação do microrganismo. Estes resultados indicam que a patogenicidade também pode estar relacionada com a composição do conteúdo celular. Alguns estudos sugerem que cepas de Vp Kanagawa positivas podem entrar no estado conhecido como "viável mas não cultivável" mais facilmente que as Kanagawa negativas, o que pode explicar a dificuldade em se isolar cepas de Vp Kanagawa positivas do ambiente (Pace e Chai, 1989).

Outros fatores de virulência para Vp já foram demonstrados, como adesão e indução da citotoxicidade em células de mamífero (Merrell et al., 1984; Barbieri et al., 1999).

Estudos têm mostrado que há uma forte associação entre patogenia e a presença dos genes *tdh* ou *trh* ou de ambos, indicando que em Vp as duas hemolisinas (TDH e TRH), codificadas por estes genes, são os principais fatores de virulência (Shirai et al., 1990). No entanto, há necessidade de mais informações sobre a patogenicidade para uma completa caracterização de Vp como patógeno.

Influência de parâmetros físico-químicos na multiplicação e sobrevivência de *V. parahaemolyticus*

Vp apresenta condições limite de multiplicação em temperatura mínima de 5ºC e máxima de 43ºC, com ótima de 37ºC (ICMSF, 1996). Vp multiplica-se muito rápido sob condições ótimas e pode ter um tempo de geração de 10 minutos (Twedt, 1989; ICMSF, 1996). Gooch et al. (2002) relatam que a população de Vp diminuiu 0,8 ciclos logaritmos (log_{10}) em ostras estocadas a 3ºC por 14 a 17 dias. Já Cook e Ruple (1989) observaram que não há multiplicação significativa de Vp em ostras estocadas a 10ºC. Johnson e Liston (1973) avaliaram o comportamento de Vp em ostras armazenadas a 5ºC e verifica que, após 14 dias de estocagem, a população reduziu 1,6 log, enquanto Muntada-Garriga et al. (1995), com a inoculação de Vp em homogeneizado de ostras, verificaram uma redução de até 3 log na população da bactéria em um período de 1 semana a 4ºC. Em outro trabalho, Johnson et al.

(1973) observaram que Vp sobreviveu, por pelo menos 3 semanas em ostras estocadas a 4ºC, enquanto Bauer et al. (2006), recuperaram Vp em amostras de mexilhão coletadas em temperatura de 0,6ºC. Thompson e Thacker (1973 apud Gooch et al., 2002), ao avaliar o comportamento de Vp em homogeneizado de ostras estocadas a 0, 4, 8, 10 e 12ºC, notaram que a população de Vp foi reduzida em, aproximadamente, 4 log após uma semana de estocagem em 0 e 4ºC, enquanto na temperatura de 8ºC não houve multiplicação, mas as células permaneceram viáveis por 3 semanas. Nas temperaturas de 10 e 12ºC ocorreu multiplicação e as células permaneceram viáveis por mais de 4 semanas. Em suma, de uma forma geral, em temperaturas abaixo de 10ºC não ocorre multiplicação de Vp.

Cook e Ruple (1989), verificaram que, após 1 dia de estocagem de ostras na temperatura de 22 ou 30ºC, os níveis de Vp foram 2 a 3 vezes maiores que os níveis no momento da coleta. Gooch et al. (2002) relataram um valor 50 vezes maior nos níveis de Vp após estocagem das ostras a 26ºC por 10 horas e 790 vezes maior após 24 horas de estocagem. Já na estocagem em temperatura de 3ºC, foi observado um valor 6 vezes menor nos níveis de Vp. Jiang e Chai (1996) relataram que uma cepa KP negativa deixou de ser cultivável mais lentamente que uma cepa KP+ em baixas temperaturas.

Com relação ao tratamento térmico, o valor D para Vp, baseado na redução de uma população de 6 log em ostras à temperatura de 50 ºC, foi calculado entre 1,0 e 1,2 min. O sorotipo O3:K6 foi mais resistente ao tratamento térmico e foram obtidos valores D entre 1,3 e 1,6 min (Andrews et al. 2000; 2003). De acordo com Vanderzant e Nickelson (1972), o aquecimento a 60, 80 e 100ºC por 1 min, eliminou uma população de Vp de 500 UFC/ml, enquanto algumas células sobreviveram a 60 e 80ºC por 15 min com o inóculo de $2x10^5$ UFC/ml. No entanto, não houve sobreviventes na temperatura de 100ºC por 1 min.

Andrews et al. (2000) sugeriram um tratamento térmico de 50ºC por 10 minutos para a inativação de *Vibrio* spp. em ostras mas, em outro estudo, Andrews et al. (2003), utilizando o sorotipo O3:K6 concluiram que o tempo mínimo necessário para eliminar uma população inicial de 10^6 UFC/g com temperatura de 50-52ºC é de 22 minutos.

A faixa de pH na qual Vp pode multiplicar-se é ampla. No entanto, a multiplicação em um determinado valor de pH é dependente do outros fatores físico-

químicos. De um modo geral, Vp multiplica-se melhor em condições alcalinas e esta resistência à alcalinidade é utilizada como fator de seleção do microrganismo nos protocolos de ensaio microbiológico. Apresenta multiplicação em pH mínimo de 4,8 e máximo de 11, com ótimo entre 7,8 e 8,6 (Twedt, 1989; Kaysner e DePaola, 2001).

V. parahaemolyticus apresenta condições limites de multiplicação em atividade de água (a_w) mínima de 0,94 e máxima de 0,996 e necessita de cloreto de sódio (NaCl) para sobreviver e multiplicar-se. Portanto, é estritamente halofílica podendo multiplicar-se em meio contendo entre 0,5 e 10% de NaCl, com ótimo na faixa de 2 a 3% de NaCl. Em água destilada, cerca de 90% das células são inativadas entre 1 e 4,4 minutos (Twedt, 1989; ICMSF, 1996).

Com relação aos métodos de conservação de alimentos, foi constatada maior resistência do sorotipo O3:K6 à alta pressão do que outros sorotipos de Vp em ostras. Esse sorotipo exigiu uma pressão de 300 MPa por 180 segundos para se obter uma redução de 5 ciclos logaritmos na população. Já em tampão fosfato salina, o tempo necessário para alcançar essa mesma redução com uma pressão de 250 MPa, foi de 102 segundos, para sorotipos não-O3:K6 e de 267 segundos para o sorotipo O3:K6 (Cook, 2003). No estudo de Calik et al. (2002), a pressão de 345 MPa aplicada por 90 segundos reduziu 6 log da população de um isolado clínico de Vp inoculado em ostras, mas a exposição de um isolado ambiental à mesma pressão por 120 segundos conseguiu reduzir a população em apenas 5,3 log.

Os vibrios são altamente sensíveis à irradiação e normalmente são eliminados com doses tão baixas quanto 0,5 kGy. Valores D_{10} para Vp variam entre 0,02 e 0,4 kGy. Segundo Jakabi et al. (2003), a dose de 1 kGy é suficiente para reduzir 6 log na população de Vp inoculada em ostras. Outros estudos demonstram que a dose de 5 kGy reduz, em pelo menos 6 ciclos logaritmos uma população de *Vibrio* spp. (United States, 2005a).

No entanto, o método mais comumente utilizado para eliminação de microrganismo em ostras é a depuração. A depuração é um processo de purificação em que as ostras, que se alimentam por filtração, são colocadas em um ambiente que contém água purificada. As ostras eliminam as bactérias por meio do bombeamento e filtração da água tratada. Assim sendo, a depuração é um processo

de purificação em que as condições ambientais são controladas e a água utilizada é livre de microrganismos (Rodrick e Schneider, 1991).

A eficiência do processo de depuração de ostras depende de fatores como o sistema utilizado, as condições de operação, a espécie de bactéria, a contaminação inicial, o estado fisiológico da ostra, o local de coleta, o tempo e a temperatura de exposição e a salinidade (Eyles e Davey, 1984; Richards, 1988; Murphree e Tamplin, 1991; Tamplin e Capers, 1992; Lopes, 2001).

Apesar da depuração ser um processo natural para os moluscos bivalves, pode-se melhorar os resultados se o ambiente em que esses animais são expostos não sofrer muitas variações ambientais (Richards,1988). A temperatura da água, a salinidade, o conteúdo de oxigênio dissolvido, a turbidez e a concentração de fitoplâncton podem afetar o processo de eliminação de patógenos. Esses fatores devem ser cuidadosamente controlados, pois a atividade fisiológica, a taxa de filtração e as respostas comportamentais dos moluscos podem variar em relação ao ambiente de depuração (Richards, 1988; Rowse e Fleet, 1984). Segundo Rowse e Fleet (1984), a depuração de *E. coli* e de *Salmonella* spp. por *Crassostrea commercialis* (*Sidney Rock Oyster*), foi altamente afetada por diferentes salinidades e temperaturas, e foi mais efetiva em temperaturas entre 18º e 22ºC e salinidades entre 3,2 e 4,7%.

Pesquisas têm mostrado ainda, que a resposta de moluscos filtradores ao processo de depuração é diferente daquela para *E. coli* e *Salmonella* quando concentram certos microrganismos como vírus entéricos e vibrios (Franco et al., 1990; Lopes, 2001).

Basicamente, existem três tipos de sistemas de depuração: o sistema de fluxo contínuo, no qual a água limpa é injetada continuamente nos tanques de depuração; o sistema chamado "*batch process"* no qual a água pode ser substituída em intervalos de tempo determinados e o sistema fechado de circulação no qual ocorre recirculação da água do tanque de depuração (Eyles e Davey, 1984; Blogoslawski, 1991). Os sistemas de depuração com recirculação de água são mais freqüentes, mas algumas plantas de depuração usam um processo em lotes, sem recirculação, e utilizam grandes volumes de água do mar. Nesse caso, é necessário ter um controle maior na concentração de oxigênio dissolvido.

No processo de depuração, deve-se utilizar água tratada para prevenir a recontaminação e multiplicação bacteriana. No tratamento da água podem ser

utilizados cloro, ozônio, luz ultravioleta e iodóforos. A cloração é o mais antigo procedimento de desinfecção, sendo um processo muito utilizado de desinfecção microbiana. Apesar de eficiente na redução de populações microbianas, é pouco eficiente, quando se trata de vírus entéricos como poliovírus, vírus da hepatite A e Norwalk vírus.

A cloração reduz o conteúdo de oxigênio da água, que induz um estresse nas ostras e diminui a eficiência da purificação. Além disso, uma das fortes restrições ao uso de cloro é a formação de compostos químicos de halogênios (cloraminas) resultantes da oxidação de compostos orgânicos presentes na água. Estudos mostram que elevadas concentrações de cloro na água podem causar interrupção do processo fisiológico da ostra e alteração das características sensoriais. Mesmo em baixas concentrações, o cloro também pode afetar o processo de bombeamento dos moluscos (Richards, 1988).

O processo de desinfecção da água com o uso de ozônio também é efetivo na redução de toxinas, que resultam da descarga de efluentes industriais na orla marinha, além de oxidar substâncias químicas de origem antrópica (Blogoslawski e Stewart, 1983). O ozônio aumenta a concentração de oxigênio dissolvido na água que deixa de ser um fator limitante na desinfecção. O tratamento com ozônio não produz alterações sensoriais no produto, mas pode gerar compostos tóxicos assim como diminuir ou interromper o processo fisiológico das ostras, dependendo da sua concentração (Blogoslawski, 1991).

Outro processo eficiente de desinfecção da água envolve a utilização de luz ultravioleta (UV). O uso de luz UV na água do mar é um dos sistemas mais utilizados nos Estados Unidos e Reino Unido para a depuração de moluscos. Os microrganismos somente são destruídos quando em contato direto com a luz. A radiação ultravioleta elimina os microrganismos da água por causar danos no material genético, sendo efetiva na inativação de bactéria e vírus. A penetração da luz ultravioleta está diretamente relacionada à profundidade e turvação da água (Rodrick e Schneider, 1991).

A eficiência desse processo de depuração depende do tempo de exposição dos bivalves, sendo recomendados processos combinados como o tratamento de água do mar com luz UV juntamente com ozônio ou cloro. Geralmente, os equipamentos comerciais limitam a espessura da camada de água exposta à fonte

de luz UV entre 1 e 3 mm. Esse processo não deixa resíduo e não inibe o processo fisiológico da ostra (Eyles e Davey, 1984; Blogoslawski, 1991).

Na região de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo, grande produtora de ostras, dois processos diferentes para desinfecção da água são utilizados no processo de depuração das ostras aí cultivadas. Um deles utiliza o processo de ozonização e o outro usa luz UV para desinfecção da água.

Incidência de *V. parahaemolyticus* em ostras

Ostras são moluscos bivalves da família *Ostreidae*. Existem cerca de 200 espécies em todo o planeta, mas apenas 12 espécies são utilizadas comercialmente, entre elas as do gênero *Crassostrea* (Dore, 1991).

Ostras talvez sejam o produto de aqüicultura mais antigo, tendo sido cultivadas pelos romanos há 2 mil anos atrás. Porém, é possível que os chineses as tenham cultivado bem antes desta época. As técnicas de cultivo de ostras mudaram muito lentamente ao longo dos séculos. Mas, verificou-se uma mudança significativa, nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de técnicas de cultivo em "fazendas" e novos métodos de crescimento rápido e com baixa mortalidade. Contudo, a produção de ostras ainda é muito susceptível à poluição ambiental e aos parâmetros ambientais como salinidade, temperatura, oxigênio e nutrientes da água de cultivo (Dore, 1991).

Esses moluscos bivalves possuem o sistema de alimentação por filtração, alimentando-se, portanto, de partículas em suspensão na água. O alimento entra por suas duas valvas mantidas ligeiramente abertas, estabelecendo um fluxo de água pelas brânquias. Estas brânquias funcionam como um filtro e concentram partículas orgânicas, algas microscópicas e outros organismos que servem como alimento para o animal. A capacidade de filtração da ostra pode atingir 10 litros de água por hora e cerca de 200 litros por dia. Por esta característica e processo de bioacumulação, são as ostras reconhecidas como reservatório de vários microrganismos patogênicos humanos e podem acumular bactérias patogênicas naturais do ambiente marinho, como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, e microrganismos de origem fecal, principalmente, *Samonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* e vírus entéricos (Rippey, 1994; Brasher et al., 1998; Potasman et al., 2002; Lee et al., 2003).

No Brasil, foram encontrados alguns trabalhos que relatam a incidência de *V. parahaemolyticus* no ambiente marinho (Gelli et al., 1979; Matté et al., 1994; Landgraf et al.,1996; Figueirôa et al.,1997; Rodrigues, 1998; Lira et al., 1999; Ristori, 2000; Barboni, 2002; Sousa et al., 2004; Mendes et al., 2004; Barros et al., 2006;).

Gelli et al. (1979) analisaram 30 amostras de ostras não depuradas, procedentes da região de Cananéia, São Paulo, no período de janeiro a novembro de 1975. A presença de Vp foi detectada em todas as amostras (100%), com populações oscilando entre 9,1 e $3,9x10^6$ NMP/g.

Matté et al. (1994), também em São Paulo, no período entre fevereiro de 1989 e fevereiro de 1990, estudaram a ocorrência de víbrios patogênicos em 26 amostras de ostras, procedentes da região de Cananéia, coletadas em restaurantes, peixarias e bancas de feiras-livres e constataram a presença de *V. parahaemolyticus* em 77% das amostras, com populações variando de <3 a 1.200 NMP/100 g, com média de 110 NMP/100 g. Das 88 cepas de *V. parahaemolyticus* submetidas ao teste de Kanagawa, somente 1 (1,1%) apresentou resultado positivo. Landgraf et al. (1996), analisaram 100 amostras de pescado (56 de ostras, 20 de mexilhões e 24 de camarão), no período de março de 1991 a agosto de 1993, e detectaram Vp em 49 (87,5%) das 56 amostras de ostras.

Rodrigues (1998), ainda em São Paulo, analisou 20 amostras de ostras e 100 de mexilhões, detectando a presença de *V. parahaemolyticus* em 13 (61,5%) amostras de ostras e em 39 (39%) de mexilhões. Ristori (2000), identificou *V. parahaemolyticus* em 20 amostras (100%) de ostras procedentes da região de Cananéia, entre junho de 1998 e março de 1999. A população variou de 3,6 a > 2.400 NMP/g. Dos 479 isolados, 174 (36,3%) foram identificados como Vp e todos negativos para o teste de Kanagawa. Por outro lado, Sousa et al. (2004), no Ceará, encontraram *V. parahaemolyticus* em apenas 1 (8,3%) do total de 12 amostras de ostras analisadas e este isolado também apresentou resultado negativo para o teste de Kanagawa.

Em Aracajú, Sergipe, foram analisadas 37 amostras de moluscos bivalves com *V. parahaemolyticus* tendo sido identificado e enumerado em 5 (13,5%) amostras de moluscos, com população variando de $2,9x10^2$ a $4,6x10^3$ UFC/g (Carneiro, 1999).

No Maranhão, Gonçalves (2003) examinou 24 amostras de ostras comercializadas nas praias de São Luís e detectou a presença de *V. parahaemolyticus* em 19 (79,2%) amostras.

Em Pernambuco, Mendes et al. (2004), analisaram 36 amostras de ostras comercializadas na grande Recife, com 31 (86,1%) delas positivas para espécies de *Vibrio*, com predominância de *V. parahaemolyticus* (54,8%). Todos os isolados apresentaram resultado negativo para o teste de Kanagawa. Também em Pernambuco, Lira et al. (1999), analisaram 16 amostras de ostras, constataram a presença de *V. parahaemolyticus* em 4 (25%) amostras, com a população variando entre 30 e 300 UFC/g.

Pereira (2004), no Estado de Santa Catarina, analisou 90 amostras de ostras da espécie *Crassostrea gigas*, sendo 45 coletadas no comércio e as outras 45 no local de cultivo. De acordo com os resultados, *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* não foram encontrados em nenhuma das amostras.

Barros et al. (2006), analisaram 60 amostras de ostras comercializadas em 2 restaurantes de Fortaleza, Ceará, no período compreendido entre janeiro de 2002 e fevereiro de 2003. A população de *Vibrio* spp. variou de 93 a 9300 NMP/g. De 140 isolados, 57 foram identificados como *Vibrio* spp., sendo 31 (54,4%) *V. parahaemolyticus*, 14 (24,6%) *V. mimicus*, 6 (10,5%) *V. harveyi* e 6 (10,5%) *V. vulnificus*.

Pereira et al. (2004), no Estado do Rio de Janeiro, analisaram 10 amostras de mexilhão e 40 de ostras, entre julho de 1997 e fevereiro de 1998. Foram isoladas 264 culturas de *Vibrio* sp. na seguinte freqüência: *V. parahaemolyticus* (40%), *V. carchariae* (25%), *V. alginolyticus* (15%), *V. harveyi* (8%), *V. vulnificus* (7%), *V. orientalis* (3%), *V. cincinnatiensis* (1%), *V. narinus* (0,5%) e *V. fluvialis* (0,5%). Todas as 141 culturas de *V. parahaemolyticus* foram negativas para o teste de Kanagawa.

Barboni (2002), pesquisou a ocorrência de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos em 107 amostras de moluscos bivalves comercializados nos municípios da área da Baía de Todos os Santos e Valença, na Bahia. Das 107 amostras, 29 estavam congeladas, 24 resfriadas e 54 à temperatura ambiente. Isolados de *Vibrio* spp. foram detectados em 78 (72,9%) amostras. A maior ocorrência foi de *V. parahaemolyticus,* detectado em 35 (32,7%) amostras de moluscos. Dos isolados, 336 foram considerados vibrios patogênicos, dos quais, 216 (64,3%) eram *V. parahaemolyticus*.

Figueirôa et al. (1997), em Pernambuco, analisaram 127 amostras de alimentos marinhos representados por mariscos (50), ostras (61) e peixes (16) e água (9). *V. parahaemolyticus* foi isolado em 79 (62,2%) delas, assim distribuídas: mariscos 40 (80%), ostras 33 (54%), peixes 6 (37%) e água 9 (44,4%) amostras.

Rodrigues e Hofer (1986), avaliaram a presença de *Vibrio* spp. em 30 amostras de ostras recolhidas em diferentes pontos da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, durante o período de um ano. Foram identificados 184 isolados de *Vibrio* spp. nas amostras de ostras, sendo 31 deles (7,94%) identificados como Vp.

Diversas pesquisas relatam a incidência de Vp em ostras em outros países (Deepanjali et al.,2005; DePaola et al., 1990; DePaola et al., 2000; Cook et al., 2002; Hara-Kudo et al., 2003).

Na Índia, Deepanjali et al. (2005), utilizaram o método de hibridização de DNA e detectaram Vp em 46 (93,8%) de 49 amostras de ostras com população variando de 10 a 10^4 UFC/g. Vp patogênico foi detectado em 5 (10,2%) das 49 amostras, empregando a técnica de hidridização de colônia com sonda para o gene *tdh*.

Nos Estados Unidos, DePaola et al. (2000) determinaram a população de Vp e a ocorrência de cepas patogênicas (*tdh*+ ou *trh*+) em ostras, após os surtos ocorridos nos Estados de Washington, Texas e Nova York, entre 1997 e 1998, com o uso de sondas especificas para *tdh* e *trh*. Vp foi isolado de 77, 100 e 93% das amostras do Noroeste do Pacífico, Texas e Nova York, respectivamente. A maioria das contagens ficou entre 10 e 1000 UFC/g, exceto em duas amostras que apresentaram contagens de 46.000 e 23.000 UFC/g. Vp Kanagawa positiva foi detectada em 2,8% de 106 amostras de ostras.

DePaola et al. (2003) verificaram a presença e a população de Vp em ostras coletadas no período de março de 1999 a setembro de 2000 no Alabama, Estados Unidos. Os pesquisadores utilizaram sondas genéticas para os genes *tlh* que confirma espécie, e *tdh*, característico de patogencidade. Vp foi detectada em todas as 156 amostras analisadas, com populações variando de <10 a 12.000 UFC por grama. Altas populações de Vp estavam associadas à altas temperaturas da água. Cepas patogênicas (*tdh*+) foram detectadas em 34 (21,8%) das 156 amostras. Das cepas *tdh*+, 97% produziram uréase e também foram *trh*+. O sorotipo O3:K6 não foi detectado.

Cook et al. (2002), nos Estados Unidos, analisaram 347 amostras de ostras e detectaram Vp em 72,9% das amostras. Vp patogênico foi detectado em 9 (0,3%) de 3429 isolados testados.

No Japão, Hara-Kudo et al. (2003) detectaram Vp *tdh*+ em 33 (10%) das 329 amostras de pescado analisadas e a produção de TDH foi observada em 11(3,3%) das 329 amostras.

1.1.2. Caracterização do perigo representado por *V. parahaemolyticus* associado ao consumo de ostras cruas

Vp causa gastrenterites, infecções em feridas e septicemia. A manifestação mais comum da doença, porém, é a gastrenterite com um período de incubação médio de 15 horas, com extremos variando de 4 a 96 horas e duração de 2 a 7 dias. Os principais sintomas são diarréia (100%), dores abdominais (86%), náuseas e vômitos (26%), dor de cabeça, febre e calafrios (Oliver e Kaper, 2001; Daniels et al., 2000; Butt et al., 2004). Em geral, é uma doença autolimitante que evolui sem a necessidade de hospitalização, entretanto, casos fatais também podem ocorrer.

Os estudos revelam que a dose infectante se situa na faixa de 10^6 a 10^9 células de Vp Kanagawa positiva. Uma cepa KP+ isolada de um caso de gastrenterite não desencadeou sintomas de doença com uma dose de 200 células. Porém, com uma dose de $2x10^5$ células de Vp KP+, foi observado desconforto abdominal para 1 de 4 pacientes. Em outros estudos, os voluntários ingeriram 10^{10} células de Vp Kanagawa negativas e não apresentaram sintomas da doença (Sanyal e Sen, 1974 apud United States, 2005b).

As infecções humanas causadas por *V. parahaemolyticus* são relatadas mais freqüentemente na Ásia e nos Estados Unidos e são consideradas raras na Europa. Os principais veículos desta bactéria são os alimentos de origem marinha crus, semi-cozidos ou cozidos, e contaminados após processamento (Daniels et al., 2000, Alam et al., 2002).

Na Ásia, *V. parahaemolyticus* é a principal causa de doenças veiculadas por alimentos. No Japão, no período entre 1996 e 1998, foram registrados 496 surtos com 24.373 casos notificados. A maioria dos surtos (94%) envolveu menos de 50 casos, 6% envolveram entre 50 e 499 casos e surtos envolvendo mais de 500 casos foram relatados em duas ocasiões. Um deles envolveu 691 casos e foi associado ao

consumo de siri cozido contaminado com Vp sorotipo O3:K6. O outro grande surto envolveu 1167 casos e foi causado por vários sorotipos (IDSC, 1999).

De acordo com o *International Disease Surveillance Center* (IDSC), do Japão, o número de casos de infecção por Vp duplicou no ano de 1998 em relação a 1997 e ultrapassou o número de casos por *Salmonella* no país (IDSC, 1999).

Em Taiwan, entre 1986 e 1995, foram notificados 555 surtos, com 23.270 casos de enfermidades transmitidas por alimentos. Destes, 197 (35,5%), com um total de 8.967 casos (38,5%), foram causados por Vp (Pan et al., 1997).

Na Espanha, entre 1997 e 2000, ocorreram 84 surtos de infecção por Vp, e, em um deles, o alimento incriminado foi ostra, que envolveu de 64 pessoas, no ano de 1999. Em 2004, ocorreu outro surto envolvendo 80 casos. Já na França, a literatura cita um surto causado, aparentemente, pela ingestão de camarão importado da Ásia, que envolveu 44 pacientes (Lemoine et al., 1999, apud Robert-Pillot et al., 2004).

Nos Estados Unidos, entre 1973 e 1998, foram relatados 40 surtos de infecção por Vp que resultaram em 1064 casos, sendo 12 (30%) deles relatados entre 1997 e 1998. Entre julho e agosto de 1997, ocorreu um surto que resultou em mais de 200 casos de infecção em 7 Estados americanos e no Canadá, e os sorotipos mais freqüentemente isolados foram O4:K12 e O1:K56. Entre maio e julho de 1998, um surto associado ao consumo de ostras cruas provenientes do Texas, provocou 416 casos em 13 Estados. Todos os Vp isolados de pacientes pertenciam ao sorotipo O3:K6 que, até então, era considerado endêmico na Ásia (United States, 1998, 1999; Daniels et al., 2000). Recentemente, entre maio e julho de 2006, foi relatada a ocorrência de 177 casos de infecção por Vp em três Estados americanos. Desses, 72 foram confirmados e 105 considerados prováveis. Dos 23 isolados de Vp testados, 18 pertenceram ao sorotipo O4:K12. Esta incidência é maior do que a esperada, com base no número de casos registrados no período de 2001 a 2004 (United States, 2006). A estimativa do Centro para Controle de Doenças (CDC) é que ocorram, aproximadamente, 4.500 casos de doença causados por Vp e destes, 2.800 estão associados ao consumo de ostras cruas (United States, 2005b).

No Chile, até 1997, a infecção por Vp ocorria de forma esporádica. No entanto, entre novembro de 1997 e março de 1998, ocorreu um surto que afetou 340 pessoas. Um segundo surto, com aproximadamente 1.500 pessoas atingidas, ocorreu entre janeiro e março de 2004, na região costeira e de clima frio de Puerto

Montt. Um terceiro surto teve início no verão de 2005 e, até março daquele ano, 759 casos já haviam sido confirmados. Suspeita-se, no entanto, que mais de 10.000 pessoas foram afetadas em todo o País (Olea et al., 2005; González-Escalona et al., 2005; Fuenzalida et al., 2006).

No Brasil, o primeiro isolamento e identificação de *V. parahaemolyticus* de caso de infecção gastrintestinal humana foi descrito por Hofer (1983) que detectou cepa do sorotipo O5:K17 e Kanagawa positiva em fezes de diarréia de uma criança no Ceará. A única informação obtida foi a presença freqüente de peixes de origem marinha e de água doce na alimentação.

Patrício et al. (2003), relatam um surto de gastrenterite por *V. parahaemolyticus*, também no Ceará, durante evento em um hotel. Das 26 pessoas entrevistadas, todas apresentaram diarréia, 88,5% dores no estômago, 65,4% náuseas, 42,3% vômito, 34,6% dores de cabeça.

A ocorrência de *V. parahaemolyticus* foi estudada em 1.100 amostras de fezes diarréicas por Magalhães et al. (1991) em Recife, Pernambuco. A bactéria foi detectada em 14 (1,3%) amostras, todas provenientes de indivíduos adultos, maiores de 18 anos. *V. parahaemolyticus* sempre foi o único enteropatógeno isolado, exceto em uma ocasião na qual esteve associado a *Salmonella* spp.

Os demais componentes da avaliação quantitativa de risco de doença, causada por Vp, associado ao consumo de ostras cruas – avaliação da exposição ao perigo e caracterização do risco – serão mais bem abordados no item Resultados e Discussão.

1.2. Processo de produção de ostra na região Cananéia, São Paulo

No período de 2003 a 2005, a região de Cananéia foi responsável por praticamente (97%) toda a produção de ostras do Estado de São Paulo. Neste período, a produção média anual foi de, aproximadamente, 68,2 toneladas de ostras (Instituto de Pesca, 2007). No entanto, esta produção representa menos de 5% da produção nacional quando comparada à produção de ostras do Estado de Santa Catarina. A ostreicultura Catarinense produziu no mesmo período, uma média anual

de 2.162 toneladas de ostras que representa mais de 90% da produção nacional (CEPA/EPAGRI, 2006).

O processo de produção consiste, inicialmente, na coleta das ostras diretamente do mangue. O mangue da região de Cananéia é a base da produção da chamada ostras de mangue *Crassostrea brasiliana.* As ostras de tamanho comercial são levadas para a indústria para depuração e comercialização, enquanto as menores são destinadas à engorda em viveiros (Figura 3). Os viveiros são construídos com bambu ou outras madeiras, ou ainda, de forma mais definitiva, em estacas e travessões de cimento revestidos por telas plásticas. As ostras permanecem nos viveiros até adquirirem tamanho comercial.

Figura 3. Viveiro de engorda de ostras na região de Cananéia, São Paulo.

As ostras que serão comercializadas são coletadas dos viveiros em sacos de malha ou em caixas plásticas e, em seguida, são levadas em embarcação até a estação de depuração. Na chegada à indústria (estação de depuração), as ostras

são retiradas do barco e lavadas com água sob pressão para a retirada do lodo. Após a limpeza, são retiradas as cracas, madeira do mangue e as pequenas ostras aderidas à ostra comercial. As ostras são, então, colocadas no tanque para passarem pelo processo de depuração, após o que, são acondicionadas nas embalagens de papelão, com capacidades para 1, 5 ou 10 dúzias de ostras. Essas embalagens são lacradas, identificadas e armazenadas diretamente no veículo de transporte ou em local coberto e arejado até o transporte.

O transporte até os pontos de venda é realizado em veículos tipo furgão. Geralmente, as ostras são armazenadas sob refrigeração nos locais de venda.

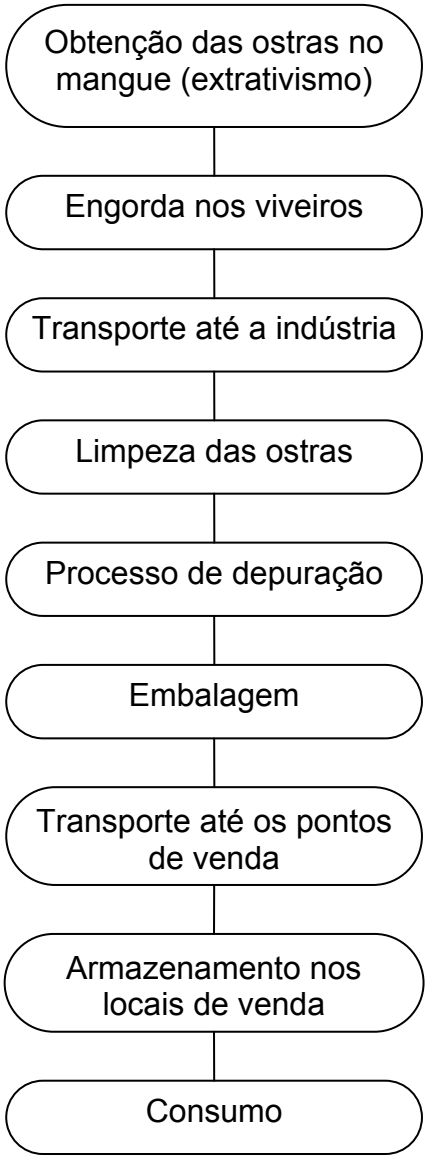


Figura 4. Fluxograma de produção de ostras na região de Cananéia, São Paulo.

2. Objetivos

Tendo em vista o exposto, a presente pesquisa teve como objetivo a avaliação quantitativa do risco de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas por meio da:

- determinação das populações de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras (*Crassostrea brasiliana*), cultivadas na região de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo, ao longo da cadeia produtiva, isto é, nas etapas de cultivo, no processo de depuração e pontos de comercialização;
- quantificação da exposição dos consumidores ao patógeno *V. parahaemolyticus* relacionada ao consumo de ostras cruas;
- obtenção de um modelo quantitativo para avaliação do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas.

3. Material e Métodos

3.1. Ostras

O estudo foi desenvolvido com amostras de ostras (*Crassostrea brasiliana*), coletadas em três pontos da cadeia produtiva de duas empresas localizadas no município de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo. Os 3 pontos de amostragem foram: os locais de cultivo; a indústria (antes e depois do processo de depuração) e os locais de consumo e/ou de compra de ostras pelo consumidor (restaurantes, supermercados, peixarias).

As amostras coletadas nos locais de cultivo foram utilizadas para avaliar a influência dos parâmetros físico-químicos da água do mar (temperatura e salinidade) na população de Vp em ostras. As amostras coletadas na indústria foram utilizadas para avaliar a eficiência dos processos de depuração praticados pelas empresas sobre a população de Vp em ostras. Já as amostras coletadas nos locais de consumo foram utilizadas para validar os resultados obtidos, pelo modelo desenvolvido, para a exposição dos consumidores a Vp associada ao consumo das ostras cruas.

3.2. Coleta das amostras de ostras nos diversos pontos da cadeia produtiva

3.2.1. Coleta de amostras de ostras nos locais de cultivo

Foram realizadas 21 coletas, no período compreendido entre maio de 2004 e junho de 2005, totalizando 123 amostras, cada uma composta de 12 a 15 ostras provenientes de 6 locais de cultivo da região de Cananéia, SP (Figura 5), Esses 6 locais pertencem a 2 (duas) empresas submetidas ao Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em 18 coletas, foram amostrados os 6 locais de cultivo. No entanto, por causa do tempo necessário para percorrê-los (2 a 3 horas) e a variação da maré, nas outras 3 coletas foram amostrados 5 dos 6 locais.

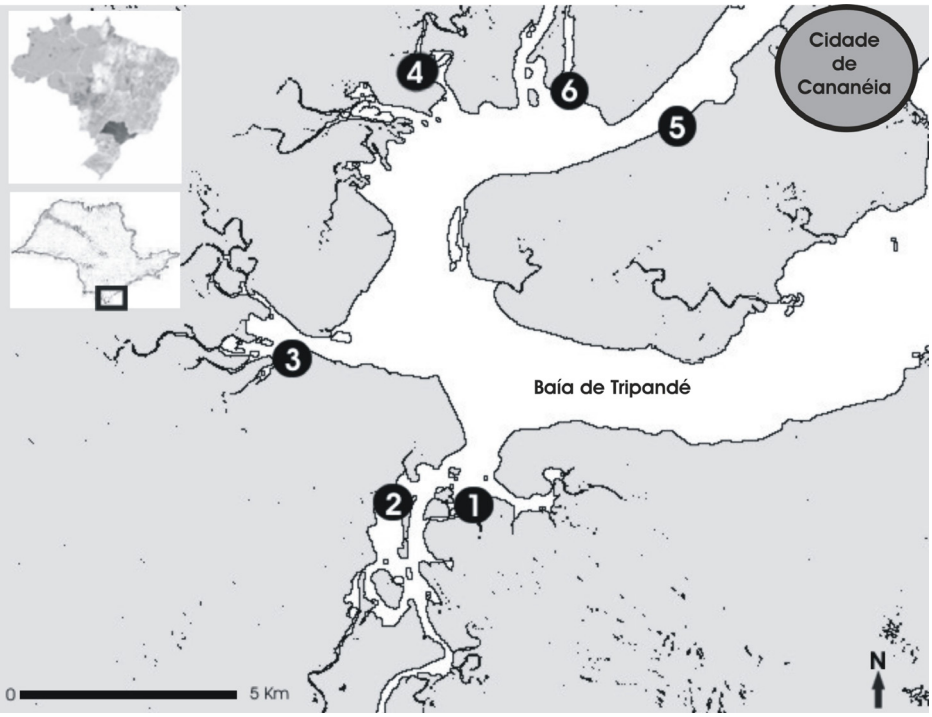


Figura 5. Locais de coleta de amostras de ostras na região estuarino-lagunar de Cananéia (25ºS; 48ºW), São Paulo.

3.2.2. Coleta de amostras de ostras na indústria para avaliação do processo de depuração

Nesta etapa, foram realizadas 5 coletas, num total de 40 amostras, cada uma composta por 12 a 15 ostras, com a finalidade de avaliar a influência dos processos de depuração - um que utiliza água tratada com luz ultravioleta e o outro água ozonizada - sobre a população de Vp nas ostras. Para cada processo de depuração, foram coletadas 20 amostras de ostras provenientes de um único local de cultivo, 10 amostras foram depuradas e as outras 10 não foram depuradas.

3.2.3. Coleta de amostras de ostras nos locais de consumo

Foram coletadas 74 amostras de ostras cruas, cada uma delas composta por 12 ostras, no período de fevereiro de 2006 a agosto de 2006 e em janeiro de 2007, provenientes de 4 supermercados e 4 restaurantes e/ou churrascarias da cidade de São Paulo e de 4 restaurantes e 1 mercearia das cidades de Santos, Guarujá, Praia Grande.

3.3. Procedimentos de coleta de amostras de ostras ao longo da cadeia produtiva

3.3.1. Procedimento de coleta de amostras de ostras nos locais de cultivo

Utilizando uma embarcação, foram percorridos os 6 locais de cultivo de ostras. Em cada local, selecionou-se, aleatoriamente, um viveiro do qual foram coletadas, manualmente, de 12 a 15 ostras que foram colocadas em embalagem plástica transparente (45x35x0,20cm). Essas embalagens plásticas foram acondicionadas, imediatamente, em uma caixa de material termoisolante, com gelo reciclável e temperatura oscilando entre 4 e 13 ºC. Essa caixa foi transportada ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), no final da coleta. No laboratório, as ostras foram acondicionadas sob temperatura de refrigeração (4 a 8 ºC) e analisadas em um período de, no máximo, 24 horas após a coleta.

As amostras de água do mar foram coletadas no mesmo local de coleta das amostras de ostras, em frascos plásticos com capacidade para 250 mL que foram acondicionados em uma caixa de material termoisolante, com gelo reciclável. A salinidade da água foi determinada com um salinômetro (Beckman Industrial, modelo RS 10, Rosemount Analytical), em um período de 48 horas após a coleta. A temperatura da água foi determinada no momento da coleta, com o uso de um termômetro de mercúrio.

3.3.2. Procedimento de coleta de amostras de ostras na indústria para avaliação do processo de depuração

Amostras com 30 ostras, coletadas de um mesmo local de cultivo, foram selecionadas no momento da chegada na indústria. Na indústria onde ocorria o processo de depuração, essas 30 ostras foram divididas em 2 sub-amostras de 15 animais cada. Uma das sub-amostras foi submetida ao processo de depuração e a outra foi colocada, simultaneamente, em uma caixa plástica, com água do mar não tratada, e armazenada no mesmo local do tanque de depuração. Ao final da depuração, todas as sub-amostras (depuradas e não depuradas) foram acondicionadas, individualmente, em embalagens plásticas transparentes e mantidas em uma caixa de material termoisolante, com gelo reciclável e temperatura oscilando entre 4 e 12 ºC. O transporte ao laboratório ocorreu de maneira análoga ao descrito anteriormente.

3.3.3. Procedimento de coleta de amostras de ostras nos locais de consumo

Em cada local de consumo, o procedimento de coleta das amostras foi realizado como um consumidor comum, ou seja, nos restaurantes foi solicitado que fosse servida uma porção de ostras (12 ostras), porém, sem abri-las. No caso dos supermercados e da mercearia, as amostras foram adquiridas nas embalagens de comercialização e estavam dispostas sobre gelo picado ou em temperatura de refrigeração nas gôndolas. As amostras com, cada uma, 12 ostras foram colocadas em embalagens plásticas transparentes (45x35x0,20cm) e acondicionadas, imediatamente, em uma caixa de material termoisolante, com gelo reciclável e temperatura oscilando entre 4 e 12ºC. O transporte ao laboratório ocorreu de maneira análoga ao descrito anteriormente.

3.4. Preparo das amostras de ostras para enumeração da população de *Vibrio parahaemolyticus*.

Para todas as amostras analisadas, a superfície externa das ostras foi lavada com o auxílio de uma escova e sob água corrente potável para remoção de resíduos aderidos às cascas. As 12 ostras de cada amostra foram abertas com auxílio de uma faca esterilizada e o músculo de cada animal foi retirado, e, juntamente com o líquido interno, foram colocados em uma embalagem plástica (Whirl-Pak®, NASCO, USA). Em seguida, homogeneizados em aparelho Stomacher (Seward, UK) por 2 minutos em alta velocidade.

Para as amostras coletadas nos locais de consumo e na indústria, as embalagens plásticas estéreis, que continham os tecidos moles e o líquido interno, foram pesadas antes da homogeneização para determinar o peso por ostra consumida.

3.5. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* das amostras de ostras coletadas (Elliot et al., 1998; Kaysner e DePaola, 2004).

3.5.1. Nas amostras coletadas nos locais de cultivo

Isolamento e identificação

De cada homogeneizado, preparado como descrito no item 3.4, foi preparada uma alíquota de 25 g que foi homogeneizada em 225 mL de solução salina com 3% de NaCl (LabSynth, Diadema, Brasil). Agitou-se por 30 segundos e, em seguida, procedeu-se à diluição decimal seriada até 10^{-5}.

De cada diluição, transferiu-se 1mL, em triplicata, para 3 tubos com 10mL de Água Peptonada Alcalina (APA) com 3% de NaCl, pH 8,5. Incubou-se por 18-20 h a 37ºC.

Os tubos que apresentaram turvação foram semeados em placas com ágar TCBS (Oxoid, Basingstoke, UK). Após incubação a 37ºC por 24 h, três colônias típicas de *V. parahaemolyticus* (colônias de 1-3 mm, côncava, verde-azuladas, com centro verde-azulado mais escuro) foram semeadas em placas de ágar soja tripticase (Oxoid, Basingstoke, UK) com 3% de NaCl (TSA + 2,5% NaCl). Após 24 horas a 37ºC, foi realizado o teste para produção de enzima oxidase e, quando positivo, semeou-se em tubos com meio para o teste de motilidade, ágar Arginina-Glicose (AGS) e em ágar tríplice açúcar ferro (TSI, Oxoid). Todos os meios apresentavam 3 % de NaCl em sua composição. Incubaram-se a 37 ºC por 18 a 24 h. Em seguida, isolados com reações características para Vp, foram submetidos à prova de halofilismo em caldo triptona (1%), com diferentes concentrações de NaCl (0; 6; 8 e 10%).

As colônias que apresentaram crescimento em 6 e 8% de NaCl e não crescimento em 0 e 10% foram, posteriormente, identificadas com o auxílio do kit API 20E (bioMérieux, França), com o uso de solução diluente com 2% de NaCl.

3.5.2. Nas amostras coletadas na indústria para avaliação do processo de depuração

O procedimento utilizado foi o mesmo descrito no item 3.5.1.

3.5.3. Nas amostras coletadas nos locais de consumo

O isolamento de colônias de Vp seguiu o protocolo descrito nos itens anteriores (3.5.1. e 3.5.2), enquanto a identificação do microrganismo e de seus fatores de virulência foi realizada por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR) descrita a seguir. Após incubação das placas de ágar TCBS a 37 ºC por 24 h, de três a cinco colônias típicas de *V. parahaemolyticus* de cada placa foram inoculadas em um tubo com 3 mL de caldo soja tripticase (TSB) (Oxoid,

Basingstoke, UK), contendo 2 % de NaCl e outras 2 côlonias foram semeadas em ágar soja tripticase (TSA), (Oxoid, Basingstoke, UK), com 3 % de NaCl (TSA + 2,5 % NaCl).

A identificação do microrganismo e de seus fatores de virulência foi realizada por meio da reação de polimerização em cadeia "PCR" descrita a seguir.

3.5.3.1. Identificação dos isolados e detecção dos fatores de virulência empregando PCR

3.5.3.1.1. Isolamento do DNA de Vp

Os isolados do item 3.5.3, mantidos em ágar TSA com 3%NaCl à temperatura ambiente, foram inoculados em tubos com 3 mL de TSB adicionados de 1,5% de NaCl e incubados a 37 ºC por 18-20 horas. Decorrido esse período, transferiu-se 1 mL dessas culturas para tubos Eppendorf de 1,5 mL.

Estes tubos foram submetidos à centrifugação a 12000 g (Eppendorf, Alemanha) por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,85%. Após a segunda lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) estéril. Os tubos foram, então, colocados em água em ebulição por dez minutos. O lisado de células com DNA foi estocado a -20ºC até o momento de uso.

3.5.3.1.2. Reação de polimerização em cadeia (PCR) para identificação de Vp e detecção de genes que codificam para os fatores de virulência

Os conjuntos de "primers" utilizados para a amplificação são apresentados na Tabela 1.

As reações foram realizadas em 25 μl, com o uso da mistura de reagentes (master mix) PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR (GE, Suécia), que continham 2,5 U de Taq DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP no volume final de reação. Adicionavam-se à mistura de reagentes, 1,25 μL (5 %) de DNA e 0,5 μM de cada primer. A amplificação foi conduzida em um termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer, EUA), com o seguinte programa: 3 minutos a 94 °C de desnaturação inicial, seguida de 25 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e um ciclo final

a 72 °C por 3 min. Alíquotas dos produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose NA (GE, Suécia) a 2,0 % p/v em TBE 0,5X (Sambrook et al., 1989) com a adição de 3 µL de "loading buffer" (Sambrook et al., 1989). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Bio-Rad Sub Cell GT, EUA), com TBE 0,5X. O marcador de peso molecular utilizado foi o de 100 bp DNA ladder (Invitrogen, EUA). O gel foi corado em brometo de etídeo (1 µg/mL) (Pharmacia Biotech, Suécia) por 20 minutos e as imagens registradas com o sistema EDAS120, sob transiluminação em UV 320 nm, e fotografado sob luz ultravioleta. A identificação dos isolados foi definida pelo número e tamanho dos fragmentos gerados.

Tabela 1. Conjuntos de "primers" utilizados na identificação e determinação de fatores de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* de acordo com Kaysner e DePaola (2001; 2004).

"Primers"	Sequência de Oligonucleotídeos	Produto de PCR (pb)	Especificidade
L-TL	5' aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg 3'	450	espécie
R-TL	5' gct act ttc tag cat ttt ctc tgc 3'	450	
VPTRH-L	5' ttg gct tcg ata ttt tca gta tct 3'	500	hemolisina TRH
VPTRH-R	5' cat aac aaa cat atg ccc att tcc g 3'	500	
VPTDH-L	5' gta aag gtc tct gac ttt tgg ac 3'	270	hemolisina TDH
VPTDH-R	5' tgg aat aga acc ttc atc ttc acc 3'	270	

3.6. Estudo dos fatores de virulência em *V. parahaemolyticus.*

3.6.1. Isolados obtidos das amostras de ostras coletadas nos locais de cultivo

As colônias identificadas como *V. parahaemolyticus*, conforme item 3.5.1, foram analisadas, quanto ao fenômeno Kanagawa, por meio da produção da hemolisina termoestável direta (TDH – "Thermostable Direct Hemolysin"), em ágar Wagatsuma, com eritrócitos humanos (Elliot et al.,1998).

As culturas foram inoculadas em TSB + 2,5% de NaCl e incubadas a 37 ºC por 18-20 horas. Inocularam-se superficialmente os isolados e uma cultura padrão de Vp, gentilmente cedida pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz, positiva para esta reação, em ágar Wagatsuma. Após incubação a 37ºC por 24 horas, observou-se a

ocorrência de um halo transparente de beta-hemólise ao redor do crescimento da colônia.

3.6.2. Isolados obtidos das amostras de ostras coletadas nos locais de consumo

Nesta etapa, as características de virulência dos isolados de Vp foram determinadas por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR), conforme descrito no item 3.5.3, para detecção dos genes *tdh* e *trh*.

3.7. Temperatura da água do mar e do ar no município de Cananéia

Os dados de temperatura do ar e da água do mar, no município de Cananéia, SP, foram disponibilizados pelo Departamento de Oceanografia Física do Instituto Oceanográfico da USP. Esses dados contêm medidas realizadas a cada meia hora entre os anos de 2001 e 2004, exceto quando perdidos por causa do mau funcionamento ou manutenção do equipamento.

3.8. Condições e tempo de coleta e transporte e armazenamento nos locais de consumo

As informações sobre as condições e tempo de coleta e de transporte foram obtidas por meio de entrevistas com as pessoas responsáveis por esse controle e também por observações realizadas por nós durante o acompanhamento destas atividades.

A temperatura das ostras durante o transporte da indústria até os locais de consumo, realizado em automóvel tipo furgão, foi monitorada durante 3 (três) meses, com um registrador de temperatura (ViP3, Qualiterm Eletrônica, Brasil), e sensibilidade de 0,5 ºC, colocado entre as embalagens de ostras.

As informações sobre as condições de armazenamento nos locais de consumo foram obtidas por meio de entrevistas com as pessoas responsáveis. Em alguns estabelecimentos, foi possível visitar os locais de estocagem e medir a temperatura ambiente desses locais utilizando um termômetro digital (Hanna Instruments, USA).

3.9. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, versão 8.0), Microsoft® Excel e @Risk (Palisade Corporation, version 4.5), com nível de significância de 5% de probabilidade. O modelo (Apêndice A) foi desenvolvido em planilha do Microsoft® Excel. Os valores dos NMPs foram calculados com a tabela para 3 tubos por diluição de acordo com Blodgett (2003).

Um modelo de simulação de Monte Carlo[1] foi desenvolvido para capturar a variabilidade e a incerteza dos processos associados à população de Vp em ostras, a influência das práticas de cultivo e manipulação das ostras, o padrão de consumo e a resposta humana à exposição a Vp. Os fatores incluídos no modelo são a temperatura e salinidade da água do mar, a temperatura do ar ao longo da cadeia produtiva, o tempo de transporte e estocagem, o efeito do processo de depuração, a quantidade de ostras consumidas e a quantidade de ostras por porção servida. Esses fatores são combinados com a taxa de multiplicação, de morte e a relação dose-resposta.

Todos os cálculos foram executados pelo método Monte Carlo de amostragem das distribuições das variáveis de entrada e combinando apropriadamente os valores amostrados para gerar as distribuições das variáveis respostas. As simulações do modelo foram implementadas utilizando o software @Risk, onde cada iteração do modelo prediz a população de Vp em ostras multiplicando-se a distribuição estimada da porcentagem de Vp que é patogênico pela distribuição predita para Vp total no momento da coleta. Em seguida, são avaliadas as mudanças na população de Vp patogênico ao longo da cadeia produtiva.

---

[1] Simulação de Monte Carlo é um método para avaliar, iterativamente, um modelo determinístico com o uso de um conjunto de números ou variáveis aleatórias como variáveis de entrada. Esse método é freqüentemente usado, quando o modelo é complexo, não linear, ou envolve muitos parâmetros de incerteza. O método de Monte Carlo é apenas um dos vários métodos para analisar a propagação de incertezas que tem como meta determinar como a variação aleatória, a falta de conhecimento ou o erro afeta a sensibilidade, o desempenho ou a confiabilidade do sistema que está sendo modelado.
A simulação de Monte Carlo é categorizada como um método de amostragem, desde que as variáveis de entrada sejam geradas aleatoriamente de distribuições de probabilidade, para simular o processo de amostragem de uma população. Assim, tenta-se escolher uma distribuição para as variáveis de entrada que melhor se ajuste aos dados disponíveis ou que melhor represente o conhecimento sobre o assunto. Os dados gerados pelas simulações podem ser representados como distribuições de probabilidade (ou histogramas) ou intervalos de confiança, etc. (Vose, 2000; United States, 1997).

As contagens de Vp total também foram avaliadas ao longo da cadeia produtiva por dois motivos: limitar a população máxima de Vp em ostras e também para validar os resultados da avaliação da exposição apresentados pelo modelo.

A população de Vp patogênico ingerida por porção de ostras foi obtida combinando a distribuição da população de Vp patogênico por grama de ostras no momento do consumo e a distribuição do peso, em gramas, de ostras por porção servida. A população de Vp patogênico por porção de ostras no momento do consumo foi combinada com a relação dose-resposta para estimar o risco de uma pessoa tornar-se doente.

A variabilidade do modelo, ou seja, a iteração do modelo foi avaliada por meio de uma simulação com 5.000 iterações, com o uso das melhores estimativas dos parâmetros das variáveis de entrada.

Já a incerteza sobre a estimativa da probabilidade de doença foi avaliada pela repetição 500 vezes da simulação de 5.000 iterações, com a utilização, porém, de um conjunto diferente dos parâmetros das variáveis caracterizadas como de incerteza para cada simulação.

A seleção de novos valores dos parâmetros das distribuições de incerteza foi implementada no modelo por meio de uma macro (Modelo.Incerteza), construída em linguagem “Visual Basic” no *Microsoft® Visual Basic* (Microsoft Corporation, EUA) que seleciona, aleatoriamente, novos valores para os parâmetros após cada simulação.

A adequação do ajuste de dados a uma distribuição de probabilidade foi realizado pelos testes de aderência de qui-quadrado, Kolmogorov-Smirnov ou Anderson-Darling, com o uso do software @Risk.

A relação entre a população de Vp em ostras e os fatores ambientais (temperatura e salinidade da água do mar) foi determinada por meio do procedimento PROC REG do pacote estatístico SAS, e teve como critérios de análise o teste para falta de ajuste do modelo e a significância dos parâmetros.

Para estimar a taxa de multiplicação de Vp em ostras foi utilizado o modelo proposto por Miles et al. (1997), para predizer a multiplicação de Vp em função da temperatura e da atividade de água.

A distribuição da porcentagem de isolados Vp patogênico em relação a Vp total foi estimada, supondo-se que as populações de isolados de Vp patogênico nas

amostras seguem um modelo Beta-Binomial[2] em relação à população de Vp total (patogênico e não patogênico) (United States, 2005b; FAO e WHO, 2002).

Em conseqüência da impossibilidade de se obter uma estimativa exata da distribuição da proporção de Vp patogênico e os contextos de incerteza e variabilidade envolvidos na avaliação de risco, neste trabalho foi escolhido o método Bayesiano para obter uma estimativa da distribuição da porcentagem de Vp patogênico em relação à população de Vp total. Este é um método bastante utilizado para se obter uma estimativa "a posteriori" da distribuição da variável de interesse, particularmente para a distribuição Beta. Assim, a porcentagem de isolados de Vp patogênico foi estimada como uma distribuição Beta(s+1;n-s+1) (Vose, 2000; FAO e WHO, 2002).

A influência do processo de depuração praticado pela indústria sobre a população de Vp de ostras foi avaliada em um delineamento experimental em blocos casualizados, tendo cada coleta como um bloco e as ostras como fonte de variação, com dois níveis: depuradas e não depuradas. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância pelo procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS. Para efeito de simulação, o método de "bootstrap" não paramétrico foi utilizado para caracterizar a distribuição do efeito do processo de depuração.

Na análise de sensibilidade realizada sobre a probabilidade de doença (variável resposta), para avaliar a influência das variáveis de entrada associadas, utilizou-se o método de regressão (*multivariate stepwise regression*), disponível no software @Risk. Este tipo de análise de regressão é utilizado para calcular os coeficientes do modelo de regressão com múltiplas variáveis de entrada (Vose, 2000; Palisade Corporation, 2005).

[2] A distribuição Beta-binomial é uma distribuição Binomial (parâmetros n, p) em que a probabilidade de sucesso (parâmetro p) possui distribuição beta, ou seja, Beta-binomial (n, α, β) = Binomial (n, p) onde p = Beta(α, β). Maiores informações podem ser obtidas em Vose (2000).

4. Resultados

4.1. Avaliação da exposição humana a *V. parahaemolyticus* associado ao consumo de ostras cruas.

Neste trabalho, a avaliação da exposição humana a Vp visou obter uma estimativa da quantidade (ou da freqüência) de Vp ingerido por meio do consumo de ostra crua, cultivada no município de Cananéia e comercializada no Estado de São Paulo. A exposição foi modelada considerando as quatro estações do ano separadamente, uma vez que as condições meteorológicas influenciam diretamente a população de Vp em ostras.

Há poucos dados disponíveis sobre a população de Vp em ostras cruas no momento do consumo. Entretanto, uma modelagem utilizando dados disponíveis sobre os fatores que influenciam a população de Vp em ostras no seu cultivo, permite predizer essas populações, com um bom grau de confiança. Estes fatores incluem as variáveis ambientais que contribuem para a presença de Vp em ostras no cultivo e o impacto das práticas de manipulação e processamento sobre a multiplicação ou redução da população de Vp em ostras antes do consumo.

A tabela 2 mostra os resultados das contagens de Vp nas amostras de ostras coletadas ao longo da cadeia produtiva.

A representação esquemática da avaliação da exposição é mostrada na Figura 6. A avaliação foi dividida em 3 etapas: cultivo, pós-coleta e consumo. Na etapa de cultivo, foram considerados os fatores que influenciam a prevalência de Vp em ostras no momento da coleta. Na etapa pós-coleta, foram considerados os fatores associados ao transporte, manipulação e a depuração. Já na etapa de consumo, foram considerados fatores como a quantidade de ostras consumidas por porção, o peso médio de cada ostra consumida e a população de Vp patogênico no momento do consumo.

As populações de Vp total e patogênico, em ostras, foram estimadas para cada evento/etapa de processamento ou manipulação. As densidades estimadas em cada etapa foram usadas como variáveis de entrada na etapa subseqüente, ou seja, os resultados da etapa de cultivo foram utilizados como entrada para a etapa pós-coleta.

Tabela 2. População de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras em pontos da cadeia produtiva das ostras produzidas em Cananéia, SP.

Etapa da cadeia produtiva	Estação do ano	Número de amostras	População média de Vp total (log NMP/g)	População média de Vp patogênico (log NMP/g)
Cultivo	Inverno	35	2,44 (1,06)*	0,48**
	Outono	35	3,48 (1,01)	<0,48
	Primavera	29	3,26 (1,17)	<0,48
	Verão	24	3,47 (0,75)	<0,48
Depuração com ozônio				
Antes	Primavera	10	4,14 (0,48)	-
Depois	Primavera	10	3,42 (1,21)	-
Depuração com luz UV				
Antes	Verão	10	3,27 (0,98)	-
Depois	Verão	10	3,30 (0,66)	-
Consumo	Inverno	22	3,76 (0,91)	<0,48
	Outono	24	4,58 (0,71)	<0,48
	Primavera	-	-	
	Verão	28	4,86 (0,87)	<0,48

* Valores entre parênteses representam o desvio padrão
** População estimada na amostra positiva (apenas 1 das 35 analisadas).

O resultado do modelo quantitativo da avaliação da exposição foi, então, combinado com o modelo dose-resposta para obter o impacto dessa exposição sobre a saúde pública. As variáveis de entrada do modelo são representadas como distribuições ao invés de estimativas pontuais. Uma distribuição possibilita que um conjunto de valores, cada um com uma freqüência de ocorrência específica, seja incluído no modelo.

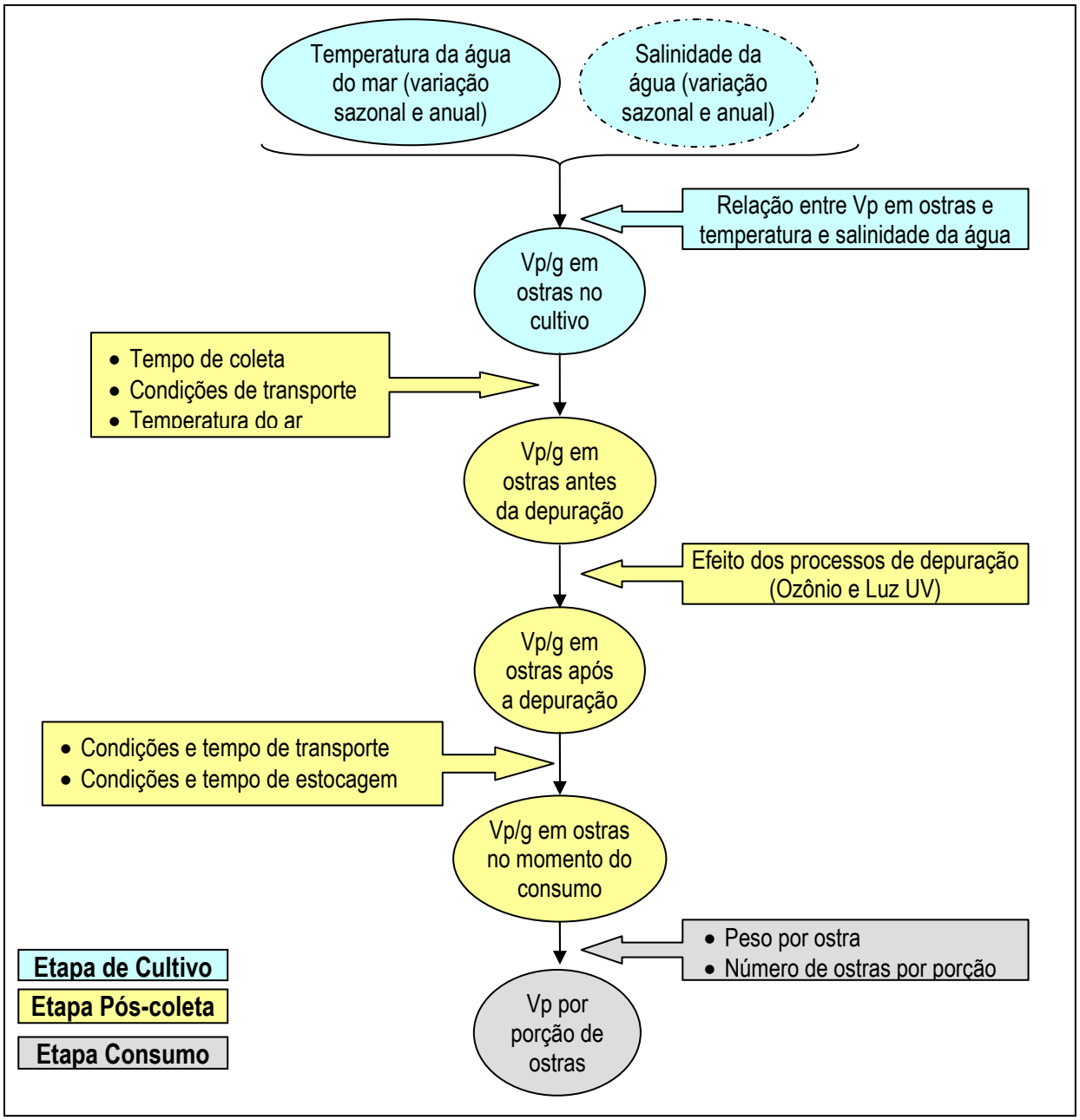


Figura 6. Modelo conceitual para a avaliação da exposição humana a *Vibrio parahaemolyticus* em ostras, do cultivo ao consumo (modificado de United States, 2005b).

4.1.1. Resultados da avaliação da exposição na etapa de cultivo

Existem diversas vias através das quais as bactérias podem atingir as áreas de cultivo de ostras. Esses microrganismos podem ser originados de animais aquáticos e terrestres, alguns dos quais podem abrigar cepas virulentas e atuar como hospedeiro intermediário; também podem ser introduzidos por meio do transporte de ostras de diferentes locais ou por liberação da água de lastro de

navios de carga, visto que esses navios transportam grande quantidade de água dos locais de origem da carga (Sarkar et al., 1985; McCarthy e Khambaty, 1994; FAO/WHO, 2002).

Uma vez introduzido, vários fatores podem influenciar a permanência de Vp no ambiente, os quais incluem a interação de condições ambientais, as espécies e a fisiologia dos mariscos, além da genética do microrganismo. Certas áreas podem ter condições ambientais favoráveis para o estabelecimento, a sobrevivência e a multiplicação do microrganismo, tais como a temperatura, a salinidade, o zôo plâncton, o fluxo da maré e o oxigênio dissolvido na água (Amako et al., 1987; Garay et al., 1985). Fatores específicos das ostras, como a sua fisiologia e o estado de saúde, também contribuem para a capacidade de Vp colonizar e se multiplicar nesses animais. Além desses, bacteriófagos, toxinas ou outras proteínas, produzidas por cepas bacterianas que infectam ou colonizam as ostras da mesma forma que Vp, também podem afetar a sobrevivência desse microrganismo.

Mesmo tendo sido identificado, no momento da coleta, um número de fatores que possa ter influência sobre a população de Vp, há pouca informação disponível para quantificar os efeitos da maioria desses fatores. Além disso, análises indicam que a temperatura da água é, na maioria das vezes, o principal determinante da população de Vp em ostras (United States, 2005b; FAO/WHO, 2002). Nesta pesquisa, a população de Vp em ostras, no momento da coleta, foi estimada utilizando-se a relação entre Vp total em ostras e os valores de temperatura e de salinidade da água do mar, a distribuição da temperatura da água em cada estação do ano e a proporção de Vp patogênico em ostras.

No momento da coleta das amostras de ostras nos locais de cultivo, foram determinados os valores da temperatura e da salinidade da água desses locais, o que possibilitou relacionar a população de Vp com esses fatores ambientais. Por outro lado, para se conhecer a variação da temperatura da água do mar e a temperatura do ar, no município de Cananéia, foram utilizados os dados fornecidos pelo Departamento de Oceanografia Física do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, no período de 2001 a 2004.

A seleção dos dados para a utilização na modelagem da população de Vp, na etapa de cultivo, considera a disponibilidade de informações sobre as variáveis que podem influenciar no desenvolvimento de Vp. Portanto, os dados utilizados nesta etapa incluem a distribuição da temperatura da água no município de Cananéia, a

relação entre a população de Vp em ostras e a temperatura e a salinidade da água do mar, a relação entre Vp patogênico e não patogênico em ostras, ou seja, a prevalência de cepas patogênicas. Estas relações foram determinadas com os resultados obtidos com as 123 amostras coletadas nos locais de cultivo.

Suposições consideradas na etapa de cultivo:

- As populações de Vp (em $\log_{10}$NMP/g de ostra), no momento da coleta, apresentam distribuição normal (Vose, 2000), com a contagem média proporcional à temperatura média diária e a salinidade da água do mar;
- A variabilidade da temperatura da água, para todos os locais de cultivo, ao longo do ano é, adequadamente, representada pela temperatura média diária obtida para o município de Cananéia, SP;
- O tempo de exposição das ostras ao ar no período de maré baixa não é significativo para promover alteração nas populações de Vp em ostras;
- A variação da população de Vp patogênico em relação à população de Vp total (patogênico e não patogênico) em ostras segue uma distribuição Beta. Essa distribuição é muito utilizada para descrever a incerteza ou a variação aleatória de uma prevalência, fração ou probabilidade (Vose, 2000);
- As estações do ano são bem definidas pelo calendário.
- A relação entre Vp patogênico e não patogênico em ostras é constante ao longo do ano e é a mesma para todos os locais de cultivo;

4.1.1.1. Distribuição da temperatura da água

A Figura 7 mostra a variação da temperatura média diária no período compreendido entre os anos de 2002 e 2004.

A distribuição da temperatura da água foi estimada a partir dos dados de temperatura medidos pelo Instituto Oceanográfico da USP, a cada meia hora, entre os anos de 2001 e 2004. Contudo, por causa de defeitos e manutenção do equipamento, o número de dados coletados não foi uniforme ao longo dos anos, principalmente com relação ao ano de 2001.

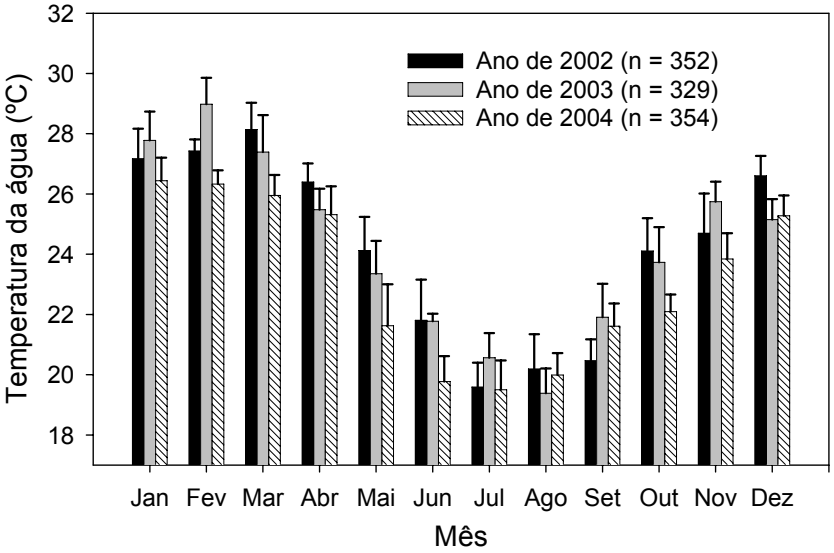


Figura 7. Distribuição mensal da temperatura média diária da água nos anos de 2002 a 2004, no município de Cananéia, SP. A barra de erro expressa um desvio padrão.

Os dados de temperatura da água do mar, em cada estação do ano, entre os anos de 2001 e 2004, ajustaram-se a uma distribuição normal (Figuras 8A, 8C e 8D), exceto para o outono. Neste caso, considerou-se que a temperatura segue uma distribuição normal, como mostrado na Figura 8B.

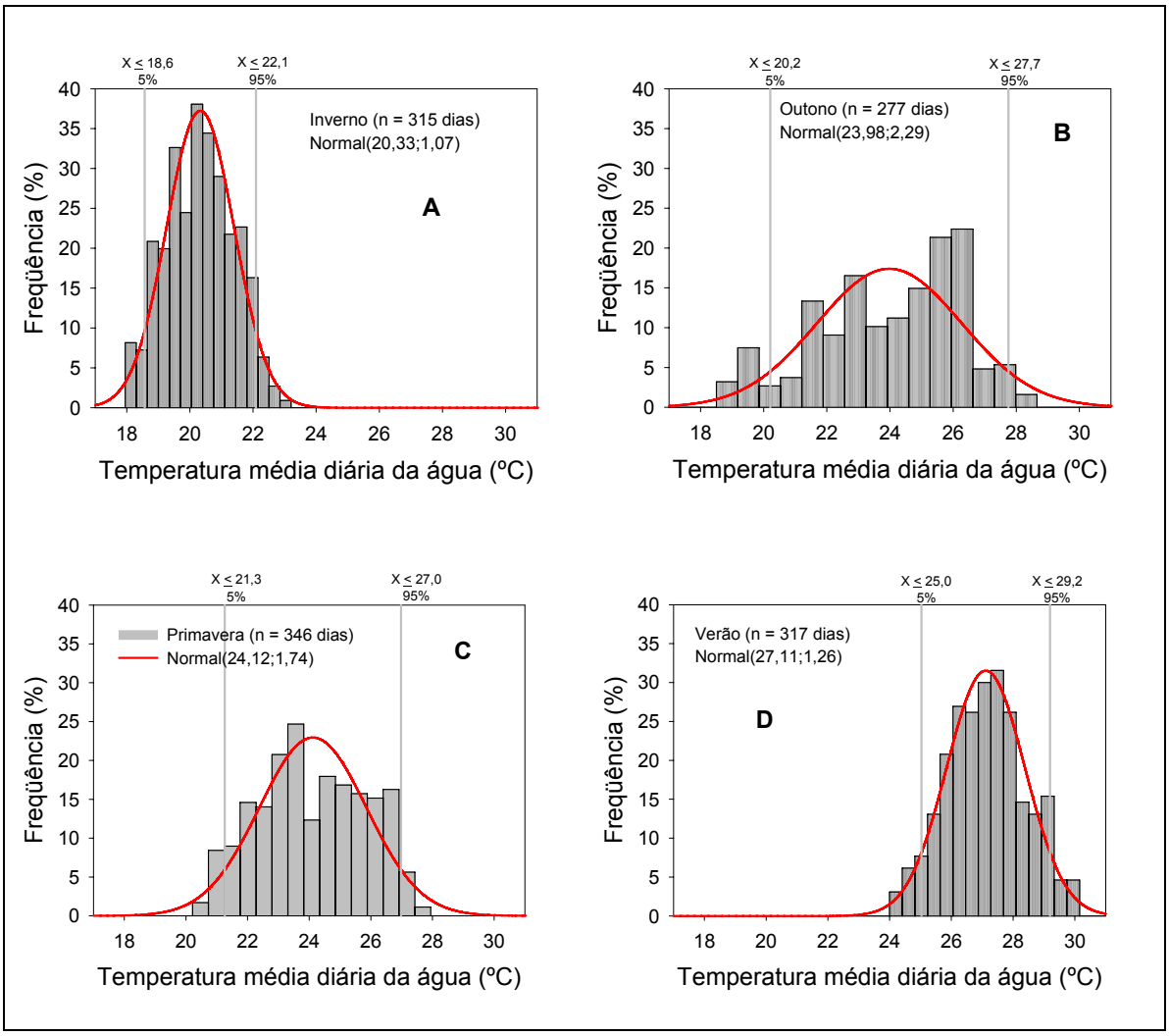


Figura 8. Distribuição sazonal da temperatura média diária da água no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004.

A suposição de que a variação da temperatura da água do mar ao longo do dia é bem representada pela temperatura média diária da água, pode ser justificada pela pequena variação, em média menor que 0,5 ºC, dos desvios-padrão das medições diárias de temperatura, como mostra a Figura 9.

Embora exista uma variação na temperatura da água e do ar ao longo do dia (Figura 9), os efeitos dessa variação não foram considerados na predição da população de Vp no momento da coleta, visto que esta variação é menor (possui menor desvio padrão) do que a observada entre os dias e considerada pouco representativa nas variações naturalmente presentes nas populações do microrganismo em estudo.

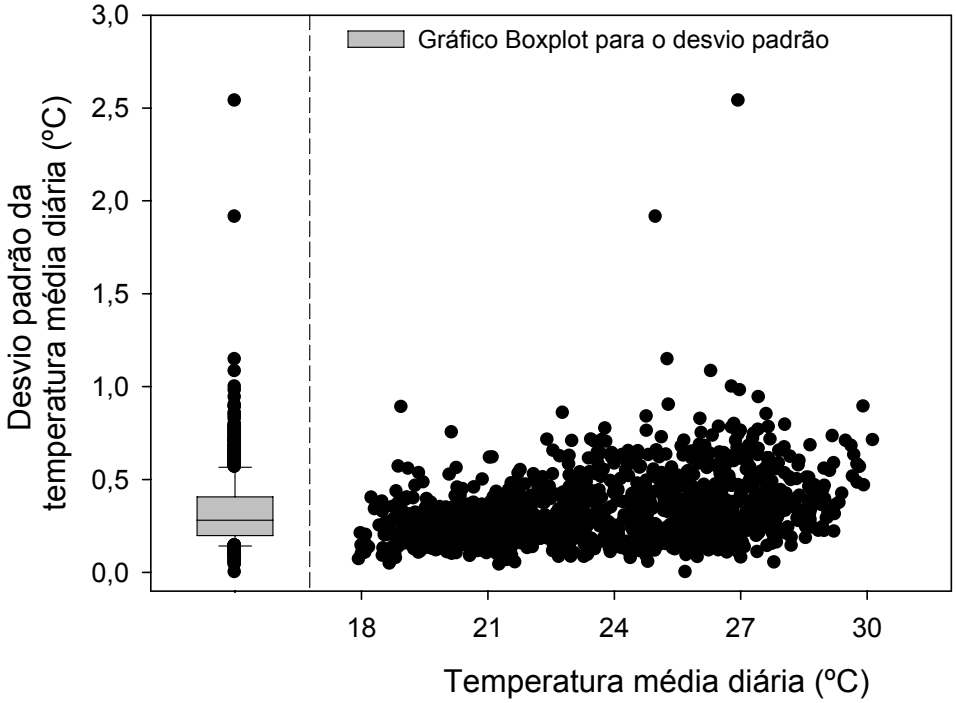


Figura 9. Distribuição da temperatura média diária e do respectivo desvio padrão da água do mar, entre os anos de 2001 e 2004, com um total de 1255 dias.

Por outro lado, os resultados apresentados na Figura 10 sugerem que a média e a variação da temperatura média diária podem ser utilizadas para comparar tanto a temperatura entre as estações do ano, dentro de um determinado ano, como também a temperatura na mesma estação, entre diferentes anos. Como evidenciado na Figura 10, a variação da distribuição da temperatura média diária entre as estações do ano foi maior no outono e na primavera, e menor no inverno e verão.

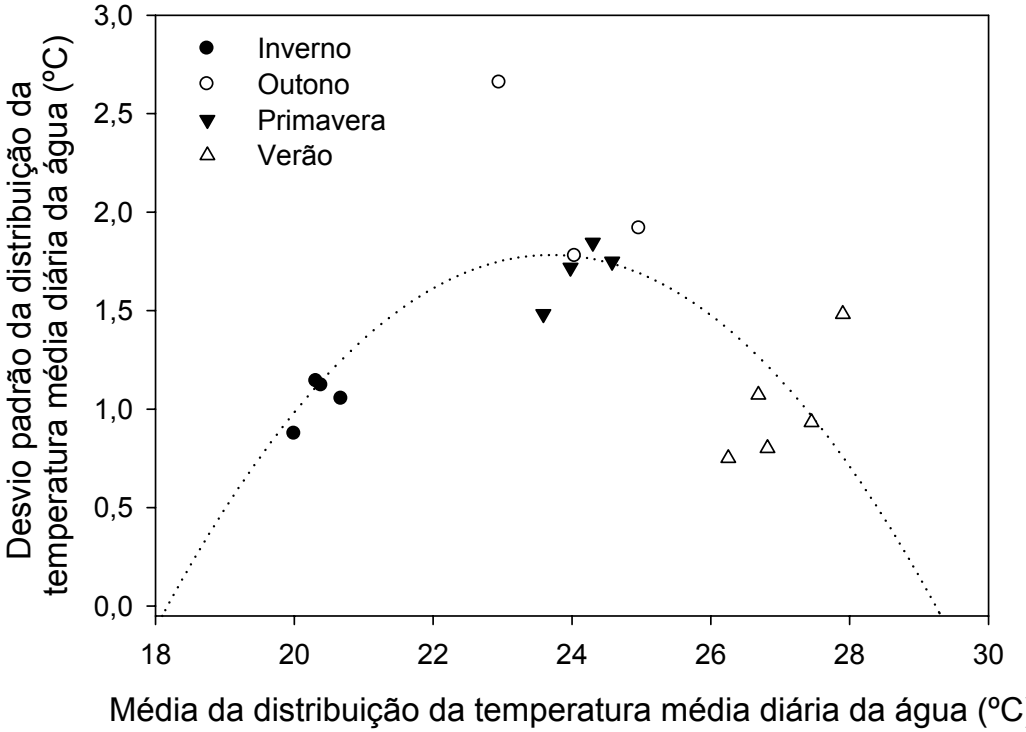


Figura 10. Variação da média e do desvio padrão da distribuição de temperatura média diária nas estações do ano para os anos de 2001 a 2004, no município de Cananéia, SP.

Observa-se, na Figura 10, uma variação anual da média da distribuição de temperatura média diária para cada estação do ano. Estas variações, ano a ano, da média e do desvio padrão da distribuição sazonal da temperatura da água foram representadas pela média, variância e correlação dos dados, observados da temperatura da água do mar, no período entre os anos de 2001 e 2004. A representatividade dos dados relativos às estimativas da variância e da correlação entre a média e o desvio padrão, ao longo dos diferentes anos, foi baixa, principalmente, por causa do número limitado de anos com dados disponíveis da temperatura da água do mar. Apesar de os dados serem pouco representativos, é coerente considerar algum grau de correlação para avaliar o efeito da variação da temperatura da água, entre os anos, sobre a população de Vp no momento do consumo.

Os parâmetros da distribuição sazonal da temperatura da água foram obtidos por amostragem dos dados gerados pela distribuição normal bivariada (Apêndice B) com média (μ), desvio padrão (σ) e correlação, apresentados na Tabela 3. Esses parâmetros foram obtidos pelo método dos momentos que é um método estatístico

utilizado para obter estimativas dos parâmetros de uma distribuição de dados amostrais (Montgomery e Runger, 2003). Estes valores amostrados foram utilizados para caracterizar a variação da distribuição sazonal da temperatura da água, entre os anos, nas simulações para o cálculo da incerteza sobre a estimativa de risco de doença com o modelo proposto.

Tabela 3. Distribuição sazonal da temperatura média diária da água do mar no município de Cananéia, São Paulo, entre os anos de 2001 e 2004.

Estação do ano	Estatística da distribuição da temperatura da água (ºC)				
	Média de μ*	Média de σ**	Variância de μ	Variância de σ	Correlação (μ, σ)
Inverno	20,34	1,05	0,08	0,02	0,61
Outono	23,98	2,12	1,02	0,22	-0,81
Primavera	24,11	1,70	0,18	0,03	0,82
Verão	27,02	1,00	0,43	0,09	0,79

Fonte: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.
*μ é a média da temperatura diária da água do mar em uma estação do ano para um determinado ano.
**σ é o desvio padrão da média da temperatura diária da água do mar em uma estação do ano para um determinado ano.

4.1.1.2. Relação entre a população de *V. parahaemolyticus* em ostras e a temperatura e a salinidade da água do mar

A relação entre a população de Vp em ostras e os parâmetros temperatura e salinidade da água do mar foi quantificada com a utilização dos dados obtidos com a amostragem na etapa de cultivo. Nesta etapa, foram realizadas 21 coletas, com análise de 123 amostras de ostras, e medidas de temperatura e de salinidade da água para cada local em cada coleta.

A incidência de *V. parahaemolyticus* nas amostras estudadas foi de 99,2% (122/123) e sua presença não foi detectada, pela metodologia utilizada, em apenas uma amostra que foi coletada no local de cultivo 5, no dia 11 de agosto de 2004.

Pela análise de correlação de Pearson, observa-se que não há correlação significativa ($r = -0,09$; $P = 0,34$)[3] entre a salinidade da água do mar e a população de Vp em ostras. Porém, com relação à temperatura, verifica-se que há uma

[3] r é o coeficiente de correlação de Pearson; *P* é a probabilidade associada ao teste de correlação, ou seja, se *P* for menor que 0,05 a correlação é significativa (Vose, 2000; SAS Institute, 2003).

correlação significativa com a população de Vp (r = 0,48; *P* <0,001). Para a estimativa da equação de regressão linear, foi assumido, para a amostra na qual não se detectou o microrganismo com a metodologia empregada, uma população de Vp menor (metade) do que o limite de detecção do método usado.

A análise de regressão do conjunto de dados indicou, para a amplitude de valores medidos, que a salinidade não apresenta parâmetros significativos nem para o efeito linear nem para o quadrático, como evidenciado na Figura 11. Para a temperatura, o parâmetro do efeito linear foi significativo, enquanto o do efeito quadrático foi não significativo. Por fim, o modelo de regressão linear que melhor se ajusta aos dados é o apresentado na Tabela 4 e Figura 12. O procedimento REG do SAS (SAS Institute, 2003), foi utilizado para obter as estimativas dos parâmetros do modelo de regressão.

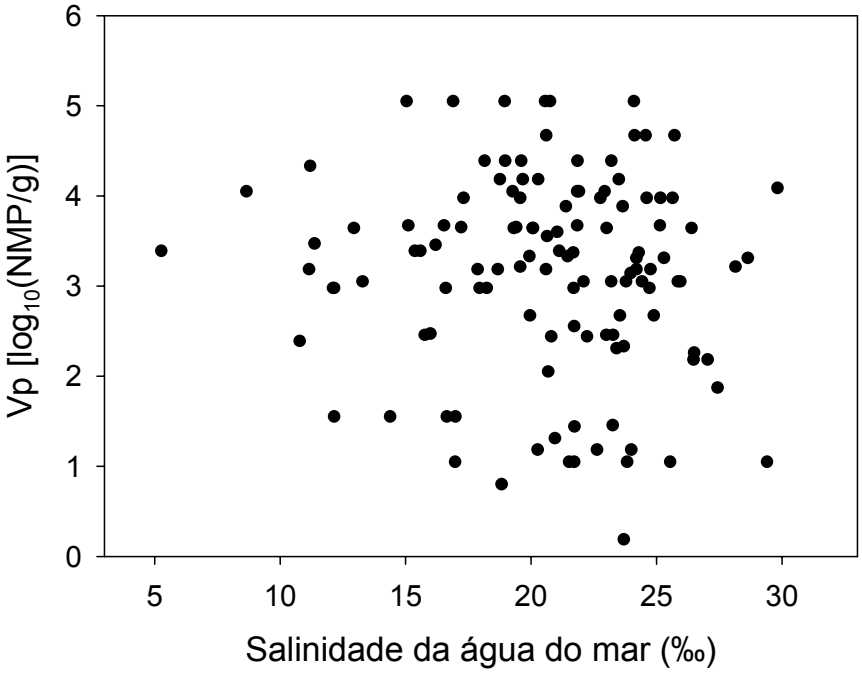


Figura 11. Distribuição da população de *V. parahaemolyticus* em ostras em função da salinidade da água do mar.

Tabela 4. Estimativa dos coeficientes do modelo* de regressão linear de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura da água do mar (Tágua).

Parâmetros	Coeficientes	Intervalo de Confiança (95%)
β	-0,944	(-2,306; 0,418)
α	0,175	(0,117; 0,233)
σ	0,971	-

*Modelo: $\log_{10}(NMP/g) = \beta + \alpha * Tágua + \varepsilon$; em que ε tem distribuição Normal$(0;\sigma^2)$.

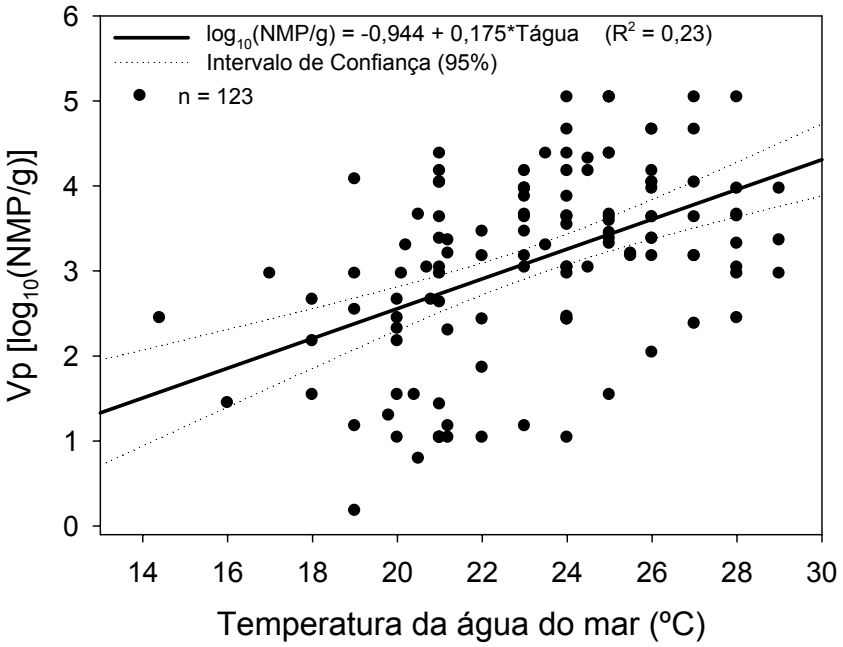


Figura 12. Ajuste do modelo de regressão da população de *V. parahaemolyticus* em ostras em função da temperatura da água do mar.

Apesar do baixo valor para R^2 (0,23), o resultado do teste para a falta de ajuste do modelo foi não significativo, o que indica que o modelo de regressão linear proposto é adequado para expressar a população de Vp, em log(NMP/g), em função da temperatura da água.

A variável temperatura da água explica muito pouco a variação total observada na população de Vp em ostras (o R^2 é baixo), certamente, devido a outros fatores existentes, não medidos, que também influenciam a população de Vp em ostras, inclusive a presença de outros microrganismos. Considerando a variação da população de Vp, observada nos dados, que é explicada pela temperatura (soma de quadrados), ao invés da variação total, o valor do coeficiente de determinação para o modelo proposto é de 0,63.

O cálculo do coeficiente de determinação (R^2) para o modelo leva em consideração a variabilidade total observada na população de Vp em ostras incluindo, por conseguinte, a variabilidade atribuída ou explicada por outros fatores não avaliados. Desta forma, a porcentagem da variação observada na população de Vp, que é explicada pelo modelo de regressão descrito acima, e mostrado na Figura 12, está subestimada.

Considerando os parâmetros apresentados na Tabela 4 e o ajustamento significativo da equação de regressão (Figura 12), optou-se por utilizá-lo para expressar a relação entre a população de Vp em ostras e a temperatura da água do mar, uma vez que este modelo fornece uma estimativa da variabilidade envolvida com os fatores não avaliados que influenciam a população de Vp.

A incerteza do ajuste da equação de regressão sobre a estimativa do risco de ocorrência de doença foi implementada com a utilização de uma distribuição de valores dos parâmetros obtida, por aproximação, de uma distribuição normal multivariada dos parâmetros. Esta abordagem foi necessária em conseqüência da forte correlação (r = 0,99) entre os parâmetros α e β da equação apresentada na Tabela 4.

O efeito desta incerteza sobre a estimativa da probabilidade de ocorrência de doença foi implementado nas simulações de Monte Carlo e obteve-se, para cada simulação do modelo, uma amostra de valores dos parâmetros de um conjunto de 1000 valores, obtidos pela distribuição normal multivariada (Apêndice B), com o uso da matriz de variância-covariância apresentada na Tabela 5 e as estimativas dos parâmetros mostradas na Tabela 4.

Tabela 5. Matriz de variância-covariância estimada para os coeficientes do modelo de regressão linear de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura da água do mar.

Parâmetros	β	α	σ
β	0,4658	-0,1970	10^{-12}
α	-0,1970	0,0008	-10^{-13}
σ	10^{-12}	-10^{-13}	0,004

4.1.1.3. Estimativa da distribuição da porcentagem da população de *V. parahaemolyticus* patogênico

A incidência de Vp potencialmente patogênico (Kanagawa positiva) foi de 0,8% (1/123) nas amostras de ostras analisadas e de 0,044% (1/2243) em relação aos isolados de Vp analisados. A população estimada foi de 3 NMP/g. Este mesmo isolado expressou resultado positivo para a produção da enzima uréase no sistema API 20E.

A distribuição da porcentagem de isolados Vp patogênico em relação a Vp total foi estimada supondo que as populações de isolados de Vp patogênico nas amostras seguem um modelo Beta-Binomial[4] em relação à população de Vp total (patogênico e não patogênico). Este modelo foi escolhido por causa da baixa população de Vp patogênico encontrado em ostras e à alta freqüência de amostras com níveis não detectáveis de Vp patogênico. A distribuição Beta-Binomial é uma distribuição freqüentemente utilizada para modelar a variação aleatória de uma prevalência, fração ou proporção.

Considerando o modelo Beta-Binomial, assume-se que a quantidade de isolados Vp patogênico observada em uma determinada amostra pertence a uma distribuição Binomial com o parâmetro n igual à quantidade total de isolados de Vp (patogênico e não patogênico), detectada na amostra. O parâmetro probabilidade (p) da distribuição binomial de Vp patogênico varia aleatoriamente de acordo com uma distribuição Beta com parâmetros α e β (Vose, 2000).

A detecção de uma única cepa de Vp patogênico não é suficiente para estimar com precisão os parâmetros da distribuição Beta e, portanto, para caracterizar o modelo Beta-Binomial a partir dos dados experimentais. Uma estimativa da porcentagem de isolados de Vp patogênico em relação a isolados de Vp total pode ser obtida calculando-se a porcentagem de Vp patogênico em cada amostra e, em seguida, estimar a média e a variância entre as amostras. Isto resulta em uma porcentagem média de 0,034% e variância de 0,002%, com a obtenção dos valores 0,09 e 263, para α e β, respectivamente. Esta estimativa não é muito exata, pois é mais influenciada pela suposição da distribuição Beta do que pelos dados em si (Bowers, 2007).

Outro método para se obter uma estimativa da distribuição da probabilidade de Vp patogênico é por meio da estatística Bayesiana em que a distribuição Beta para a probabilidade (p) pode ser expressa por Beta(s+1;n-s+1), sendo s o número de isolados de Vp patogênico detectado e n o número total de isolados de Vp testado (Vose, 2000; FAO e WHO, 2002).

Assim, a porcentagem de isolados de Vp patogênico foi estimada como uma distribuição Beta(s+1;n-s+1) com parâmetro s igual a 1 e n igual 2243, obtendo-se

[4] A distribuição Beta-binomial é uma distribuição Binomial (parâmetros n, p) em que a probabilidade de sucesso (parâmetro p) possui distribuição beta, ou seja, Beta-binomial (n, α, β) = Binomial (n, p) onde p = Beta(α, β). Maiores informações podem ser obtidas em Vose (2000).

uma estimativa média da porcentagem de isolados de Vp patogênico de 0,089% em relação ao número total de isolados de Vp.

Nota-se que a média da porcentagem de Vp patogênico, estimada pela distribuição, é o dobro da incidência detectada nos isolados analisados (0,044%), o que, a princípio, reflete uma superestimativa da porcentagem de Vp patogênico. No entanto, a incidência detectada entre o total de isolados (0,044%) pode ser apenas um dos valores possíveis para a porcentagem de Vp patogênico da distribuição estimada, o que pode ser verificado por meio do cálculo do intervalo de confiança para a média da distribuição.

A Figura 13 mostra as distribuições estimadas para a porcentagem de Vp patogênico Beta(s+1;n-s+1), Beta(s; n-s) e a distribuição Beta(0,09; 263).

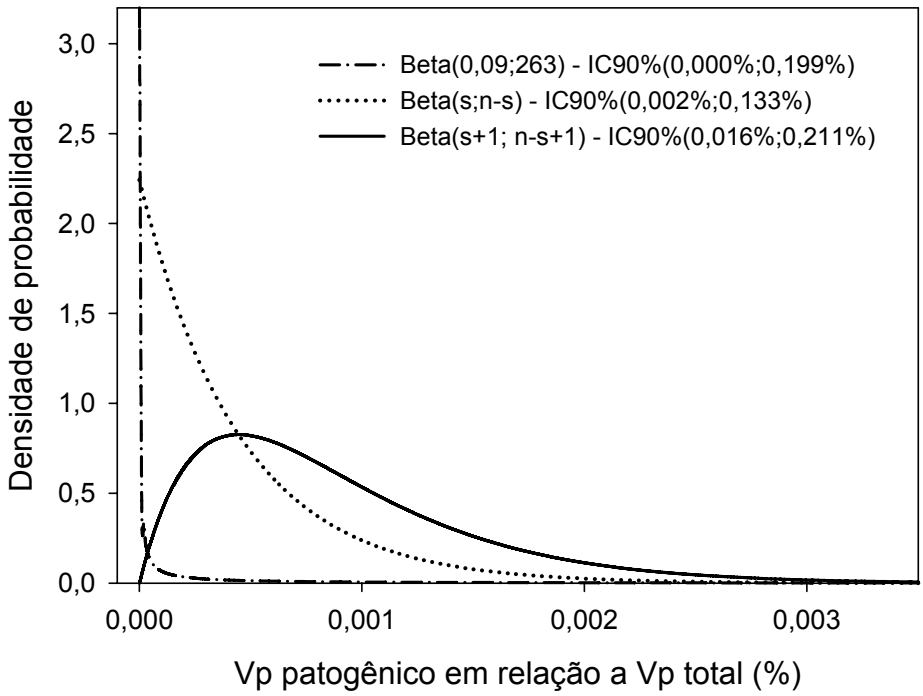


Figura 13. Distribuição da porcentagem de isolados patogênicos de *V. parahaemolyticus*.

4.1.1.4. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras no momento nos locais de cultivo

Para obter os resultados da etapa de cultivo, foram utilizadas a distribuição da temperatura da água do mar, apresentada na Tabela 3, e a equação de regressão

para os isolados de Vp total em função da temperatura da água do mar, que se encontra na Tabela 4.

A população de Vp, nas amostras analisadas, segue uma distribuição normal, estatisticamente significativa, durante o verão, o inverno e a primavera. Apesar de o ajuste não ter sido significativo no outono, considerou-se que a população de Vp também seguiu uma distribuição normal. Os parâmetros da distribuição normal para cada estação do ano podem ser observados na Tabela 6. A única amostra positiva para Vp patogênico, detectada no inverno, teve população estimada em 0,48 $\log_{10}$(NMP/g). Nas demais estações do ano, a estimativa da população foi menor do que o limite de detecção do método utilizado (0,48 $\log_{10}$(NMP/g)).

Tabela 6. População sazonal de *V. parahaemolyticus* em 123 amostras de ostras analisadas na etapa de cultivo, coletadas em Cananéia, SP.

	População de *V. parahaemolyticus* em $\log_{10}$(NMP/g)			
Estação do ano	N	Média	Desvio padrão	IC (95%)
Inverno	35	2,44	1,06	(0,69; 4,19)
Outono	35	3,48	1,01	(1,82; 5,15)
Primavera	29	3,26	1,17	(1,34; 5,18)
Verão	24	3,47	0,75	(2,24; 4,70)

N = número amostras analisadas entre maio de 2004 e junho de 2005.
IC (95%) = Intervalo de Confiança de 95% para a média.

A distribuição da população de Vp total em ostras no cultivo, obtida por simulação, é determinada com a substituição dos valores da distribuição de temperatura da água do mar (Figura 8) na equação de regressão apresentada na Figura 12 ou Tabela 4. Observam-se, na Tabela 7, os resultados da etapa de cultivo para a distribuição da população de *V. parahaemolyticus,* no momento da coleta, para cada estação do ano, obtida por simulação pelo método de Monte Carlo, com 5000 iterações.

Tabela 7. Estimativa da população sazonal de *V. parahaemolyticus*, total de isolados e isolados patogênicos, em ostras *(Crassostrea brasiliana)* na etapa de cultivo, obtidas por simulação de Monte Carlo, com 5000 iterações.

	População de *V. parahaemolyticus* em log_{10}(NMP/g)	
Estação do ano	Média Vp total*	Média Vp patogênico*
Inverno	2,62 (0,99)	-0,55 (1,05)
Outono	3,25 (1,06)	0,09 (1,09)
Primavera	3,28 (1,02)	0,11 (1,07)
Verão	3,80 (0,99)	0,62 (1,05)

* Valores em parênteses representam o desvio-padrão.

As Figuras 14 a 17 mostram um comparativo entre a distribuição da população de *V. parahaemolyticus* ajustada aos dados experimentais e a distribuição obtida por simulação.

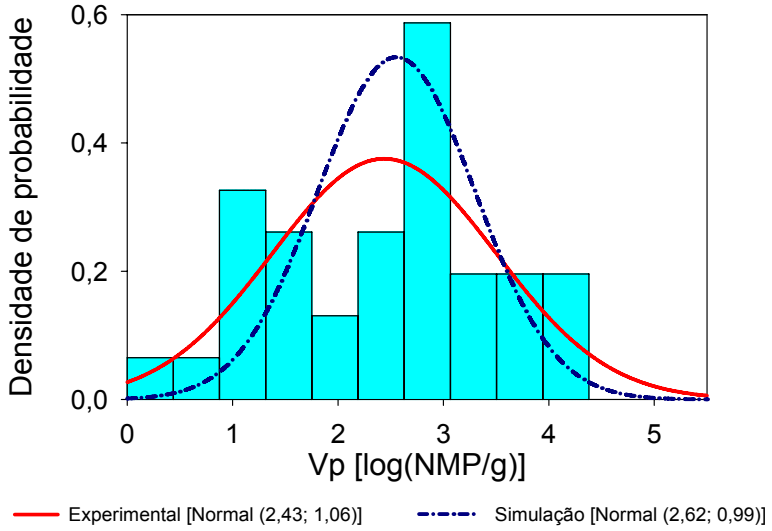


Figura 14. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante o inverno.

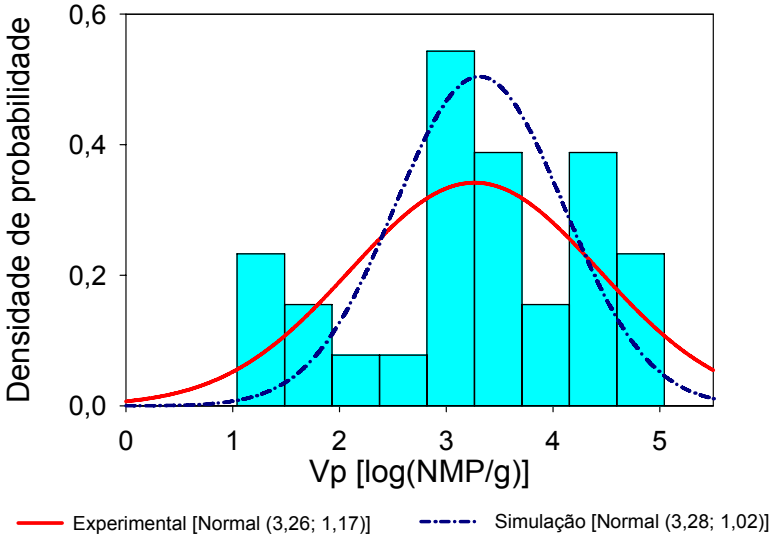


Figura 15. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante a primavera.

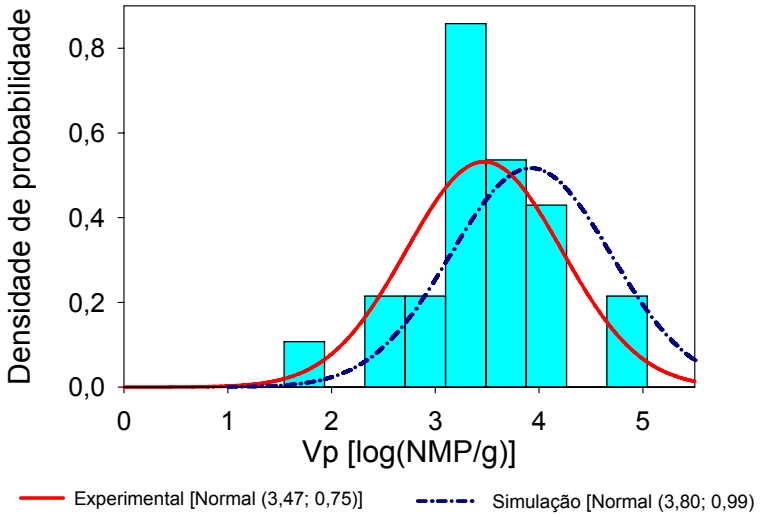


Figura 16. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante o verão.

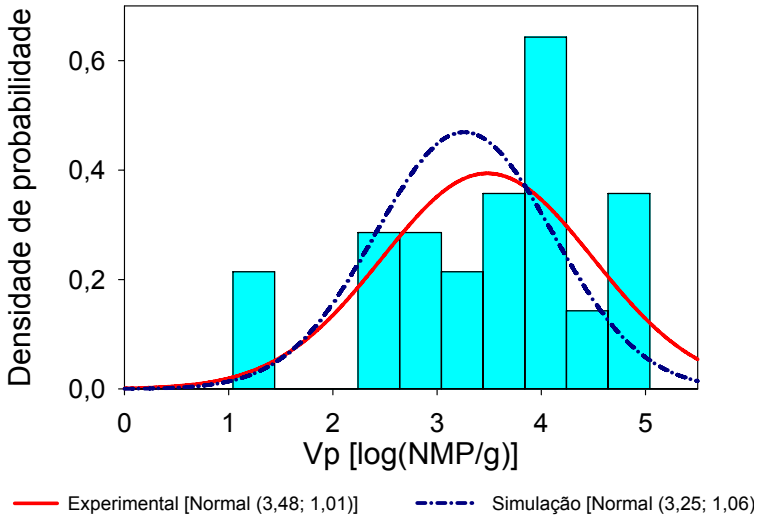


Figura 17. Estimativa da população de *V. parahaemolyticus* em ostras na etapa de cultivo durante o outono.

As populações de *V. parahaemolyticus* na primavera e no outono foram semelhantes, e o mesmo foi observado para a distribuição média da temperatura da água do mar. A maior média da população de *V. parahaemolyticus* foi observada no verão, sendo 1,2 log maior que a média verificada no inverno.

As populações de *V. parahaemolyticus* observadas com maior freqüência (~60%) estiveram na faixa entre 2 e 4 log (NMP/g), enquanto populações de *V. parahaemolyticus* em ostras acima de 4 log (NMP/g) foram detectadas em 20% das amostras e em temperaturas da água do mar superiores a 23ºC (Figura 18).

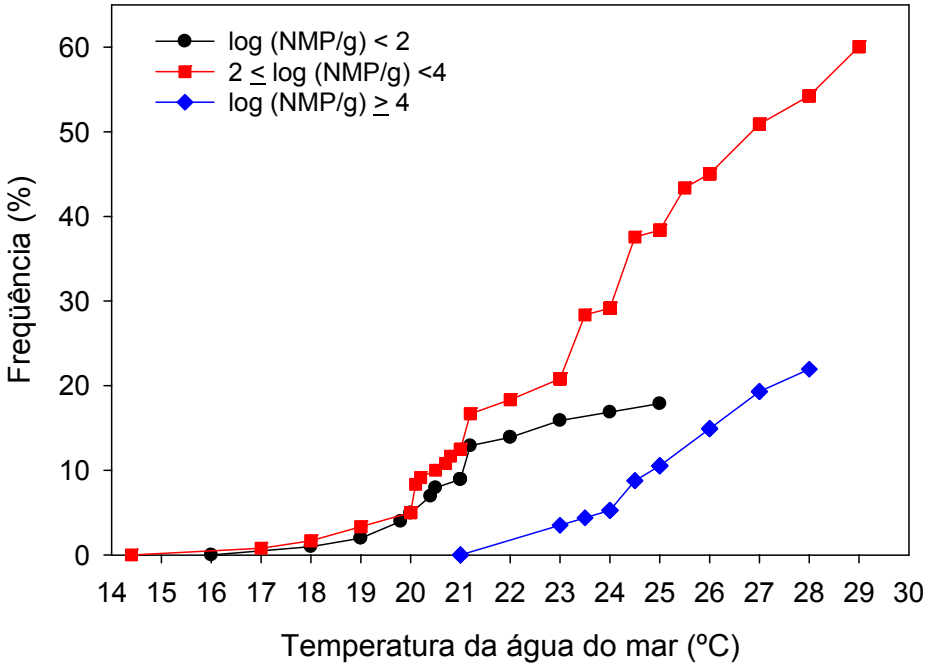


Figura 18. Freqüência da população de *V. parahaemolyticus* em função da temperatura da água no momento da coleta.

4.1.2. Resultados da avaliação da exposição na etapa pós-coleta

A etapa pós-coleta avalia os efeitos das práticas da indústria durante o transporte, o processo de depuração, a distribuição e a estocagem, do local de cultivo até o ponto de comercialização, sobre a população de *V. parahaemolyticus* em ostras. Fatores como a temperatura do ar no momento da coleta, as condições de estocagem durante a coleta, o tempo decorrido entre a coleta e a chegada à indústria, o processo de depuração realizado e as condições de transporte até o ponto de comercialização influenciam a população de *V. parahaemolyticus* em ostras por meio da sua multiplicação ou inativação. O objetivo de modelar a etapa pós-coleta é simular os efeitos dos fatores citados sobre a população de Vp em ostras, para cada estação do ano.

A multiplicação de Vp, que pode ocorrer no período compreendido entre a coleta das amostras, no local de cultivo, até a sua chegada no comércio, é influenciada pelo tempo de coleta, pela temperatura da ostra durante o transporte, pela taxa de multiplicação de Vp em ostras em função da temperatura e pelo processo de depuração. A temperatura é o fator extrínseco mais variável durante o transporte. Assume-se que a temperatura da ostra durante o transporte seja a

mesma observada para o ar, uma vez que são transportadas expostas ao ar e o equilíbrio de temperatura é estabelecido rapidamente.

Outras suposições feitas na etapa pós-coleta:

- A relação entre a taxa de multiplicação de Vp em ostras e a taxa de multiplicação em caldo de cultivo é independente da temperatura;
- A taxa de multiplicação de Vp em ostras, após a coleta, é a mesma para cepas patogênicas e não patogênicas;
- A temperatura ambiente representa a temperatura das ostras após a coleta na água;
- A temperatura média diária do ar no município de Cananéia, SP, representa bem a temperatura ambiental em que as ostras são expostas após a coleta;
- A população máxima de Vp em ostras, em qualquer temperatura, é de 7 $\log_{10}$(NMP/g), com base em nossos resultados e nos de Gelli et al. (1979).

4.1.2.1. Condições de transporte das ostras dos locais de cultivo até a indústria

As ostras são coletadas e transportadas em temperatura ambiente, geralmente, sob o abrigo do sol. Portanto, não foram consideradas as alterações na multiplicação de Vp em ostras expostas à luz solar, a qual promove um aumento da temperatura da ostra em relação à temperatura do ar ambiente.

O tempo decorrido entre o início da coleta das ostras e a chegada à planta de depuração, mais especificamente o momento da disposição das ostras no tanque de depuração, foi avaliado por meio de entrevistas e acompanhamentos pontuais da coleta de ostras por parte da indústria. Esse tempo depende da embarcação utilizada para transporte, do local a ser coletado e da oscilação da maré.

Observou-se que o tempo mínimo entre a coleta e a depuração é de 2 horas, o máximo de 8 horas e o mais provável de 4 horas. A distribuição do tempo de transporte de ostras à indústria foi definida como uma distribuição Pert(2;4;8)[5], uma vez que esta distribuição representa, de maneira adequada, dados desta natureza

[5] Essa é uma versão da distribuição Beta e requer os mesmos 3 parâmetros da distribuição triangular, isto é, o mínimo, o mais provável e o máximo. É usada para modelar a opinião de especialistas. Mais detalhes em Vose (2000) e Palisade Corporation (2005).

(Vose, 2000). Considerou-se que a distribuição do tempo de coleta foi a mesma para todas as estações do ano (Figura 19).

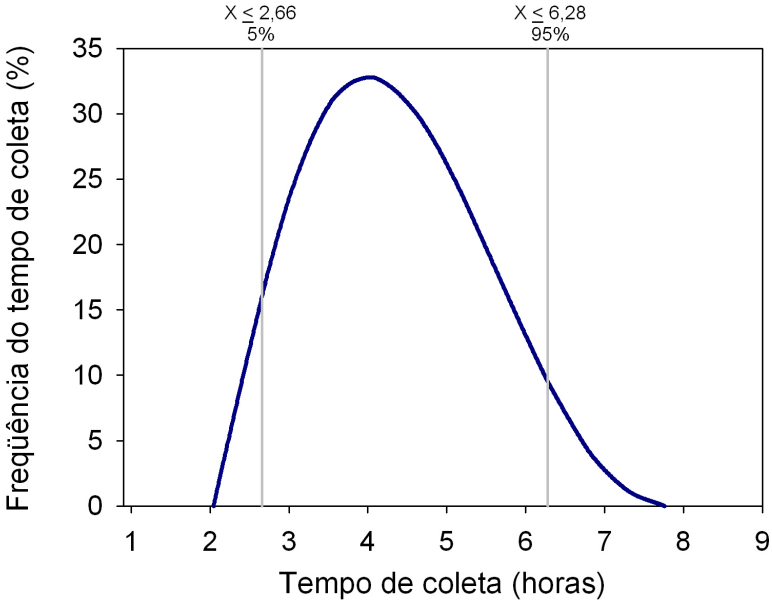


Figura 19. Distribuição de probabilidade para o tempo de coleta de ostras.

4.1.2.2. Taxa de multiplicação de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras

Existem poucos estudos sobre a taxa de multiplicação de Vp em ostras em função da temperatura. Estes dados encontram-se, basicamente, concentrados na publicação de Gooch et al. (2002). Miles et al. (1997), por outro lado, estudaram a taxa de multiplicação de quatro cepas de Vp em caldo de cultivo em diferentes temperaturas e atividade de água. Estes estudos foram utilizados no modelo de avaliação de risco desenvolvido pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (United States, 2005b).

Foi assumido, na presente pesquisa, que a atividade de água em ostras não varia significativamente em relação à faixa ótima (0,982 a 0,987) prevista por Miles et al. (1997), em condições de cultivo em caldo de cultura. Nesta faixa de atividade de água, esses autores observaram uma taxa de multiplicação de Vp, a 26 ºC, de 0,84 log (UFC) por hora. Este valor é, aproximadamente, quatro vezes maior do que o observado por Gooch et al. (2002), para a multiplicação de Vp em ostras a 26ºC (United States, 2005b).

Para cada combinação temperatura e atividade de água, Miles et al. (1997), modelaram a extensão de multiplicação observada usando a função de Gompertz e

obtiveram uma estimativa da taxa máxima de multiplicação. O modelo assumido por Miles et al. (1997) foi:

$$\sqrt{\mu_m} = \frac{b \times \left(T - T_{mim}\right) \times \left[\left\{1 - \exp\left(c \times \left(T - T_{máx}\right)\right)\right\} \times \sqrt{\left(a_w - a_{w,mim}\right) \times \left[1 - \exp\left(d \times \left(a_w - a_{w,máx}\right)\right)\right]}\right]}{\sqrt{\ln(10)}}$$

em que μ_m é a taxa máxima de multiplicação, a_w é a atividade de água e T é a temperatura em graus Kelvin.

As estimativas dos parâmetros obtidas são: b = 0,0356; c = 0,34; T_{min} = 278,5; $T_{máx}$ = 319,6; $a_{w,min}$ = 0,921; $a_{w,máx}$ = 0,998; com média a_w = 0,985; d = 263,64. Os valores de temperatura e de atividade de água indicam a amplitude em que a multiplicação pode ocorrer.

Vale ressaltar que a taxa de multiplicação de Vp em ostras pode ser influenciada pelo estado fisiológico do animal, a composição dos seus tecidos e pela presença de competidores que podem variar, consideravelmente, dependendo do local de cultivo.

No modelo (Apêndice A), a taxa máxima de multiplicação de Vp em ostras foi considerada como uma variável de incerteza modelada como uma distribuição triangular com valor mais provável de um quarto, mínimo de um quinto e máximo de um terço da taxa máxima de multiplicação, em caldo de cultura a 26ºC (Miles et al., 1997). A partir dessa distribuição, foi gerado um conjunto de 1000 valores (Apêndice B) que foram utilizados para quantificar a incerteza sobre o risco de ocorrência de doença. Na análise da variabilidade do modelo, o valor considerado para a taxa de multiplicação de Vp em ostras foi de 22% do valor máximo obtido em caldo, como observado por Gooch et al. (2002). Foi assumido que o ciclo de multiplicação de Vp em ostras, durante a exposição ao ar, não inclui a fase lag, uma vez que as mudanças no ambiente por serem graduais não reduzem a taxa de multiplicação ou induzem a uma fase lag.

4.1.2.3. Distribuição da temperatura do ar no município de Cananéia

A capacidade de multiplicação de Vp em ostras, durante o período de transporte até a indústria, é uma função da temperatura do ar a que são expostas.

Por isso, foi assumido que a temperatura do músculo da ostra atinge rapidamente o equilíbrio com a temperatura do ar à qual está exposta. Portanto, os dados da temperatura do ar foram considerados como representativos da temperatura da ostra durante o transporte do local de cultivo até a indústria, por causa da limitação de dados da temperatura em ostras sob condições ambientais de transporte.

Pela análise dos dados obtidos, foi observada uma correlação entre a temperatura do ar e a da água. Esta correlação foi incorporada ao modelo, com a utilização da distribuição da diferença entre as temperaturas da água e a do ar que foram obtidas simultaneamente. Esta diferença entre a temperatura do ar e a da água foi bem caracterizada por uma distribuição normal, cujos parâmetros foram distintos para cada estação do ano (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição sazonal da diferença entre a temperatura média diária do ar e a temperatura média da água do mar, no município de Cananéia, SP, de 2001 a 2004.

	Distribuição média da diferença (ºC)		
Estação do ano	Média	Desvio padrão	IC (95%)
Inverno	-1,49	2,47	(-5,56; 2,58)
Outono	-1,96	2,32	(-5,78; 1,87)
Primavera	-1,48	2,09	(-4,93; 1,96)
Verão	-1,98	2,02	(-5,31; 1,35)

IC (95%) = Intervalo de Confiança de 95% para a média.
Fonte: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

Para simplificação do modelo, usou-se como parâmetro a distribuição da diferença entre a temperatura da água e a temperatura do ar. Esta diferença e a distribuição da temperatura da água do mar foram utilizadas para determinar a distribuição da temperatura do ar em que as ostras são expostas durante a coleta. Esta aproximação foi adotada a fim de assegurar uma correlação apropriada entre a temperatura da água e a temperatura do ar.

Foi observado o mesmo perfil de correlação entre a temperatura do ar e a temperatura da água, em cada estação do ano, ao longo dos anos avaliados. Por isso, a distribuição sazonal da diferença entre a temperatura do ar e a da água do mar foi obtida considerando os dados de todos os anos. A distribuição da diferença sazonal de temperatura foi aproximada por uma distribuição normal com ajuste

significativo para o verão e o outono, e aproximada para a primavera e o inverno (Figuras 20 a 23).

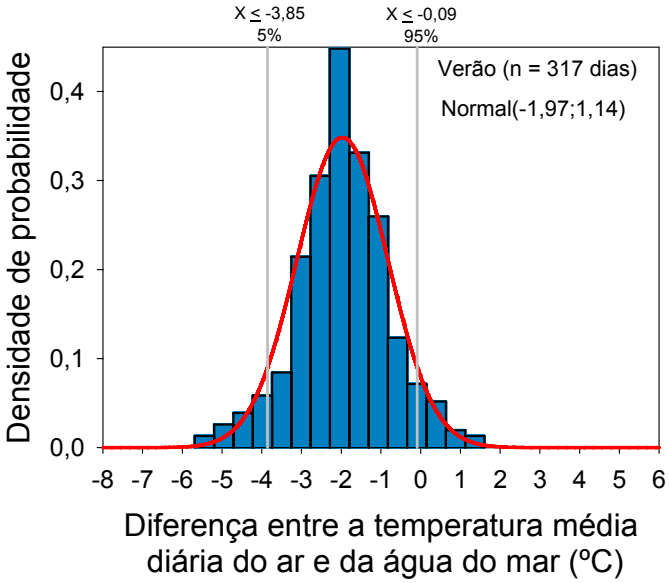


Figura 20. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004, no verão.

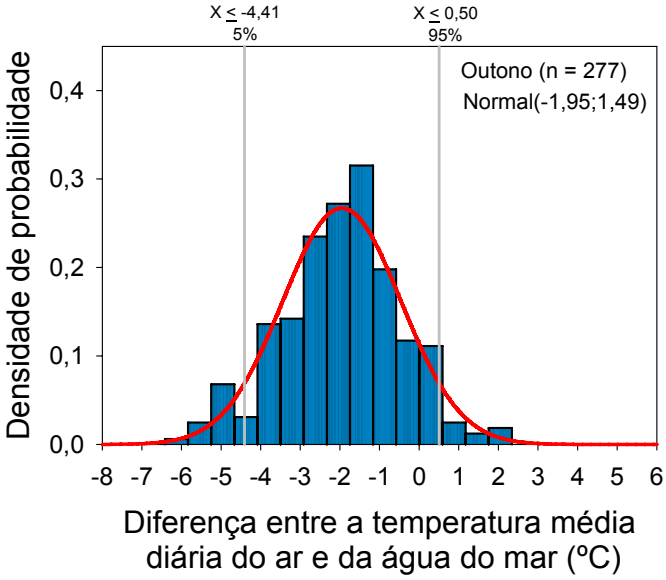


Figura 21. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004, no outono.

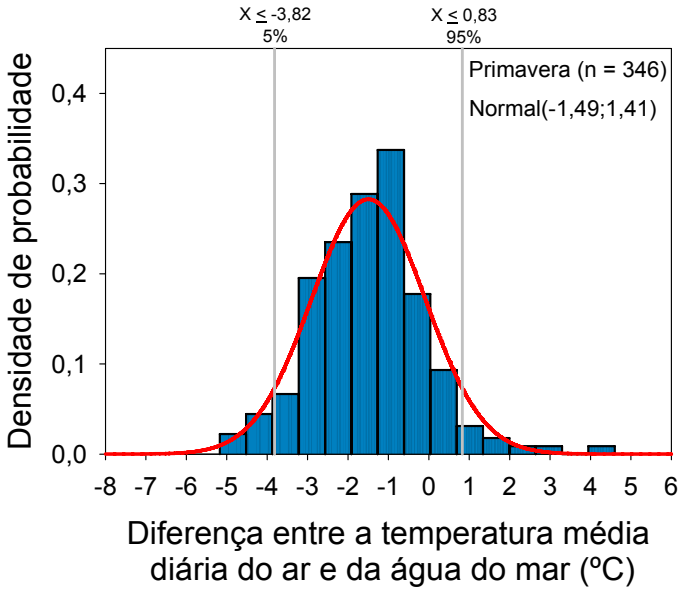


Figura 22. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP, entre os anos de 2001 e 2004, na primavera.

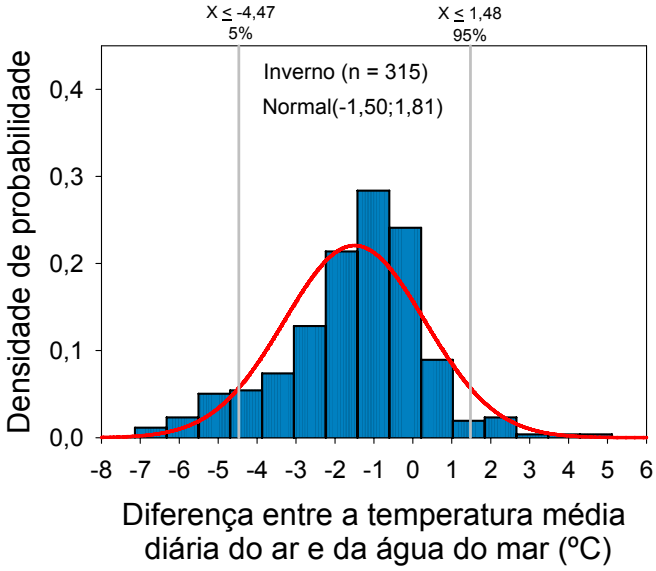


Figura 23. Distribuição da diferença, em ºC, entre a temperatura média diária do ar e a temperatura da água do mar, no município de Cananéia, SP entre os anos de 2001 e 2004, no inverno.

4.1.2.4. Influência do processo de depuração na população de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras

Estudos realizados com ostras contaminadas artificialmente com *Vibrio* spp. demonstraram a eficiência do processo de depuração na redução da população microbiana (Croci et al., 2002). Entretanto, no caso de contaminação natural, *Vibrio* spp. pode ser mais resistente aos efeitos da depuração, podendo ocorrer até mesmo o aumento da população após o processo, como relatado por Eyles e Davey, (1984); Murphree e Tamplin, (1991) e Ristori (2001).

Segundo Eyles e Davey (1984), Richards (1988) e Lopes (2001), o processo de depuração comercial tem pouca influência sobre a persistência e a concentração de *Vibrio* spp. em ostras.

Uma das empresas, em nosso estudo, que aqui será denominada A, utiliza um sistema de depuração com luz ultravioleta composto de um filtro de areia e um conjunto de 4 lâmpadas de 40 W cada. A água do mar é bombeada para um tanque. Desse tanque, ela passa por filtros de areia e, em seguida, por um conjunto de lâmpadas UV. Após esta etapa, a água vai para o tanque de depuração. O sistema não é de fluxo contínuo e não possui recirculação da água. O tanque de depuração localiza-se em ambiente coberto e arejado e o tempo do processo é, em média, de 3 a 4 horas. A temperatura e salinidade da água não são controladas. No período de coleta de amostras, a temperatura variou de 21 a 26ºC, enquanto a salinidade oscilou entre 2,3 e 2,7%.

A média da população de *V. parahaemolyticus* em ostras depuradas na empresa A foi de 3,3 $\log_{10}$(NMP/g) e em ostras não depuradas foi de 3,27 $\log_{10}$(NMP/g). Estatisticamente não há diferença significativa entre essas populações, com base na análise de variância (teste F), considerando cada coleta como um bloco.

A empresa B utiliza ozônio na desinfecção da água. Nesta empresa, há um sistema composto por 3 tanques: o primeiro armazena água do mar, o segundo é utilizado para incorporar o ozônio à água e no terceiro é realizado o processo de depuração. Inicialmente, promove-se a circulação de água doce para facilitar a eliminação de um parasito (poliqueta *Polydora* sp.) muito comum na área de cultivo. Em seguida, a água do mar é bombeada do primeiro tanque, passando por um sistema de filtração com caixa de areia. A incorporação de ozônio à água ocorre no segundo tanque. O sistema possui circulação de água e o tempo de tratamento é de

4 a 5 horas. Assim como no processo de depuração da empresa A, neste processo não se controla a temperatura e a salinidade. No período das coletas, a temperatura variou de 22 a 28ºC, enquanto a salinidade oscilou de 1,8 a 2,4%.

A média da população de Vp em ostras depuradas da empresa B foi de 3,42 $\log_{10}$(NMP/g) e em ostras não depuradas foi de 4,14 $\log_{10}$(NMP/g). Assim como para o caso anterior, estatisticamente, não há diferença significativa entre as populações de *V. parahaemolyticus* em ostras antes e depois da depuração, com base na análise de variância (teste F), considerando cada coleta como um bloco.

Os resultados mostram que os processos de depuração de ostras utilizados pelas indústrias não têm influência sobre a população de *Vibrio parahaemolyticus* nas ostras cultivadas na região de Cananéia.

Em razão do pequeno número de amostras analisadas, o método de *bootstrap* não paramétrico foi utilizado para caracterizar a distribuição do efeito dos processos de depuração empregados pela indústria. Foi criado um modelo que seleciona, de forma aleatória e uniforme, um valor da população de Vp dentre as amostras de ostras depuradas e subtrai de outro valor selecionado das amostras não depuradas, gerando assim uma distribuição da diferença ou redução na população de Vp obtida com o processo de depuração. Este procedimento de seleção foi repetido 1000 vezes. Em decorrência, tem-se uma distribuição do efeito do processo de depuração empregado por cada indústria. Os resultados são apresentados na Tabela 9 e Figura 24.

Para utilização no modelo, o efeito do processo de depuração foi modelado com uma distribuição discreta dos efeitos dos dois processos de depuração com igual probabilidade de ocorrência, chamada de distribuição conjunta (Figura 24).

Tabela 9. Estimativa da distribuição da redução na população de Vp em ostras, obtida pelos diferentes processos de depuração.

Processo de depuração	Parâmetros da distribuição [$\log_{10}$(NMP/g)]		
	Média	Desvio padrão	IC (95%)*
Ozônio	-0,72	0,39	(-1,37; -0,08)
Luz Ultravioleta	0,03	0,35	(-0,53; 0,65)
Distribuição conjunta	-0,34	0,53	(-1,22; 0,46)

*IC (95%) = Intervalo de Confiança de 95% para a média.

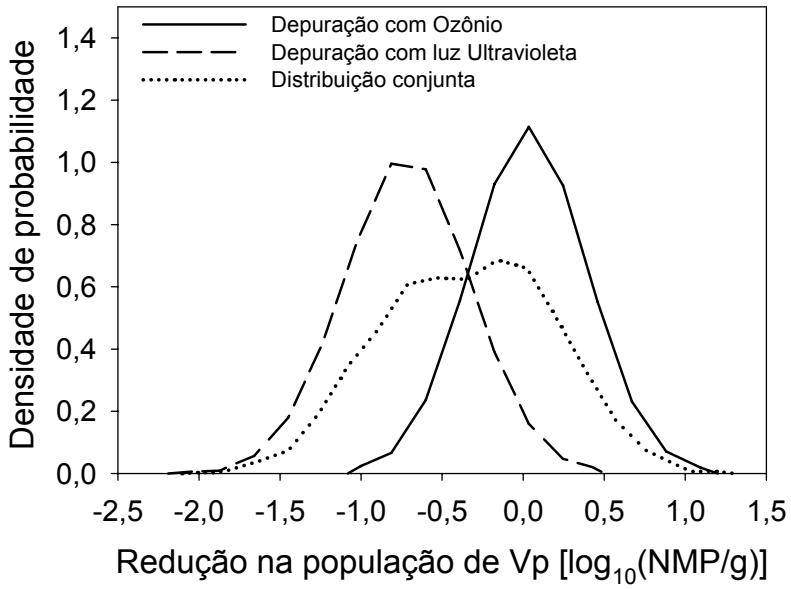


Figura 24. Distribuição da redução da população de *V. parahaemolyticus* em ostras obtida com os processos de depuração.

4.1.2.5. Influência das condições de transporte da indústria ao comércio sobre a população de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras

O transporte das ostras até os pontos de venda é realizado em carro tipo furgão, sob temperatura de refrigeração ou ambiente, dependendo da distância a percorrer e da empresa responsável. A temperatura, durante o transporte, foi monitorada por registradores de temperatura colocados nos veículos de transporte de ostras das empresas pesquisadas. O tempo de transporte foi estimado considerando a freqüência dos locais de entrega e por meio de entrevista com os responsáveis pelas entregas dos pedidos.

O monitoramento da temperatura interna do veículo de transporte para as ostras da empresa A foi realizado a cada 15 minutos, durante 12 semanas e, para as ostras da empresa B, durante 13 semanas. Observa-se pelas Figuras 25 e 26 que as distribuições da temperatura de transporte entre as duas empresas são similares. Além disso, os valores de temperatura durante o período de monitoramento estiveram sempre acima de 10ºC, exceto no período entre duas e nove horas da manhã do dia 06 de setembro de 2006, quando foram registradas temperaturas de 8,5 e 9,0ºC.

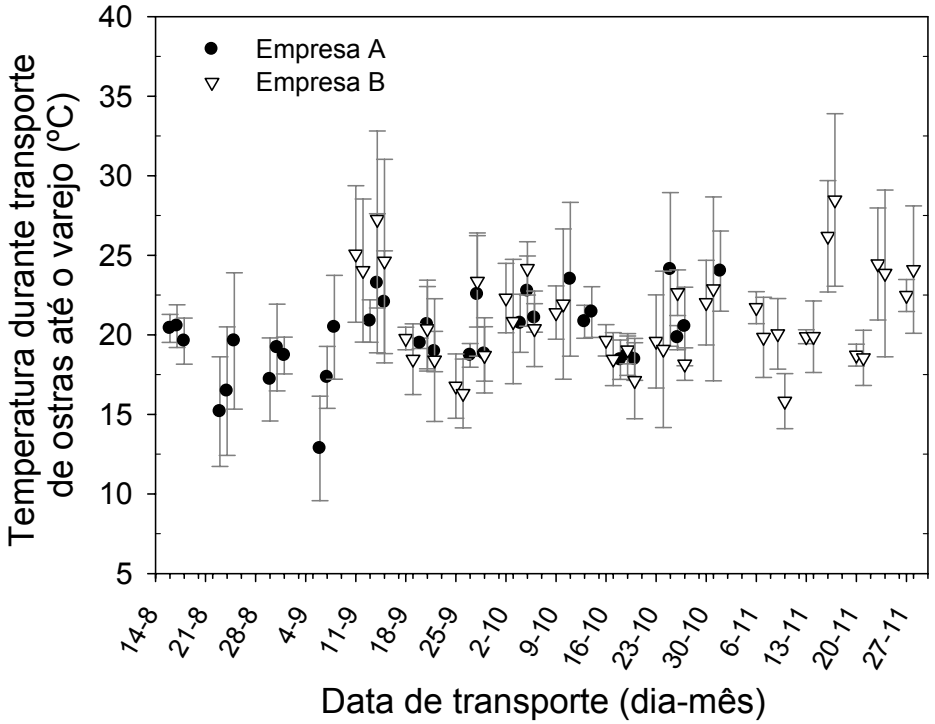


Figura 25. Distribuição da temperatura média diária do transporte de ostras até o comércio. A barra em cada ponto representa um desvio padrão, acima e abaixo, da temperatura média diária.

Por causa da semelhança da distribuição da temperatura durante o transporte entre as empresas, para efeito de simulação foi ajustada uma única distribuição considerando os dados de temperatura registrados nas duas empresas. A distribuição logística, com média de 19,9ºC e desvio padrão de 2,1ºC, foi a distribuição de probabilidade que obteve melhor ajuste aos dados (Figura 26).

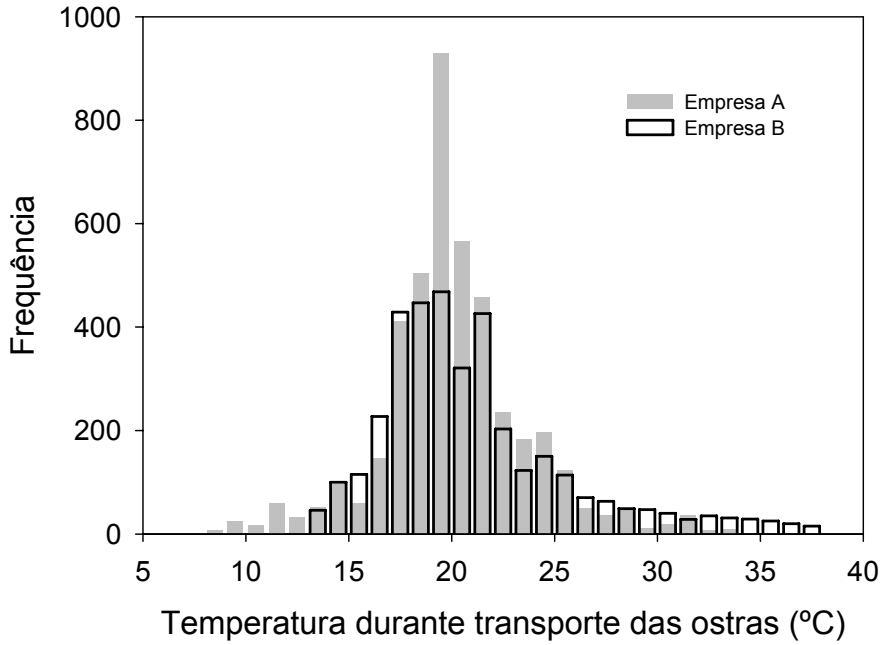


Figura 26. Comparativo da distribuição de temperatura durante o transporte das ostras até o varejo entre as empresas pesquisadas.

Ao final do processo de depuração, as ostras são acondicionadas nas embalagens e estocadas em local arejado ou no veículo de transporte. Como o processo de depuração é concluído por volta das 17 horas e as entregas nos pontos de venda são iniciadas entre as 7 e 8 horas do dia seguinte, o tempo mínimo de entrega nesses pontos é de 16 horas. Já o tempo máximo depende da cidade de destino. Na região metropolitana de São Paulo, na Baixada Santista e litoral Sul, as entregas são realizadas, geralmente, dentro de 24 horas após o término da depuração. Para as cidades do Litoral Norte e interior, no entanto, o tempo máximo é de, aproximadamente, 44 horas. O sistema de distribuição das ostras no varejo é bastante semelhante entre as duas empresas estudadas.

O efeito do tempo de transporte foi modelado considerando que 90% das ostras são comercializadas na região metropolitana de São Paulo, na Baixada Santista e litoral Sul e 10% têm como destino o litoral Norte e cidades do interior do Estado. Portanto, o tempo de transporte foi modelado como uma distribuição discreta de duas distribuições uniformes: uma representando a região metropolitana com tempo mínimo de 16 e máximo de 24 horas e probabilidade de 90%, e a outra representando o litoral Norte e interior com tempo mínimo de 16 e máximo de 44 horas, com 10% de probabilidade.

A suposição de que a distribuição de temperatura obtida no período monitorado representa as condições de transporte ao longo do ano é subestimada, visto que o monitoramento da temperatura não ocorreu ao longo do ano e não foi possível avaliar a influência das estações do ano. Além disso, observa-se que durante o transporte as ostras não estavam sob temperaturas de refrigeração, pelo menos durante o período monitorado. Portanto, a temperatura de transporte é influenciada pelas variações da temperatura ambiental e pelas condições de transporte. Esta influência pode ser percebida pela amplitude de variação da temperatura de transporte detectada nos dados (34,5ºC), que é superior à amplitude da temperatura do ar ambiente (18ºC), para o município de Cananéia, entre os anos de 2001 e 2004.

4.1.2.6. Influência das condições de estocagem das ostras nos pontos de venda sobre a população de *Vibrio parahaemolyticus*

As ostras geralmente são armazenadas em temperaturas de refrigeração nos pontos de venda, exceto para alguns locais específicos, que as armazenam em temperatura ambiente. A temperatura de estocagem das ostras, obtida por amostragem em alguns pontos de venda, variou entre 6 e 12 ºC.

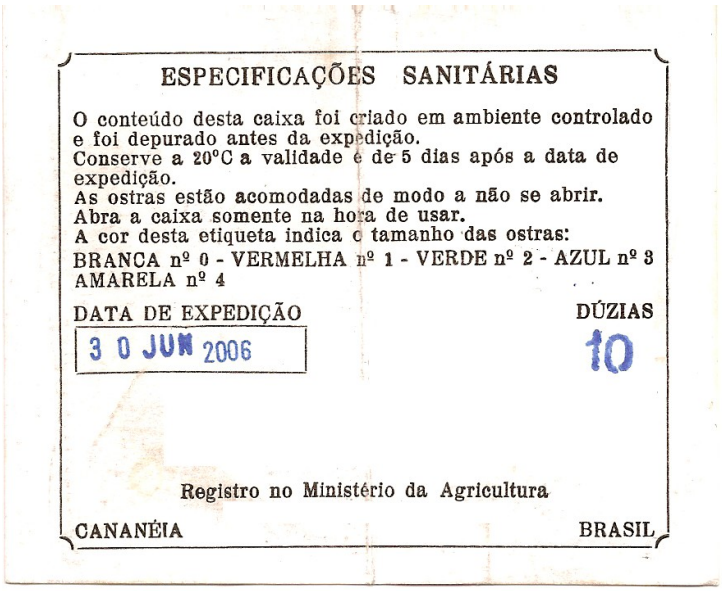
Gooch et al. (2002) observaram uma redução, na população de Vp em ostras, de 0,003 $\log_{10}$(UFC/g), por hora, quando armazenado a 3 ºC por 14 a 17 dias. Johnson e Liston (1973), verificaram uma redução de 0,005 log, por hora, em ostras armazenadas a 5 ºC, após 14 dias de estocagem. Muntada-Garriga et al. (1995), inoculando Vp em homogeneizado de ostras, verificaram uma redução 0,018 log por hora na população de Vp em um período de 1 semana a 4 ºC, enquanto Cook et al. (2002b) observaram uma redução de 7 %, por dia, na população de Vp em ostras no varejo, e em 21 % das vezes a temperatura interna das ostras excedeu 7,2 ºC.

Considerando que a temperatura de armazenamento nos pontos de venda raramente está abaixo de 5 ºC, é provável que as condições de estocagem possam alterar a população de Vp em ostras. Entretanto, na ausência de dados conclusivos das condições de temperatura durante o armazenamento no varejo, foi assumido que as temperaturas de estocagem não excedem 10 ºC, temperatura em que, segundo Cook e Ruple (1989), não ocorre multiplicação significativa do microrganismo nesse alimento. Assim, para efeito de modelagem, foi assumido que nas condições de estocagem das ostras, a redução na população de Vp é de 0,007

log por hora, que é uma média dos valores encontrados nos trabalhos descritos acima.

Outras considerações adotadas para as condições de estocagem são:

- Não há multiplicação significativa de Vp durante o processo de refrigeração das ostras, até que atinjam temperaturas internas inferiores a 10ºC;
- A vida de prateleira das ostras estocadas sob refrigeração é de, no máximo, 5 dias, valor declarado no rótulo do produto de uma das empresas pesquisadas (Figura 27), que considera 20ºC a temperatura de conservação, e entregas realizadas até 2 vezes por semana;


ESPECIFICAÇÕES SANITÁRIAS

O conteúdo desta caixa foi criado em ambiente controlado e foi depurado antes da expedição.
Conserve a 20°C a validade é de 5 dias após a data de expedição.
As ostras estão acomodadas de modo a não se abrir.
Abra a caixa somente na hora de usar.
A cor desta etiqueta indica o tamanho das ostras:
BRANCA nº 0 - VERMELHA nº 1 - VERDE nº 2 - AZUL nº 3
AMARELA nº 4

DATA DE EXPEDIÇÃO
30 JUN 2006

DÚZIAS
10

Registro no Ministério da Agricultura

CANANÉIA BRASIL

Figura 27. Rótulo da embalagem de comercialização de ostras de uma das empresas.

- O tempo de estocagem até o consumo segue uma distribuição uniforme com mínimo de 4 e máximo de 120 horas. O mínimo de 4 horas foi estimado, considerando que as primeiras porções de ostras podem ser servidas no horário do almoço. Portanto, aproximadamente 4 horas depois do início das entregas. Já o valor máximo é o tempo estimado da vida de prateleira.

4.1.2.7. Distribuição da população de *V. parahaemolyticus* em ostras no momento do consumo

Para obtenção dos resultados da etapa de pós-coleta, foram considerados: a variação da população de Vp em ostras em função da temperatura do ar, a redução do número de Vp, propiciada pelo processo de depuração, a multiplicação do microrganismo durante a distribuição no varejo, e o efeito do tempo e das condições de armazenamento, no varejo, sobre a população de Vp nas ostras. Os resultados apresentados na Tabela 10 refletem os efeitos das práticas de processamento e a manipulação das ostras por parte da indústria, após a coleta nos locais de cultivo.

Durante as simulações, a variabilidade e a incerteza das variáveis do modelo foram transmitidas desde a etapa de cultivo até a etapa de consumo por meio das várias operações realizadas com suas distribuições. As variáveis respostas foram obtidas, por simulação de Monte Carlo, com a combinação de forma apropriada de amostras de valores das distribuições das variáveis de entrada do modelo.

As iterações representam a variabilidade de cada variável do modelo, enquanto a distribuição de incerteza é estimada a partir do número de simulações, ou seja, a incerteza não muda dentro de uma iteração, mas difere para cada simulação. O princípio do efeito da incerteza é substituir a média das distribuições de variabilidade obtida com as iterações. Portanto, a distribuição de incerteza é obtida com os valores médios estimados pelas iterações para a distribuição de interesse.

A incerteza sobre a estimativa da população média de Vp foi obtida com o resultado de 500 simulações do modelo. Cada simulação foi realizada com 5000 iterações e utilizou-se um conjunto diferente de valores dos parâmetros da distribuição de incerteza para a temperatura da água do mar, para a equação de regressão de Vp em função da temperatura da água obtida na etapa de cultivo e para o fator de multiplicação de Vp em ostras, como discutido anteriormente e apresentado no Apêndice B.

Tabela 10. Estimativa da distribuição de incerteza da população de Vp total e patogênico em ostras no momento do consumo em log_{10}(NMP/g), obtidas com 500 simulações* pelo método de simulação de Monte Carlo.

Estação do ano	Média de Vp total**	Média de Vp patogênico**
Primavera	5,09 (4,74; 5,47)	1,93 (1,57; 2,29)
Verão	5,54 (5,14; 5,90)	2,37 (1,97; 2,74)
Outono	5,06 (4,61; 5,47)	1,89 (1,45; 2,31)
Inverno	4,42 (3,98; 4,89)	1,26 (0,82; 1,72)

*A média de cada simulação foi obtido com 5000 iterações.
**Valores entre parênteses representam o 5º e 95º percentil, respectivamente, da distribuição de incerteza para a média.

Comparando os valores da Tabela 10 com os resultados obtidos das análises de 74 amostras de ostras coletadas nos locais de consumo (Tabela 11), notam-se algumas discrepâncias. A estimativa da população média de Vp em ostra obtida com o modelo é superestimada em todas as estações do ano. A população média de Vp total obtida com o modelo (Tabela 10) é superestimada em 0,68 log_{10}(NMP/g) no verão, 0,48 no outono e 0,65 no inverno, em relação às populações sazonais de Vp total por nós detectadas (Tabela 11).

Tabela 11. População sazonal de Vp total e patogênico em 74 amostras de ostras analisadas na etapa consumo.

	População de *V. parahaemolyticus* em log_{10}(NMP/g)		
Estação do ano	N*	Média Vp total**	Média Vp patogênico**
Inverno	22	3,76 (1,93; 5,03)	<0,48[b]
Outono	24	4,58 (3,35; 5,38)	<0,48[b]
Primavera[a]	-	-	-
Verão	28	4,86 (3,61; 6,04)	<0,48[b]

* N é o número de amostras analisadas.
** Valores em parênteses representam o 5º e 95º percentil, respectivamente.
[a] Não foram coletadas amostras no período.
[b] Valores abaixo do limite de detecção do método (3 NMP/g).

Por outro lado, considerando somente a variabilidade do modelo, estimada por uma simulação com 10.000 iterações, com o uso das melhores estimativas obtidas para os parâmetros das variáveis, as diferenças entre os resultados obtidos

com as 74 amostras analisadas e os valores preditos pelo modelo diminuem para 0,46 log_{10}(NMP/g) no verão, 0,22 no outono e 0,40 no inverno (Figura 28).

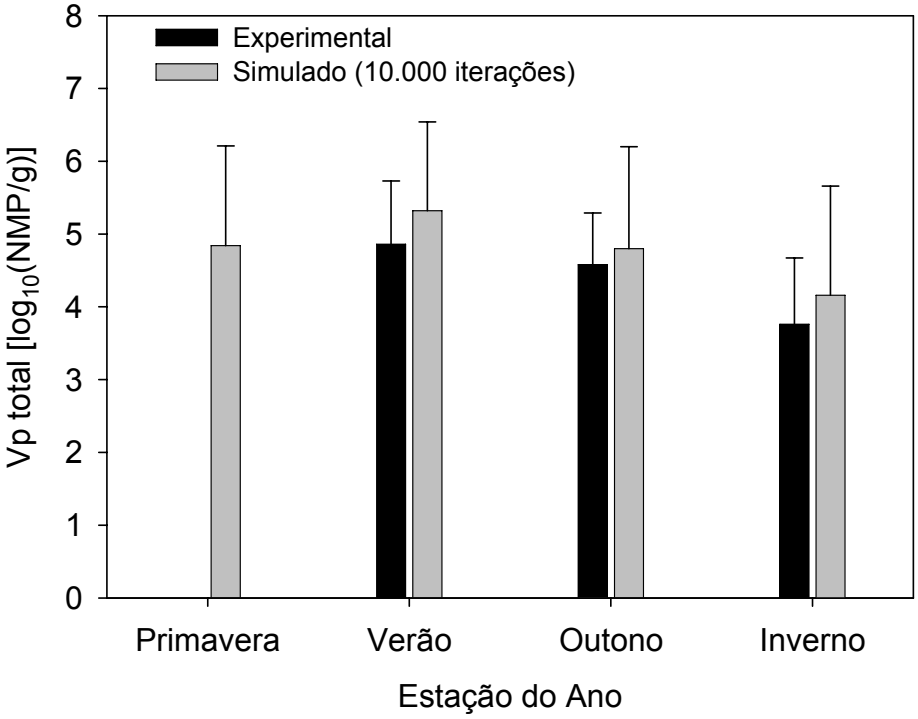


Figura 28. População de *V. parahaemolyticus* total observada no varejo comparado com a estimada pelo modelo, obtida com 1 simulação de 10.000 iterações. A barra de erro indica um desvio padrão abaixo e acima da média.

As discrepâncias são maiores quando se considera a distribuição da população de Vp patogênico, visto que nas amostras analisadas na etapa pós-coleta não foi detectado isolado com o gene *tdh* ou *trh*. Neste caso, as populações de Vp são superestimadas em mais de 1 log_{10}(NMP/g).

A multiplicação de Vp em ostras pode estar sendo influenciada por vários fatores que não foram considerados no modelo, por exemplo, a competição com outros microrganismos que pode diminuir a taxa de multiplicação de Vp, a alteração dos fatores intrínsecos da ostra, como pH, estado fisiológico, etc. Outro ponto a considerar é o valor máximo da população de Vp observada em ostras, ou seja, a população de Vp quando este atinge a fase estacionária da curva de crescimento.

Segundo Gooch et al. (2002), a população máxima de Vp total em ostras foi de 5,8 log_{10}(UFC/g), após 24 horas a 26ºC. Cook et al. (2002b) detectaram valores de 6,3 log_{10}(NMP/g) de Vp em amostras de ostras coletadas no comércio dos Estados Unidos. Nas amostras analisadas durante este trabalho, a maior população

encontrada foi de 6,04 log_{10}(NMP/g), semelhantes aos resultados encontrados por Gooch et al. (2002) e Cook et al. (2002b).

Supondo que a população máxima de Vp total em ostras é igual ao valor máximo detectado nas amostras analisadas, ou seja, 6,04 log_{10}(NMP/g), ao invés de 7, como presumido anteriormente, a diferença entre os valores médios estimados pelo modelo e os detectados pelas amostras, diminui para 0,23 log_{10}(NMP/g) no verão, 0,15 log_{10}(NMP/g) no outono e 0,47 log_{10}(NMP/g) no inverno (Figura 29). No entanto, com relação às populações de Vp patogênico, a diferença entre os valores preditos pelo modelo e os detectados pelas amostras diminui, mas ainda permanece acima de 1 log_{10}(NMP/g), como observado na Figura 30.

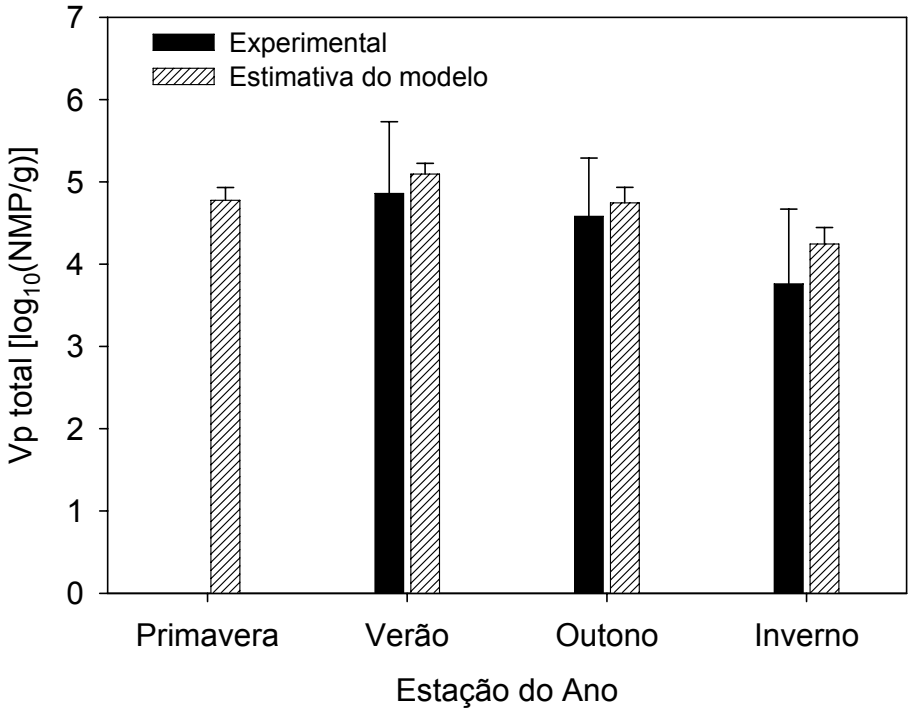


Figura 29. População de *V. parahaemolyticus* total observada no varejo comparado com a estimada pelo modelo, obtida com 500 simulações de 5000 iterações. A barra de erro indica um desvio padrão abaixo e acima da média.

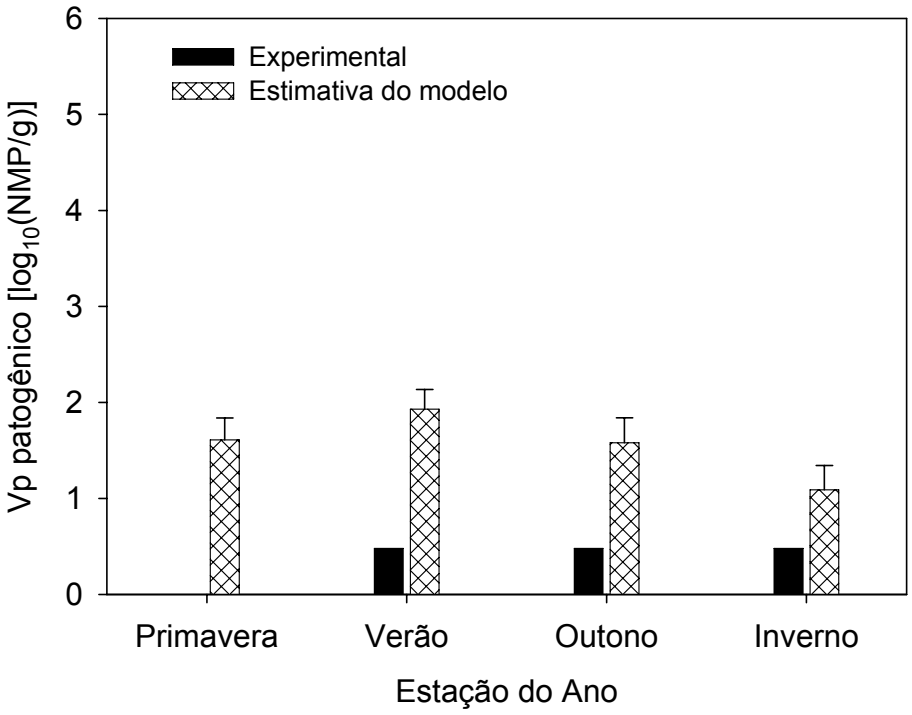


Figura 30. População de *V. parahaemolyticus* patogênico observada no varejo comparado com a estimada pelo modelo, obtida com 500 simulações de 5000 iterações. A barra de erro indica um desvio padrão abaixo e acima da média. A média experimental foi estimada como o limite de detecção do método 0,48 $\log_{10}$(NMP/g).

De um modo geral, as médias das populações de Vp total preditas pelo modelo são semelhantes às médias das populações obtidas com as 74 amostras de ostras coletadas em restaurantes e supermercados. A diferença entre os valores das populações obtidos pelo modelo e os observados nas amostras é inferior a 0,5 $\log_{10}$(NMP/g).

Contudo, essa mesma diferença não pode ser observada para as populações de Vp patogênico, em que se verifica uma diferença, em média, maior que 1 $\log_{10}$(NMP/g). Uma justificativa para este resultado está na própria metodologia de análise utilizada para detectar Vp patogênico. Como a proporção de células de Vp patogênico é muito menor que as células de Vp total, a probabilidade de uma das três colônias selecionadas no ágar TCBS ser Vp patogênico é muito baixa, quando comparada à probabilidade de selecionar uma colônia de Vp não patogênico.

4.1.3. Resultados da avaliação da exposição na etapa de consumo

O objetivo desta etapa é obter uma estimativa da população de Vp patogênico por porção de ostras. Os dados usados no modelo incluem a quantidade e o peso das ostras consumidas por porção servida. Considerando a não disponibilidade de informação sobre o número de ostras consumidas por porção, a melhor estimativa foi obtida por meio da consulta dos cardápios de restaurantes e barracas de praia, e observação do número de ostras, por embalagem, comercializado nos supermercados ou mercados pesquisados.

As suposições adotadas nesta etapa, considerando as informações disponíveis e a simplificação do modelo, são:

- Todas as ostras comercializadas são consumidas;
- Todas as ostras são consumidas cruas;
- O padrão de consumo independe da faixa etária, do sexo e do estado de saúde dos consumidores;
- O número de ostras por porção é bem representado por uma distribuição discreta entre 6 e 12 ostras, com igual probabilidade de ocorrência.

O número de ostras por porção servida é, geralmente, de 6 ou 12 unidades. Nos restaurantes pesquisados, raramente, é servida uma porção com mais de 12 ostras. Na maioria deles, o mínimo de ostras por porção é de 6 unidades. Já nos supermercados, a quantidade de ostras comercializadas, por embalagem, é de 12 unidades.

A estimativa do peso de uma ostra foi determinada pela pesagem do músculo e do líquido interno das amostras coletadas na etapa de consumo e na etapa de avaliação do processo de depuração, visto que essas amostras eram destinadas à comercialização. A Figura 31 mostra a distribuição do peso em grama, por ostra consumida, obtida de 91 amostras de ostras, cada amostra contendo 12 ostras, totalizando 1092 ostras amostradas.

A distribuição do peso de uma porção de ostra foi estimada com a multiplicacão da distribuição do peso (g) por ostra pela distribuição do número de ostras por porção. A Figura 32 mostra a distribuição do peso (g) por porção servida, considerando a suposição descrita acima para o número de ostras por porção.

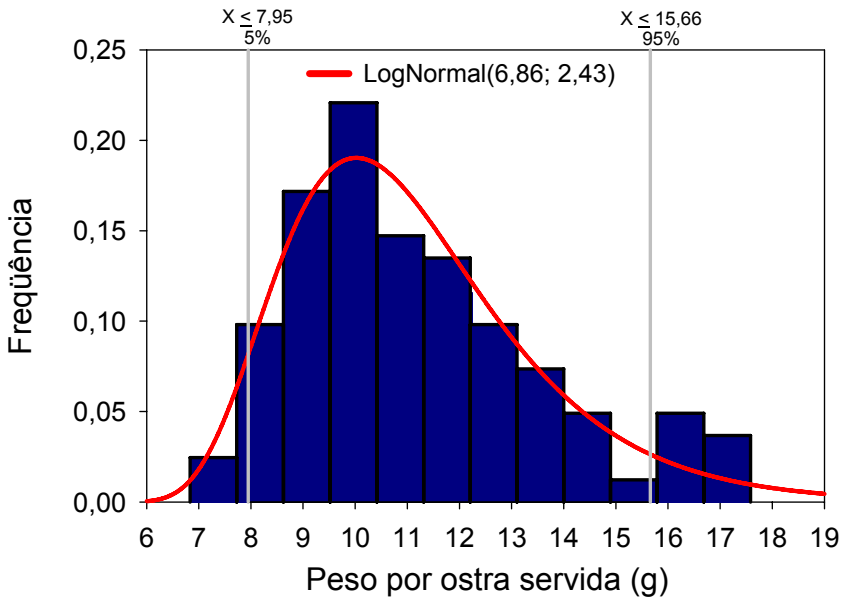


Figura 31. Distribuição do peso (g) por ostra consumida obtida de amostras coletadas no comércio.

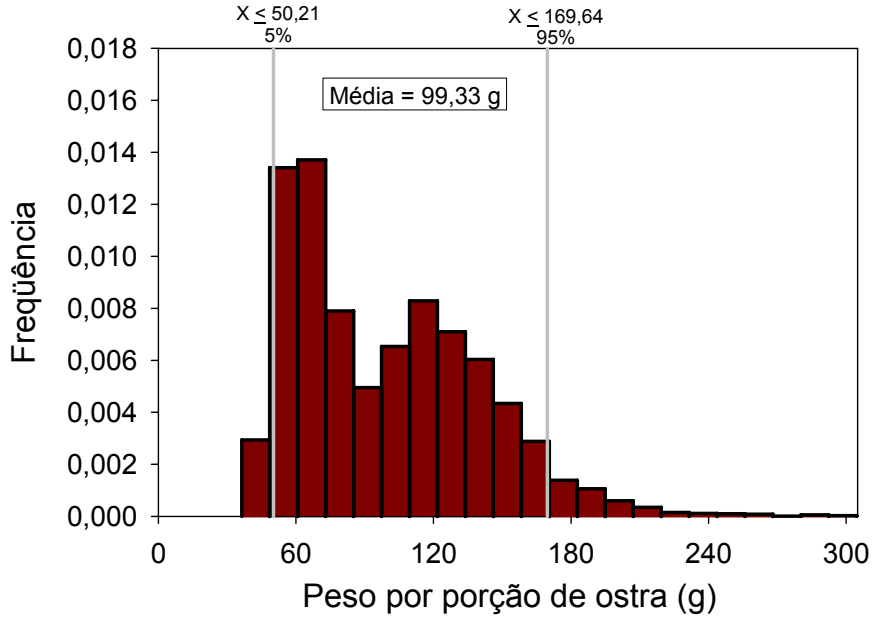


Figura 32. Distribuição do peso (g) por porção de ostra consumida obtida por simulação de Monte Carlo com 5000 iterações.

A Tabela 12 mostra os resultados estimados da distribuição sazonal da população de Vp, por porção servida na etapa de consumo, obtida com 500 simulações de 5000 iterações pelo método de amostragem de Monte Carlo, e considerando a população máxima de Vp total em ostras como 7 $\log_{10}$(NMP/g). Já a Tabela 13 apresenta os resultados considerando a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g). Esses resultados foram obtidos multiplicando-se a distribuição do

peso por porção de ostras (Figura 32) pela distribuição da população de Vp no momento do consumo, apresentados na Tabela 10 para população máxima de 7 log_{10}(NMP/g).

Tabela 12. Estimativa da população (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* total e patogênico, por porção de ostras, servida no momento do consumo, considerando a população máxima de 7 log_{10}(NMP/g).

Estação do ano	Vp total por porção*	Vp patogênico por porção*
Primavera	$1,4x10^8$ ($9,5x10^7$; $1,9x10^8$)	$1,2x10^5$ ($8,3x10^4$; $1,7x10^5$)
Verão	$1,9x10^8$ ($1,4x10^8$; $2,5x10^8$)	$1,7x10^5$ ($1,2x10^5$; $2,2x10^5$)
Outono	$1,3x10^8$ ($8,9x10^7$; $1,9x10^8$)	$1,2x10^5$ ($8,0x10^4$; $1,7x10^5$)
Inverno	$8,1x10^7$ ($5,0x10^7$; $1,2x10^8$)	$7,2x10^4$ ($4,5x10^4$; $1,1x10^5$)

*Valores entre parênteses representam o 5º e 95º percentil, respectivamente, da distribuição da população de Vp.

Tabela 13. Estimativa da população (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* total e patogênico, por porção de ostras, servida no momento do consumo, considerando a população máxima de 6,04 log_{10}(NMP/g).

Estação do ano	Vp total por porção*	Vp patogênico por porção*
Primavera	$2,4x10^7$ ($1,9x10^7$; $3,0x10^7$)	$2,2x10^4$ ($1,7x10^4$; $2,7x10^4$)
Verão	$3,1x10^7$ ($2,5x10^7$; $3,6x10^7$)	$2,7x10^4$ ($2,2x10^4$; $3,2x10^4$)
Outono	$2,4x10^7$ ($1,8x10^7$; $3,0x10^7$)	$2,1x10^4$ ($1,6x10^4$; $2,7x10^4$)
Inverno	$1,6x10^7$ ($1,2x10^7$; $2,1x10^7$)	$1,4x10^4$ ($1,0x10^4$; $1,9x10^4$)

*Valores entre parênteses representam o 5º e 95º percentil, respectivamente, da distribuição da população de Vp.

As informações sobre a quantidade anual de ostras comercializadas no Estado de São Paulo, obtidas junto às empresas produtoras, são apresentadas na Tabela 14. Na empresa (B) só foi possível obter dados referentes à comercialização de ostras em dois anos. Além disso, os valores obtidos não se referem somente às vendas no Estado de São Paulo, o que dificulta uma estimativa confiável da comercialização de ostras no Estado. Durante o desenvolvimento da pesquisa foi observado o envio de ostras da empresa B para os Estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, o que reforça a hipótese dos dados da Tabela 14, referentes à comercialização de ostras pela empresa B, estarem superestimados.

De acordo com os dados fornecidos pela empresa A, observa-se que o maior consumo de ostras ocorre no verão (50%), seguido da primavera (19%), outono (18%) e o menor consumo ocorre no inverno (13%).

Tabela 14. Quantidade* anual de ostras comercializadas pela empresas pesquisadas.

Ano	Empresa A	Empresa B	Total
2002	31.100*	-	31.100
2003	28.900		28.900
2004	21.800	100.000	121.800
2005	30.600	85.000	115.600
Média	*28.100*	*92.500*	*120.600*

*dúzias de ostras.

Considerando que a estimativa do número médio de ostras por porção é de 9 (nove), tem-se que o número médio de porções de ostras comercializadas por ano no Estado de São Paulo é de 160.800 porções. Ainda que esta estimativa considere que todas as ostras comercializadas pela empresa B são consumidas no Estado, ela foi utilizada no modelo para obter o número de casos de doenças por ano (item 4.2.3).

4.2. Caracterização do risco de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas

Como já citado anteriormente, a caracterização do risco é um componente da avaliação de risco obtida com a integração entre a avaliação da exposição e a dose-resposta, fornecendo uma estimativa da probabilidade de desenvolvimento de doença por Vp associada à porção de ostras consumida ou uma estimativa do número de casos de doença por ano, levando em consideração a quantidade de porções consumidas. A relação dose-resposta é freqüentemente expressa como uma relação entre níveis diferentes de exposição e a probabilidade de tal exposição resultar em doença.

4.2.1. Dose-resposta

Há muito pouca informação a respeito das características da dose-resposta para Vp. Em ensaios com voluntários, as doses variaram entre 6 e 9 $\log_{10}$(UFC/g)

(United States, 2005b). Na avaliação de risco desenvolvida pelo FDA foram utilizados 3 modelos de equações (Beta-Poisson; Probit; Gompertz) para a dose-resposta e todos os 3 demonstraram resultados similares quando foram utilizadas doses altas de Vp, mas muito divergentes para doses baixas. Foi observado que os modelos de dose-resposta superestimam o número de doença na população. Para minimizar esse problema, aplicou-se um ajuste baseado em dados epidemiológicos, para tornar as estimativas mais realistas (United States, 2005b).

As discussões abordadas no trabalho do FDA conduzem à escolha do modelo Beta-Poisson como sendo o mais apropriado para representar a dose-reposta, levando em consideração os critérios recomendados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO), sobre a caracterização de perigos para microrganismos patogênicos em alimentos e água (FAO/WHO, 2003b).

As suposições consideradas na modelagem da dose-resposta são:

- As respostas dos voluntários à exposição de Vp representam as respostas da população como um todo;
- A virulência de Vp ou a susceptibilidade do hospedeiro não variam;
- O modelo Beta-Poisson para dose-resposta é razoável para caracterizar o risco de doença pelo consumo de Vp.

Por inexistir dados no Brasil, o modelo de dose-resposta utilizado neste trabalho foi o mesmo modelo Beta-Poisson utilizado pelo FDA (United States, 2005b), incluindo a distribuição de incerteza dos parâmetros alfa e beta (Apêndice C). A análise incorporou a variabilidade e a incerteza nas estimativas da probabilidade de doença e do número de casos por ano. A distribuição de incerteza foi estimada empregando as médias da distribuição obtida com 500 simulações, sendo que cada simulação foi realizada utilizando valores diferentes para os parâmetros das distribuições de incerteza, incluindo os valores para alfa e beta da distribuição da Beta-Poisson (Teunis e Havelaar, 2000; FAO/WHO, 2003b).

Para determinar a distribuição de incerteza para a probabilidade de doença, foram realizadas 500 simulações de 5000 iterações cada uma, pelo método de Monte Carlo. Cada uma das 500 simulações foi realizada com valores diferentes para os parâmetros de dose-resposta selecionados aleatoriamente a partir da distribuição de incerteza dos parâmetros (Apêndice C). O conjunto das médias estimadas para a probabilidade de doença por porção servida, obtido com as

simulações, foi utilizado para caracterizar a distribuição de incerteza sobre a probabilidade de doença. O mesmo procedimento foi realizado para caracterizar a distribuição de incerteza de todas as variáveis, incluindo o número de doenças por ano.

4.2.2. Probabilidade de doença, causada por *V. parahaemolyticus,* associada ao consumo de uma porção de ostras cruas

A probabilidade de desenvolver doença por porção consumida é o risco de uma pessoa vir a ficar doente consumindo uma porção de determinado alimento, neste caso, ostras cruas. Essa probabilidade é determinada considerando a estimativa da população de Vp patogênico consumido por porção de ostras e a relação dose-resposta.

As Tabelas 15 e 16 mostram a estimativa do risco de doença, por porção servida, para cada estação do ano, considerando a população máxima de Vp em ostras de 7 e 6,04 $\log_{10}$(NMP/g), respectivamente. Observa-se que a probabilidade de ocorrência de doença é maior nas estações mais quentes, como o verão. Por exemplo, na Tabela 15, o risco por porção servida no verão, é de aproximadamente $4x10^{-3}$, isto é, ocorrem 4 casos de doença para cada 1000 porções servidas, o que significa 1 caso de doença em 250 porções de ostras consumidas. Porém, o resultado obtido, considerando a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g), é de 1 caso de doença para cada 1.700 porções servidas, aproximadamente.

Tabela 15. Estimativa média do risco por porção servida associado com o consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 7 $\log_{10}$(NMP/g).

Estação do ano	Média do risco por porção servida*	
	Média	Incerteza**
Primavera	$2,6x10^{-3}$	($2,4x10^{-4}$; $7,2x10^{-3}$)
Verão	$3,6x10^{-3}$	($3,3x10^{-4}$; $9,9x10^{-3}$)
Outono	$2,6x10^{-3}$	($2,5x10^{-4}$; $7,2x10^{-3}$)
Inverno	$1,5x10^{-3}$	($1,4x10^{-4}$; $4,3x10^{-3}$)

* Obtida de 500 simulações, com 5000 iterações por simulação.
** Valores entre parênteses representam o 5º e 95º percentis, respectivamente, da distribuição de incerteza.

Tabela 16. Estimativa média do risco por porção servida associado com o consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g).

Estação do ano	Média do risco por porção servida*	
	Média	Incerteza**
Primavera	$4{,}7 \times 10^{-4}$	($4{,}7 \times 10^{-5}$; $1{,}3 \times 10^{-3}$)
Verão	$6{,}0 \times 10^{-4}$	($5{,}8 \times 10^{-5}$; $1{,}6 \times 10^{-3}$)
Outono	$4{,}7 \times 10^{-4}$	($4{,}4 \times 10^{-5}$; $1{,}3 \times 10^{-3}$)
Inverno	$3{,}1 \times 10^{-4}$	($2{,}8 \times 10^{-5}$; $8{,}5 \times 10^{-4}$)

* Obtida de 500 simulações, com 5000 iterações por simulação.
** Valores entre parênteses representam o 5º e 95º percentis, respectivamente, da distribuição de incerteza.

A estimativa do risco por porção obtida com o modelo não pode ser validada em virtude da inexistência de dados epidemiológicos.

A equação apresentada a seguir permite visualizar com maior clareza as etapas utilizadas no modelo para avaliação da probabilidade da ocorrência do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus,* associado ao consumo de ostras cruas.

$$Risco = 1 - \left\{ 1 + \left\langle 10^{[\beta + \alpha \times A + Normal\,(0;\sigma) + \log(B)] + \left(\frac{60 \times C^2}{D}\right) \times E + F + G \times H - I \times J} \right\rangle \frac{\times L \times M}{\varphi} \right\}^{-\delta}$$

Em que,

β, α e σ = parâmetros da equação de regressão da população de *V. parahaemolyticus* total em ostras em função da temperatura da água do mar;

φ e δ = parâmetros do modelo Beta-Poisson para a dose-resposta;

A = distribuição da temperatura média diária da água do mar;

B = distribuição da prevalência de cepas patogênicas no total de Vp detectado;

C = raiz quadrada da taxa de multiplicação máxima de *V. parahaemolyticus* em caldo de cultivo.

D = razão (fator de multiplicação) entre a taxa de multiplicação de *V. parahaemolyticus* em caldo nutritivo e em ostras;

E = distribuição do tempo de coleta das ostras;

F = efeito do processo de depuração sobre a população de *V. parahaemolyticus* em ostras;

G = estimativa do crescimento da população de *V. parahaemolyticus* durante o transporte entre a indústria e o ponto de comercialização;

H = distribuição do tempo de transporte das ostras entre a indústria e o ponto de comercialização;

I = taxa de inativação de Vp durante a estocagem das ostras no varejo;

J = distribuição do tempo de estocagem das ostras no varejo até o consumo;

L = distribuição do peso por ostra consumida

M = número de ostras consumidas por porção;

A tabela 17 compara os resultados obtidos na tabela 16 com os resultados obtidos pelo FDA (United States, 2005b), para a região da Costa do Golfo, Estados Unidos, que apresenta as condições ambientais (temperatura) mais próximas das verificadas em Cananéia. Verifica-se similaridade na estimativa média do risco de doença, particularmente no verão e na primavera, quando as médias da temperatura da água do mar são mais próximas.

Tabela 17. Comparativo do risco de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas obtido por esse trabalho e o obtido pelo FDA para a região da Costa do Golfo (United States, 2005b).

Estação do ano	Cananéia, São Paulo		Costa do Golfo, Estados Unidos (FDA, 2005b)	
	Média do risco por porção	Temperatura média da água do mar (ºC)	Média do risco por porção	Temperatura média da água do mar (ºC)
Primavera	$4,7x10^{-4}$	24,1	$1,7 x10^{-4}$	24,5
Verão	$6,0x10^{-4}$	27,0	$4,4 x10^{-4}$	28,9
Outono	$4,7x10^{-4}$	24,0	$4,3 x10^{-5}$	17,9
Inverno	$3,1x10^{-4}$	20,3	$2,1 x10^{-6}$	14,2

Diferentemente do obtido na presente pesquisa, a avaliação de risco americana para a região da Costa do Golfo detectou uma maior prevalência de cepas patogênicas no total de Vp identificado (0,18%), contra 0,089% estimada neste trabalho. Na avaliação da exposição, a população média de Vp total por porção servida no momento do consumo estimada pelo FDA foi, aproximadamente, 10 a 100 vezes menor que a detectada nesse trabalho.

O risco de doença, causada por Vp, associado a ostras cruas ($4,6x10^{-4}$) é maior que o risco de doença causada por *Vibrio vulnificus* (mediana igual a $5,3x10^{-6}$), é também maior que o risco de doença por *Vibrio cholerae* associado a camarão (mediana $3,3x10^{-9}$, no ano 2000). Com relação ao risco de listeriose decorrente do consumo de uma porção de peixe defumado ($5,3x10^{-8}$), o risco de doença por Vp associado ao consumo de uma porção de ostras é alto.

4.2.3. Número de casos de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, por ano associado ao consumo de ostras cruas

O risco anual pode ser expresso como a estimativa do número de casos de doença, por ano, no Estado de São Paulo, relacionado ao consumo de ostras cruas cultivadas na região de Cananéia. Foi calculado multiplicando-se a probabilidade de doença, causada pela ingestão de uma porção, pelo número de porções consumidas.

Os resultados estimados para o número de casos de doença por ano são mostrados na Tabela 18 e 19, considerando as populações máximas de Vp em ostras como 7 e 6,04 $\log_{10}$(NMP/g), respectivamente. Pela Tabela 18, o número de casos de doença estimado para o verão é 9 vezes maior que no inverno, enquanto na Tabela 18 este valor diminui para 7. Este resultado leva em consideração o fato de 50% das ostras serem consumidas no verão.

Tabela 18. Estimativa anual do número de casos de doença associado ao consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 7 $\log_{10}$(NMP/g).

Estação do ano	Média do risco por ano*	
	Média	Incerteza**
Primavera	78	(7; 221)
Verão	284	(27; 802)
Outono	74	(7; 210)
Inverno	32	(3; 89)
Total	622	-

* Obtida de 500 simulações, com 5000 iterações por simulação.
** Valores entre parênteses representam o 5º e 95º percentis, respectivamente, da distribuição de incerteza.

O modelo estima um número de doenças por ano 7,5 vezes maior considerando a população máxima de Vp em ostras de 7 $\log_{10}$(NMP/g) quando comparado com a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g).

Tabela 19. Estimativa anual do número de casos de doença associado ao consumo de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, cultivadas e comercializadas no Estado de São Paulo, considerando a população máxima de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g).

Estação do ano	Casos de doença por ano*	
	Média	Incerteza**
Primavera	14	(1; 39)
Verão	48	(5; 130)
Outono	14	(1; 38)
Inverno	7	(1; 18)
Total	83	-

* Obtida de 500 simulações, com 5000 iterações por simulação.
** Valores entre parênteses representam o 5º e 95º percentis, respectivamente, da distribuição de incerteza.

Os resultados foram obtidos com base no número médio anual de porções de ostras comercializadas pelas duas empresas, que pode estar superestimado. Também foi suposto que toda ostra comercializada é consumida, o que não é um fato natural, uma vez que as ostras são comercializadas *in natura*. Além disso, apresentam uma vida de prateleira relativamente curta, quando comparada a outros alimentos, o que contribui para uma perda significativa do produto durante a estocagem no comércio.

4.2.4. Análise de sensibilidade da probabilidade de doença, causada por *V. parahaemolyticus*, associada ao consumo de ostras cruas

Foram realizadas análises de sensibilidade para identificar e quantificar a importância relativa das variáveis do modelo sobre a probabilidade de ocorrência de doença. Os gráficos “tornado” e aranha (“spider plot”) são as formas mais utilizadas em análise de sensibilidade, para retratar as variáveis do modelo que apresentam maior influência sobre a variável resposta, neste caso a probabilidade de doença.

No gráfico “tornado”, as distribuições ou variáveis de entrada do modelo são representadas por barras e a variação horizontal, abrangida pelas barras, dá uma medida da influência de cada variável de entrada sobre a variável resposta, expressa pelo coeficiente de regressão normalizado associado à respectiva variável de entrada (*multivariate stepwise regression*) (Palisade Corporation, 2005; Vose,

2000). Por exemplo, no inverno, o coeficiente de regressão entre a população de Vp total no cultivo e o risco de ocorrência de doença por porção é de 0,56, enquanto a temperatura da água do mar tem coeficiente de 0,12. Portanto, a população de Vp no cultivo tem mais influência sobre o risco de ocorrência de doença, por porção, do que a temperatura da água. Este gráfico é normalmente utilizado para a identificação inicial das variáveis que mais influenciam a variável resposta. Os resultados mostrados nas Figuras 33 a 36 foram obtidos utilizando a população máxima de Vp em ostras de 6,04 $\log_{10}$(NMP/g).

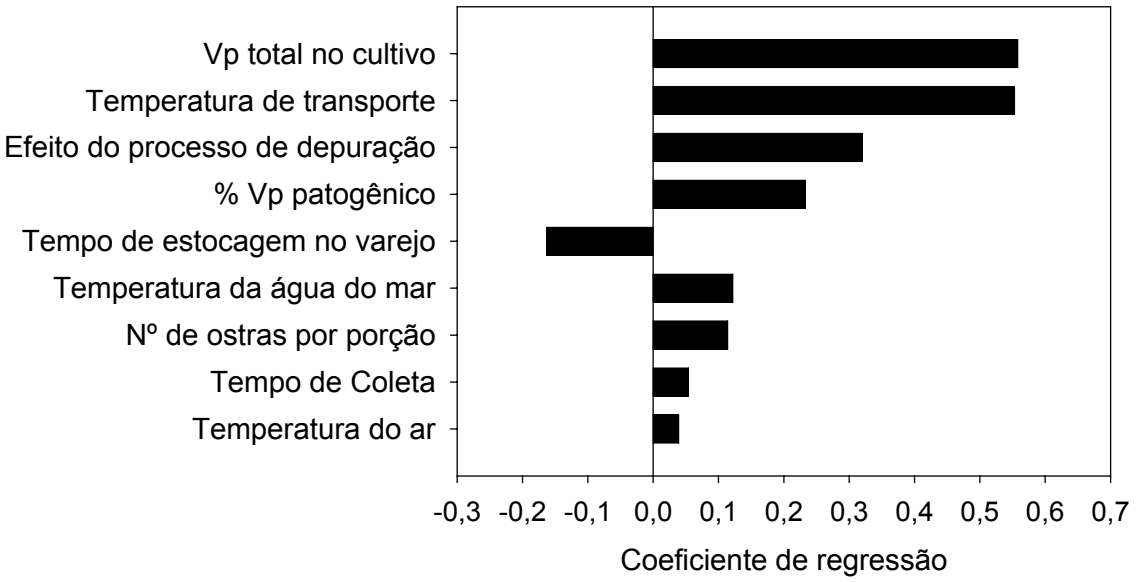


Figura 33. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida no inverno.

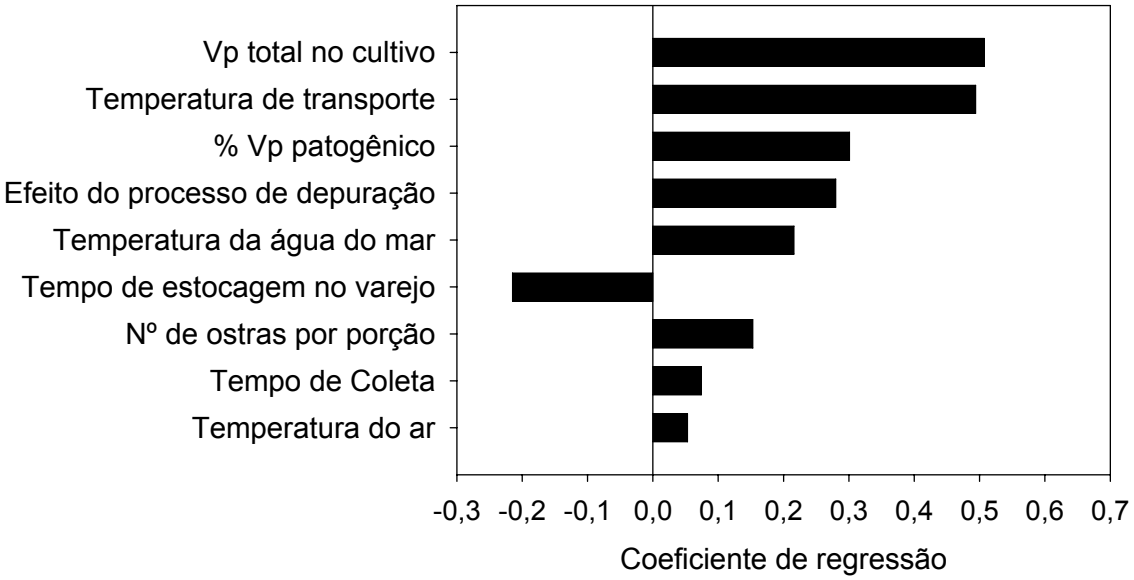


Figura 34. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida no outono.

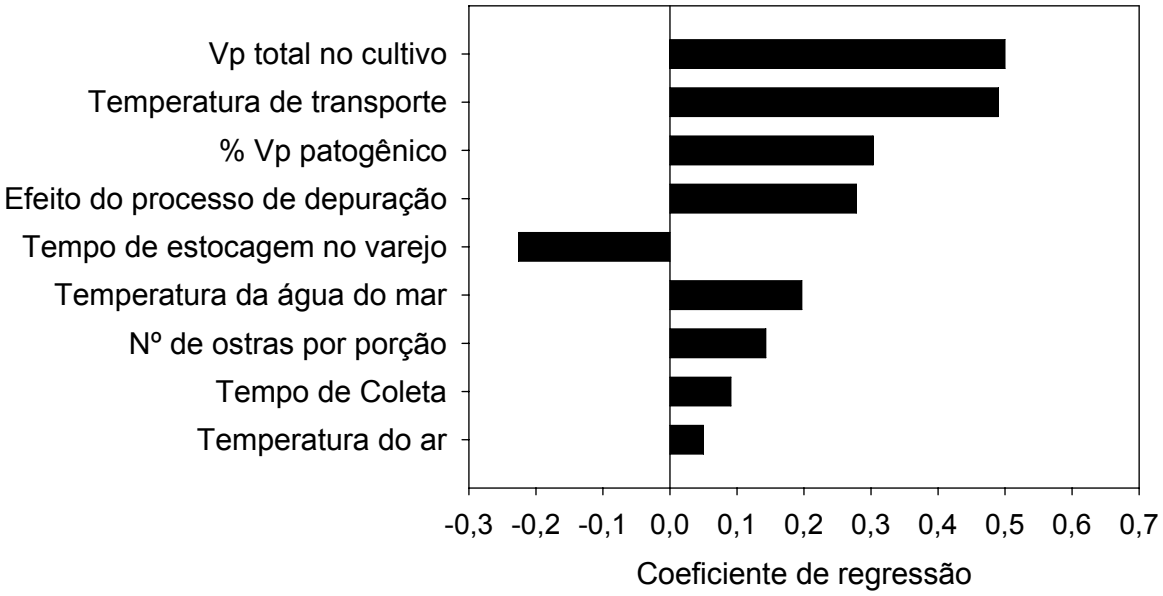


Figura 35. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida na primavera.

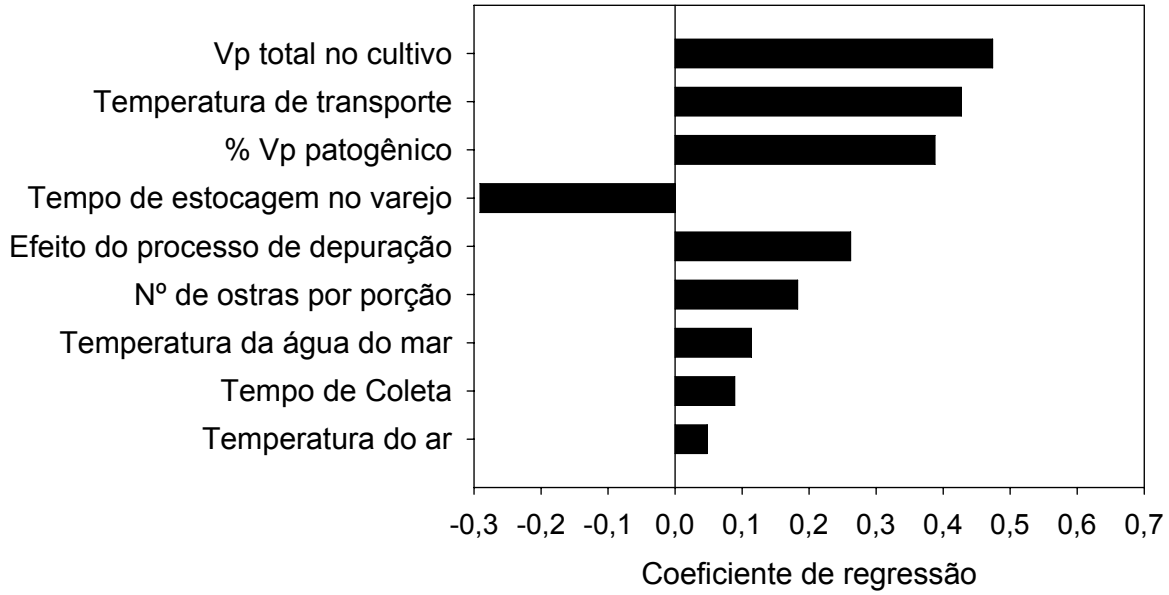


Figura 36. Influência das variáveis do modelo de avaliação de risco sobre a probabilidade de ocorrência de doença por porção de ostras consumida no verão.

Observa-se que as variáveis com maior influência sobre a probabilidade de ocorrência de doença foram a temperatura de transporte e a população de Vp total na etapa de cultivo. A terceira variável mais influente foi a distribuição da porcentagem de Vp patogênico. Nota-se que a temperatura da água do mar não está entre os cinco fatores mais influentes, exceto para o outono, em que é a quinta maior influência. Esta é a estação do ano em que a temperatura da água do mar apresenta maior variação. Provavelmente, a faixa de variação da temperatura da água não é ampla o bastante para interferir de forma mais significativa no risco de doença comparada às outras variáveis nas demais estações do ano.

A medida da influência de cada variável é semelhante entre as estações do ano, particularmente para a temperatura de transporte e população de Vp total.

Já a abordagem da análise de sensibilidade retratada pelo gráfico tipo aranha ("spider plot") possibilita visualizar, de forma mais efetiva, a influência das principais variáveis do modelo, identificadas pelo gráfico tornado, sobre o risco de doença por porção de ostra consumida. Neste tipo de gráfico, os percentis são representados no eixo x (abscissa) e o valor da variável resposta representado no eixo y (ordenada). As distribuições são fixadas no percentil 50 %. Então, cada distribuição tem o percentil alterado, por exemplo, para 1 %, 25 %, 75 % e 99 %, e o resultado do efeito dessa variação sobre a variável resposta é observado no eixo y. Os resultados são mostrados nas Figuras 37 a 40.

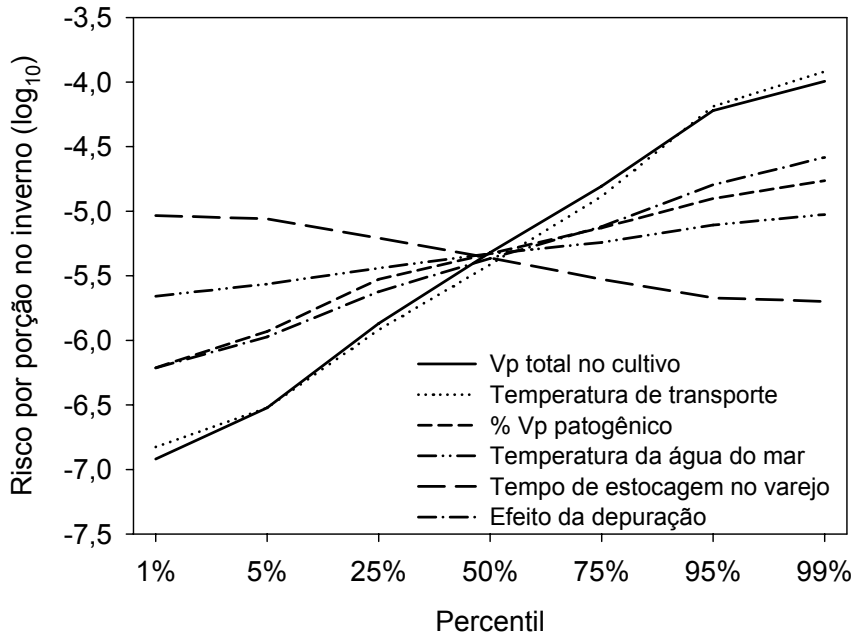


Figura 37. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida no inverno.

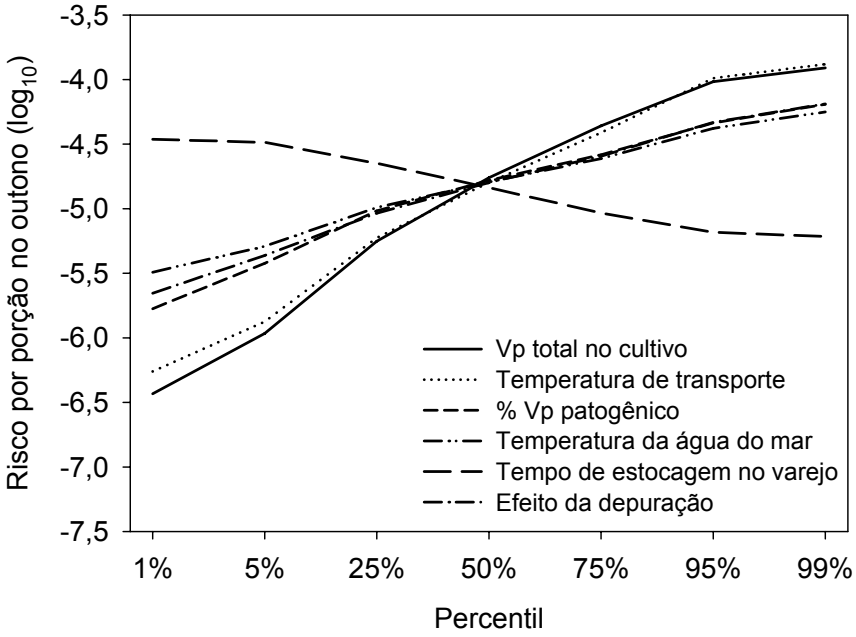


Figura 38. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida no outono.

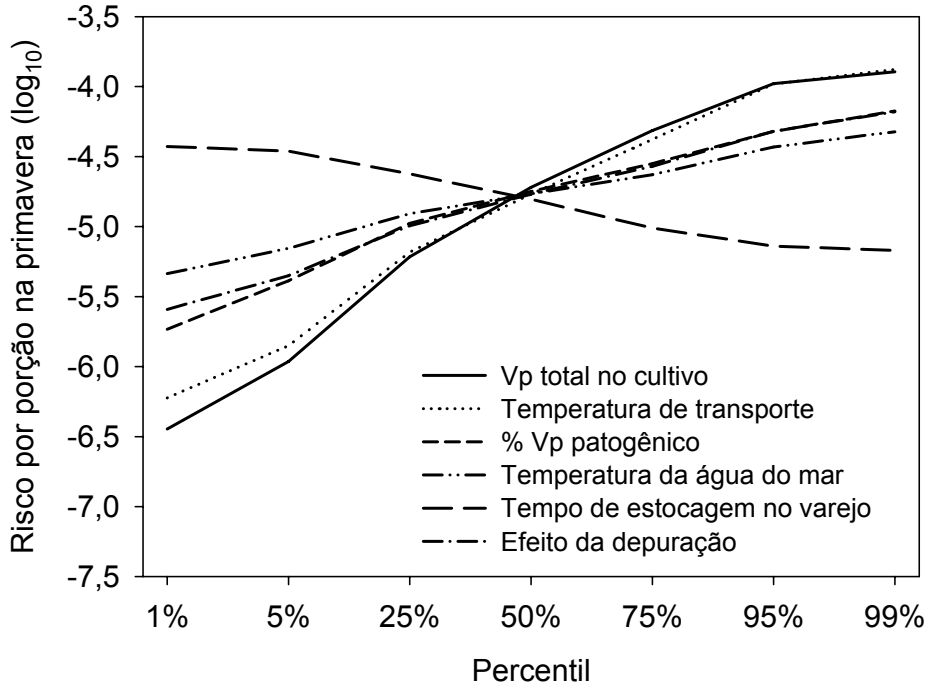


Figura 39. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida na primavera.

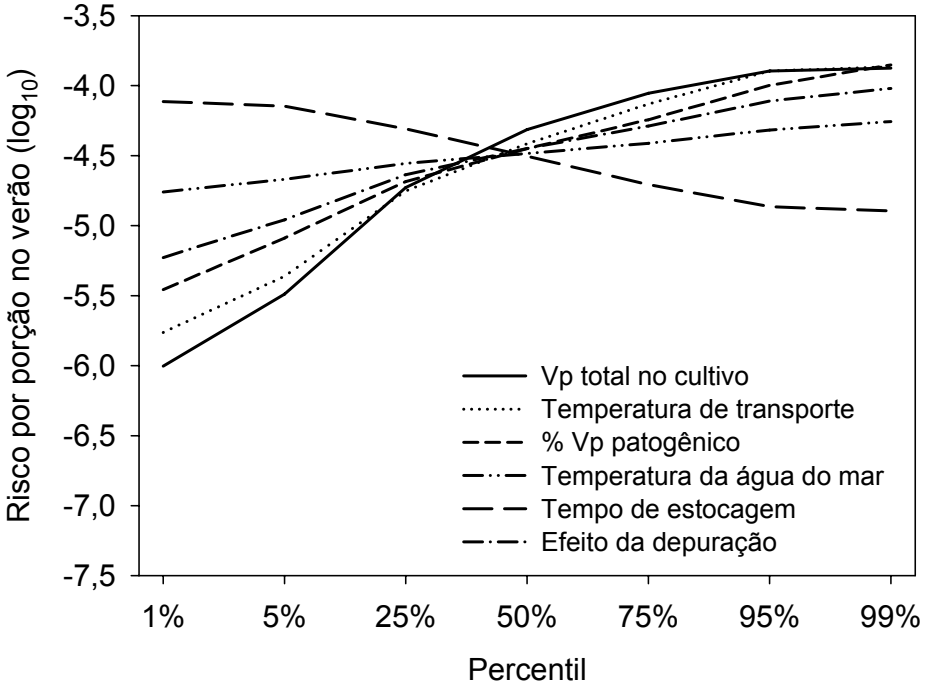


Figura 40. Efeito da variabilidade das principais variáveis do modelo para avaliação de risco sobre a probabilidade de desenvolver doença por porção de ostras consumida no verão.

As variáveis população de Vp total no cultivo, temperatura de transporte e porcentagem de Vp patogênico têm correlação positiva com a estimativa do risco de desenvolver doença. A variabilidade apresentada por cada uma dessas distribuições pode elevar a estimativa de risco em até 1000 vezes como, por exemplo, no inverno (Figura 38). Já o tempo de estocagem no varejo é a única, dentre as 5 variáveis de maior influência, que possui correlação negativa com o risco de doença por porção consumida.

5. Conclusões

Com base nas condições em que esta pesquisa foi realizada, nos resultados obtidos e na sua discussão, é possível concluir que:

A população de Vp em ostras é maior no momento do consumo do que na etapa de cultivo, o que indica que as práticas atuais da indústria contribuem para a multiplicação de Vp em ostras ao longo da cadeia produtiva e, consequentemente, aumentar o risco de doença causada por este microrganismo.

A população de Vp patogênico em ostras é bem menor que a população de Vp total, o que dificulta a detecção de Vp patogênico pelo método do número mais provável tradicionalmente utilizado na enumeração desse microrganismo. Também, torna difícil o monitoramento no ambiente de cultivo ou nas ostras para prevenir a doença causada pelo microrganismo. A prevalência de cepas patogênicas no total de Vp em ostras é uma questão que precisa ser mais bem caracterizada.

A população de Vp em ostras varia por estação do ano e é maior no verão, evidenciando que a temperatura é o principal fator a influência o desenvolvimento de Vp em ostras.

Foi possível desenvolver um modelo quantitativo para avaliar a probabilidade de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus,* associada ao consumo de ostras cruas onde a população de Vp em ostras na etapa de cultivo, a temperatura de transporte e a distribuição de Vp patogênico são os principais fatores que influenciam o risco de ocorrência de doença.

O modelo comprova que uma das maneiras de reduzir o risco de ocorrência de doença seria intervir nas condições de transporte de ostras da indústria até o varejo por meio da sua refrigeração, visto que é nesta etapa da cadeia produtiva que ocorre a maior multiplicação de Vp.

Com o modelo proposto, é possível identificar fatores e simular cenários para avaliar o comportamento de *Vibrio parahaemolyticus,* como um perigo microbiológico, ao longo da cadeia produtiva de ostra. Também é possível obter estimativas para julgar a necessidade ou avaliar o impacto de medidas de intervenção para alcançar os possíveis objetivos de desempenho.

A avaliação de Vp em ostras ao longo da cadeia produtiva e os possíveis cenários simulados com o modelo quantitativo desenvolvido neste trabalho permitem uma avaliação sistemática de estratégias para minimizar o impacto na saúde

pública, não somente de *Vibrio parahaemolyticus*, mas de vários outros microrganismos patogênicos, principalmente as outras espécies do gênero Vibrio, como *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus*.

Os resultados desta avaliação são influenciados pelos dados e suposições utilizados para desenvolver os modelos de avaliação da exposição e da dose-resposta. O risco de ocorrência de doença pode ser alterado com a obtenção de dados epidemiológicos que reforcem ou esclareçam as suposições adotadas.

É necessário que o modelo proposto seja validado, particularmente, com relação ao número de casos de doença causada por *V. parahaemolyticus,* uma vez que dados de vigilância epidemiológica para essa doença são inexistentes no Brasil.

6. Referências Bibliográficas

ALAM, M.J.; TOMOCHIKA, K.-I.; MIYOSHI, S.-I.; SHINODA, S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. **FEMS Microbiology Letters**, v.208, n.1, p.83-87, 2000.

ALTERKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Perspective emergency foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.4, p.1-13, 1997.

AMAKO, K.; SHIMODORI, S.; IMOTO, T.; MIAKE, S.; UMEDA, A. Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.3, p.603-605, 1987.

ANDREWS, L.S.; DeBLANC, S.; VEAL, C.D.; PARK, D.L. Response of *Vibrio parahaemolyticus* 03:K6 to a hot water/cold shock pasteurization process. **Food Additives & Contaminants**, v.20, n.4, p.331-334, 2003.

ANDREWS, L.S.; PARK, D.L.; CHEN, Y.P. Low temperature pasteurization to reduce the risk of *víbrio* infections from raw shell-stock oysters. **Food Additives & Contaminants**, v.19, n.7, p.787-791, 2000.

BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANETTI, A.; BAFFONE, W.; FABBRI, A.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KÜHN, I.; MOLLBY, R.; BRUSCOLI, F.; DONELLI, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.6, p.2748-2753, 1999.

BARBONI, S.A.V. **Ocorrência de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 à 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil**. São Paulo, 2002. 171p. Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.

BARROS, L.M.O.; VIEIRA, R.H.S.F.; MACRAE, A.; LIMA, E.A.; VIEIRA, G.H.F. Vibrio sucrose negative in oysters *Crassostrea rhizophorae* from a tropical region [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por psobrinho@usp.br em 14 de fevereiro de 2006.

BATES, T.C.; OLIVER, J.D. The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Microbiology**, v.42, n.2, p.74-79, 2004.

BAUER, A.; ØSTENSVIK, Ø.; FLORVÅG, M.; ØRMEN, Ø.; RØRVIK, L.M. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p.3058-3061, 2006.

BHUIYAN, N.A.; ANSARUZZAMAN, M.; KAMRUZZAMAN, M.; ALAM, K.; CHOWDHURY, N.R.; NISHIBUCHI, M.; FARUQUE, S.M.; SACK, D.A.; TAKEDA, Y. NAIR, G.B. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in

Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, p.284-286, 2002.

BLODGETT, R.J. Most probable number from serial dilutions. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. 2003. Appendix 2. Disponível em: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html. Acesso em junho de 2004.

BLOGOSLAWSKI, W.J. Enhancing shellfish depuration. In: OTWELL, W.S.; RODRICK, G.E.; MARTIN, R.E. **Molluscan shellfish depuration**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.145-149.

BLOGOSLAWSKI, W.J.; STEWART, M.E. Depuration and public health. **Journal of the World Mariculture Society**, v.14, p.535-545, 1983.

BOWERS, J. Distribution of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. [mensagem eletrônica]. Mensagem recebida por psobrinho@hotmail.com em 28 de fevereiro de 2007.

BRASHER, C.W.; DePAOLA, A.; JONES, D.D.; BEJ, A.K. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. **Current Microbiology**, v.37, n.2, p.101-107, 1998.

BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C. Risk assessment: a means for linking HACCP plans and public health. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1531-1534, 1998.

BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K.E.; SANDERS, C.V. Infections related to the ingestion of seafood. Part I. Viral and bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases**, v.4, n.4, p.201-212. 2004.

CALIK, H.; MORRISEY, M.T.; RENO, P.W.; AN, H.; Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific Oysters. **Journal of Food Science**, v.67, n.4, p.1506-1510, 2002.

CARNEIRO, M.R.P. **Bactérias de importância à saúde pública presentes em moluscos bivalves e água estuarina de Aracajú, SE**. Rio de Janeiro, 1999. 75p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Fluminense.

CEPA/EPAGRI. Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola. Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2006.** Disponível em: http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese_2006/pesca_2006.pdf. Acesso em: 16 mai. 2007.

CHIOU, C.S.; HSU, S.-Y.; CHIU, S.-I.; WANG, T.-K.; CHAO, C.-S. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, p.4621-4625, 2000.

CHOWDHURY, N.R.; CHAKRABORTY, S.; RAMAMURTHY, T.; NISHIBUCHI, M.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y.; NAIR, G.B. Molecular evidence of clonal *Vibrio*

parahaemolyticus pandemic strains. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, n.6, p.1-8, 2000.

COOK, D.W. Sensitivity of *Vibrio* species in phosphate-buffered saline and in oysters to high pressure treatment. **Journal of Food Protection**, v.66, n.12, p.2276-2292, 2003.

COOK, D.W.; BOWERS, J.C., DePAOLA, A. Density of total and pathogenic (*tdh*+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf Coast molluscan shellfish at harvest. **Journal of Food Protection**, v.65, n.12, p.1873-1880, 2002.

COOK, D.W.; O'LEARY, P.; HUNSUCKER, J.C.; SLOAN, E.M.; BOWERS, J.C.; BLODGETT, R.J.; DePAOLA, A. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Retail Shell Oysters: A National Survey from June 1998 to July 1999. **Journal of Food Protection**, v.65, n.1, p.79-87, 2002b.

COOK, D.W.; RUPLE, A.D. Indicator bacteria and *Vibrionaceae* multiplication in post-harvest shellstock oysters. **Journal of Food Protection**, v.52, n.5, p.343-349, 1989.

CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.2, p.460-465, 2002.

DANIELS, N.A.; MACKINNON, L.; BISHOP, R.; ALTEKRUSE, S.; RAY, R.; HAMMOND, R.M.; THOMPSON, S.; WILSON, S.; BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; SLUTSKER, L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.5, p.1661-1666, 2000.

DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.S.; KARUNAS*ÁGAR*, I.; KARUNAS*ÁGAR*, I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oyster along the Southwest Coast of India. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p.3575-3580, 2005.

DePAOLA, A., NORDSTROM, J.L.; BOWERS, J.C.; WELLS, J.G.; COOK, D.W. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1521-1526, 2003.

DePAOLA, A.; HOPKINS, L.H.; PEELER, J.T.; WENTZ, B.; MCPHEARSON, R.M. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.8, p.2299–2302, 1990.

DePAOLA, A.; KAYSNER, C.A.; BOWERS, J.; COOK, D.W. Environmental investigation of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.11, p.4649-4654, 2000.

DeWAAL, C.S. Safe food from a consumer perspective. **Food Control**, v.14, n.2, p.75-79, 2003.

DORE, I. Oysters. In: DORE, I. **Shellfish: a guide to oysters, mussels, scallops, clams and similar products for the commercial user**. New York: Van Nostrand Reinhold, p.69-109. 1991.

DUAN, J.; SU, Y.C. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two oregon oyster-growing bays. **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.M58-M63, 2005.

ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; JACKSON, L.; TAMPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus, V. vulnificus* and other V*ibrio* ssp. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Gaithersburg: AOAC international, 1998. p.9.01-9.27.

EYLES, M.J.; DAVEY, G.R. Microbiology of commercial depuration of the Sydney Rock oyster, *Crassostrea commercialis*. **Journal of Food Protection**, v.47, n.9, p703-706, 1984.

FIGUEIRÔA, A.C.T.A.; LIMA, N.V.; HOFER, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos marinhos e água no litoral Pernambucano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, Rio de Janeiro, 1997. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p.274.

FLINT, J.A.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.; ANGULO, F.J.; DELONG, S.M.; BRAUN, P.; KIRK, M.; SCALLAN, E.; FITZGERALD, M.; ADAK, G.K.; SOCKETT, P.; ELLIS, A.; HALL, G.; GARGOURI, N.; WALKE, H.; BRAAM, P. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, n.5, p.698-704, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. WORLD HEALTH ORGANIZATION; *CODEX ALIMENTARIUS* COMMISSION. **Guidelines for the obtaining of data of interest for microbiological risk assessment**: Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Hygiene, Bankok, Thailand, 8–13 october 2001. 34th session, Bankok, 2001. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh34/fh01_15e.pdf. Acesso em: 23 abr. 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint Expert Consultation (FAO/WHO). **Microbiological Risk Assessments Series, nº 3. Hazard Characterization for Pathogens in Food and Water – Guidelines**. 2003b. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/pathogen.pdf. Acesso em: 10 mai. 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION; *CODEX ALIMENTARIUS* COMMISSION. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Food Hygiene. **Discussion paper on risk management strategies for *Vibrio* ssp. in seafood**. 35th Session. Orlando, 2003c. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh35/fh0305ce.pdf. Acesso em junho de 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION; *CODEX ALIMENTARIUS* COMMISSION. **Principles and guidelines for the conduct of a microbiological risk assessment**. 1999. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/CAC_GL30.pdf. Acesso em: 10 maio 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION; *CODEX ALIMENTARIUS* COMMISSION. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Food Hygiene. **General Procedures for Risk Assesment**. ALINORM 99/13a, 1999. http://www.fao.org/docrep/meeting/005/X0798E/X0798E00.htm.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood**: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bangkok, Thailand, 5-9 August 2002. Bangkok, 2002. Disponível em: http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/micro/aug2002.pdf. Acesso em: 10 maio 2004.

FRANCO, E.; TOTI, L.; GABRIELI, R.; CROCI, L.; De MEDICI, D.; PANA, A. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* contaminated with hepatitis A virus. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, n.3/4, p.321-328, 1990.

FUENZALIDA, L.; HERNÁNDEZ, C.; TORO, J.; RIOSECO, M.L.; ROMERO, J.; ESPEJO, R.T. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in Southern Chile. **Environmental Microbiology**, v.8, n.4, p.675-683, 2006.

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

GELLI, D.S.; TACHIBANA, T.; SAKUMA, H. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em ostras. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.39, n.1, p.61-66, 1979.

GENTHNER, F.J.; VOLETY, A.K.; OLIVER, L.M.; FISHER, W.S. Factors influencing *in vitro* killing of bacteria by hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.3015-3020, 1999.

GONÇALVES, L.H.B. **Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas em praias de São Luís, Maranhão**. São Luís, 2003. 81p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Maranhão.

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

GOOCH, J.A.; DePAOLA, A.; BOWERS, J.; MARSHALL, D.L. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6, p.970-974, 2002.

HARA-KUDO, Y.; SUGIYAMA, K.; NISHIBUCHI, M.; CHOWDHURY, A.; YATSUYANAGI, J.; OHTOMO, Y.; SAITO, A.; NAGANO, H.; NISHINA, T.; NAKAGAWA, H.; KONUMA, H.; MIYAHARA, M.; KUMAGAI, S. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in

seafood and the coastal environment in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.7, p.3883-3891, 2003.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, v.14, n.3, p.174-175, 1983.

HONDA, T.; NI, Y.; MIWATANI, T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. **Infection and Immunity**, v.56, n.4, p.961-965, 1988.

INSTITUTO DE PESCA. Instituto de Pesca do Estado de São Paulo. Estatística pesqueira. Disponível em: http://www.pesca.sp.gov.br/estatistica/index.php. Acesso em: 16 mai. 2007.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Characteristics of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 513p. (Microorganisms in Foods, 5).

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in food and food products. **Journal Food Protection**, v.61, n.11, p.1075-1086, 1998.

INTERNATIONAL DISEASE SURVEILLANCE CENTER. *Vibrio parahaemolyticus*, Japan 1996-1998. **Infectious Agents Surveillance Report**, v.20, p.1-2, 1999.

JAKABI, M.; GELLI, D.S.; TORRE, J.C.M.D.; RODAS, M.A.B.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M. Inactivation by Ionizing radiation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis*, and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea brasiliana*). **Journal Food Protection**, v.66, n.6, p.1025-1029, 2003.

JIANG, X.; CHAI, T. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, p.1300-1305, 1996.

JOHNSON, H.C.; LISTON, J. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to cold in oysters, fish fillets and crabmeat. **Journal of Food Science**, v.38, n.3, p.437-441, 1973.

JOHNSON, W.G.; SALINGER, A.C.; KING, W.C. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock at two different storage temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.26, n.1, p.122-123, 1973.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA Jr., C.; STOTT, R.F.; LILJA, J.L.; WEKELL, M.M. Incidence of urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.4, p.904–907, 1990.

KAYSNER, C.A.; DePAOLA, A. *Vibrio*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.40, p.405-420.

KAYSNER, C.A.; DePAOLA, A. *Vibrio*. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. 2003. Cap. 9. Disponível em: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html. Acesso em: 31 ago. 2004.

KELLY, M.T.; DAN STROH, E.M. Urease-positive, kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the pacific northwest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.12, p.2820-2822, 1989.

KELLY, M.T.; DINUZZO, A. Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf Coast oysters (Crassostrea virginica). **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.7, p.1548-1549, 1985.

KOH, E.G.L.; HUYN, J.H.; LAROCK, P.A. Pertinence of indicator organisms and sampling variables to *Vibrio* concentrations. **Applied and Environmental Micorbiology**, v.60, n.10, p.3897-3900, 1994.

LAMMERDING, A.M.; FAZIL, A.M. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v.58, n.3, p.147–157, 2000.

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

LAOHAPRERTTHISAN, V.; CHOWDHURY, A.; KONGMUANG, U.; KALNAUWAKUL, S.; ISHIBASHI, M.; MATSUMOTO, C.; NISHIBUCHI, M. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. **Epidemiology and Infection**, v.130, p.395–406, 2003.

LEE, C.Y.; PANICKER, G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLinkk NH microwell plat sandwich hybridization. **Journal of Microbiological Methods**, v.53, n.2, p.199-209, 2003.

LEMOINE, T.; GERMANETTO, P.; GIRAUD, P. Toxi-infection alimentaire collective *Vibrio parahaemolyticus*. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire**, v.10, p.37-38, 1999. Disponível em: http://fulltext.bdsp.tm.fr/Invs/Beh/1999/10/10.pdf?WMK09-M4499-K4JD4-08MQG-J8313. Acesso em: 10 maio 2005.

LEVIN, R.E. *Vibrio parahaemolyticus*, a notably lethal human pathogen derived from seafood: a review of its pathogenicity, characteristics, subspecies characterization, and molecular methods of detection. **Food Biotechnology**, v.20, p.93-128, 2006.

LIRA, A.A.; BARROS, G.G. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados no grande Recife. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador, 1999. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p.370.

LOPES, G.I.S.L. **Depuração de ostra (*Crassostrea brasiliana*) contaminada artificialmente com *Vibrio cholerae O1*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *Salmonella* Enteritidis**. São Paulo, 2001. 90p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MAGALHÃES, M.; TAKEDA, Y.; MAGALHÃES, V.; TATENO, S. Brazilian urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* carry genetic potential to produce the TDH-related hemolysin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.1, p.167-168, 1992.

MAGALHÃES, V.; LIMA, R.A.; TATENO, S.; MAGALHÃES, M. Gastroenteritis humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n.1, p.64-68, 1991.

MARTINEZ-MANZANARES, E.; MORINIGO, M.A.; CASTRO, D.; BALEBONA, M.C.; MUÑOZ, M.A. Relationships between indicators of faecal pollution in shellfish-growing water and the occurrence of human pathogenic microorganisms in shellfish. **Journal of Food Protection**, v.55, n.8, p.609-614, 1992.

MATSUMOTO, C.; OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; IWANAGA, M.; GARG, P.; RAMMAMURTHY, T.; WONG, H.; DePAOLA, A.; KIM, Y.; ALBERT, M.; NISHIBUCHI, M. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.2, p.578-585, 2000.

MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; RIVERA, I.G.; MARTINS, M.T. Distribution of potentially pathogenic *Vibrios* in oysters from a tropical region. **Journal of Food Protection**, v.57, n.10, p.870-873, 1994.

McCARTHY, S.A.; KHAMBATY, F.M. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.7, p.2597-2601, 1994.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related Illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MENDES, E.S.; MENDES, P.P.; LOPES, C.A.M.; COELHO, M.I.S.; SOUZA, J.C.R.; CRUZ, M.C.S.; ASSIS, A.S. Sazonalidade dos microrganismos em ostras consumidas na Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.18, n.116-117, 2004.

MERRELL, B.R.; WALKER, R.I.; JOSEPH, S.W. *In vitro* and *in vivo* pathologic effects of *Vibrio parahaemolyticus* on human epithelial cells. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.381-388, 1984.

MILES, D.W.; ROSS, T.; OLLEY, J.; MCKEEKIN, T.A. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus.* **International Journal of Food Microbiology**, v.38, n.2-3, p.133-142, 1997.

MONTGOMERY, D.C.; RANGER, G.C. **Applied statistics and probability for engineers**. New York : Wiley, 3rd ed. 706 p. 2003.

MUNTADA GARRIGA, J.M., RODRIGUEZ JEREZ, J.J.; LOPEZ-SABATER, E.I.; MORA-VENTURA, M.T. Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, n.4, p.225-227, 1995.

MURPHREE, R.L.; TAMPLIN, M.L. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.10, p.3656-3660, 1991.

NISHIBUCHI, M.; ISHIBASHI, M.; TAKEDA, Y.; KAPER, J.B. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in DNA colony hybridization test. **Infection and Immunity**, v.49, n.3, p.481-486, 1985.

NISHIBUCHI, M.; KAPER, B. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. **Molecular Microbiology**, v.4, n.1, p.87-99, 1990.

NISHIBUCHI, M.; KAPER, J.B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. **Infection and Immunity**, v.63, n.6, p.2093-2099, 1995.

NORDSTROM, J.L.; KAYSNER, C.A.; BLACKSTONE, G.M.; VICKERY, M.C.L.; BOWERS, J.C.; DePAOLA, A. Effect of intertidal exposure on *Vibrio parahaemolyticus* levels in Pacific Northwest oysters. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2178-2182, 2004.

OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; ABBOTT, I.; JANDA, J.; NISHIBUCHI, M. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*- related hemolysin (*trh*) genes in the uréase-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.1965-1971, 1997a.

OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; HAYAKAWA, E.; NISHINO, T.; TAKEDA, Y.; MUKHOPADHYAY, A.; GARG, S.; BHATTACHARYA, S.; NAIR, G.; NISHIBUCHI, M. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.12, p.3150-3135, 1997.

OKUDA, J.; NISHIBUCHI, M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct hemolysin. **Molecular Microbiology**, v.30, n.3, p.499-511, 1998.

OLEA, A.M.; GONZÁLEZ, C.; CHIU, M.; VALLEBUONA, C.; LABRAÑA, M.; MARTINIELLO, F. Brote de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Chile. **Revista Chilena de Salud Pública**, v.9, n.1, p.51-53, 2005.

OLIVER, J.D.; KAPER, J.B. *Vibrio* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., eds. **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. 2.ed. Washington: ASM Press, 2001. 872p.

PACE, J.; CHAI, T.J. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* grown in estuarine water and rich medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.8, p.1877-1887, 1989.

PACE, J.L.; CHAI, T.; ROSSI, H.A.; JIANG, X. Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.6, p.2372-2377, 1997.

PALISADE CORPORATION. @Risk. Risk analysis and simulation add-in for Microsoft® Excel - Guide to using. Ithaca, NY, USA. Version 4.5, 2005

PAN, T.M.; WANG, T.K.; LEE, C.L.; CHIEN, S.W.; HORNG, C.B. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.5, p.1260-1262, 1997.

PARK, K.S.; IIDA, T.; YAMAICHI, Y.; OYAGI, T.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T. Genetic characterization of DNA Region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, v.68, n.10, p.5742-5748, 2000.

PARVATHI, A.; KUMAR, H.S.; BHANUMATHI, A.; ISHIBASHI, M.; NISHIBUCHI, M.; KARUNAS*ÁGAR*, I.; KARUNAS*ÁGAR*, I. Molecular characterization of thermostable direct haemolysin-related haemolysin (TRH)-positive *Vibrio parahaemolyticus* from oysters in Mangalore, India. **Environmental Microbiology**, v.8, n.6, p.997-1004, 2006.

PATRICIO, M.I.A.; ANGELO, M.R.F.; MIRALLES, I.S.; GONDIM, M.M. Unusual outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in hotel during an event, Fortaleza-CE, Brasil, 2002. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, Florianópolis, 2003. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. p.145.

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

PEREIRA, M.A. **Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) e estudo da ação sinérgica da substância antimicrobiana produzida por *Bacillus amyloliquefaciens***. Santa Catarina, 2004. 92p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina.

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

RICHARDS, G.P. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. **Journal of Food Protection**, v.51, n.3, p.218-251, 1988.

RIPPEY, S.R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.4, p.419-425, 1994.

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

ROBERT-PILLOT, A.; GUE'NOLE', A.; LESNE, J.; DELESMONT, R.; FOURNIER, J.M.; QUILICI, M.L. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n.3, p.319-325, 2004.

RODRICK, G.E.; SCHNEIDER, K.R. Vibrios in depuration. In: OTWELL, W.S.; RODRICK, G.E.; RODRICK, G.E.; MARTIN, R.E. **Molluscan shellfish depuration**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.115-125.

RODRICKS, J.V. Risk assessment, the environment, and public health. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n.3, p.258-264, 1994.

RODRIGUES, D.P.; HOFER, E. *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.17, n.4, p.332-338, 1986.

RODRIGUES, P.F. **Caracterização sanitária de áreas de criação de moluscos bivalvos do litoral norte do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1998. 66p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T., eds. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.3.

SANYAL, S. C.; SEN, P. C. Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. p. 227-230. *In* Fujino, T.; Sakaguchi, G.; Sakazaki, R.; Takeda, Y. (eds), International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon Publishing Company, Tokyo. 1974.

SARKAR, B.L.; NAIR, G.B.; BANERJEE, A.K.; PAL, S.C. Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater environs and in association with freshwater fishes in Calcutta. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n.1, p.132-136, 1985.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8 for Windows. Cary: SAS Institute, 2003. CD-ROM.

SHIARIS, M.P.; REX, A.C.; PETTIBONE, G.W.; KEAY, K.; McMANUS, P.; REX, M.A.; EBERSOLE, J.; GALLAGHER, E. Distribution of indicator bacteria and *Vibrio parahaemolyticus* in sewage-polluted intertidal sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.8, p.1756-1761, 1987.

SHIRAI, H., ITO, H.; HIRAYAMA, T.; NAKAMOTO, Y.; NAKABAYASHI, N.; KUMAGAI, K.; TAKEDA, Y.; NISHIBUCHI, M. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. **Infection and Immunity**, v.58, n.11, p.3568–3573, 1990.

SINGLETON, F.L.; ATTWELL, R.W.; JANGI, M.S.; COLWELL, R.R. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.5, p.1080-1085, 1982.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M. Fators involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, p.696-708, 1995.

SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENEZES, F.G.R.; REIS, C.M.F.; HOFER, E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from natural nursery in the cocó river estuary, Fortaleza, Ceará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.2, p.59-62, 2004.

TALL, B.D.; LAPEYRE, J.F.; BIER, J.W.; MILIOTIS, M.D.; HANES, D.E.; KOTHARY, M.H.; SHAH, D.B.; FAISAL, M. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassotrea virginica*) hemocytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.4261-4263, 1999.

TAMPLIN, M.L.; CAPERS, G.M. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.5, p.1506-1510, 1992.

TEUNIS, P.F.; HAVELAAR, A.H. The Beta Poisson dose-response model is not a single-hit. **Risk Analysis**, v.20, n.4, p.513-520, 2000.

THOMSON, W.K.; THACKER, C.L. Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperature. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.6, p.156-158, 1973.

TWEDT, R.M. *Vibrio parahaemolyticus*. In: DOYLE, M.P., ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. cap.13, p.543-568.

UNITED STATES. U.S. Environmental Protection Agency. Risk Assessment Forum. Guiding Principles for Monte Carlo Analysis. Washington, DC. EPA/630/R-97/001. 1997. Disponível em: www.epa.gov/ncea/raf/**monte**car.pdf. Acesso em: 14. ago. 2004.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters-Pacific Northwest, 1997. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.47, n.22, p.457-462, 1998.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound - Connecticut, New Jersey and New York, 1998. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.48, n.3, p.48-51, 1999.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. Disease Listing. Foodborne Infections. Technical Information. **Foodborne Illness**. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_t.htm. Acesso em: 9 dez. 2005.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. *Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with

Consumption of Raw Shellfish —Three States, 2006. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.55, n.31, p.854-856, 2006.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. ***Vibrio* surveillance system, summary data, 1997-1998**. Atlanta, 1999a. Disponível em: http://www.cdc.gov/ foodborneoutbreaks/vibriosum/cstevib99.pdf. Acesso em: 16 jun. 2004.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Irradiation in the production, processing, and handling of food. **Federal Register**, v.70, n.157, p.48057-48073, 2005a.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters**: prepared by the *Vibrio parahaemolyticus* risk assessment task force. 2005b. Disponível em http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vpra-toc.html. Acesso em: 23 ago. 2005.

VANDERZANT, C.; NICKELSON, R. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. **Applied Microbiology**, v.23, n.1, p.34-37, 1972.

VOSE, D. **Risk analysis – A quantitative guide**. England: John Wiley & Sons, LTD. 2ª edition. 2000.

WACHSMUTH, K.; KAUSE, J.; MACZKA, C.; EBEL, E.; SCHLOSSER, W.; ANDERSON, S. Microbial risk assessment as a tool for guiding food safety. In: MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W., eds. **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, 2003. cap.51, p.799-824.

WATKINS, W.D.; CABELLI, V.J. Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n.5, p.1307-1313, 1985.

WONG, H.-C.; LIU, S.-S.; WANG, T.-K.; LEE, C.-L.; CHIOU, C.-S.; LIU, D.-P.; NISHIBUCHI, M.; LEE, B.-K. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.9, p.3981-3986, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Application of risk analysis to food standards issues**: report of the joint FAO/WHO expert consultation, Geneva, Switzerland, 13-17 March 1995. Geneva, 1995. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/march1995.pdf. Acesso em: 15 set. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites. Media Centre. Fact Sheets. **Food safety and foodborne illness**. 2002a. (Fact Sheet, n.237). Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/. Acesso em: 10 jun. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites. Media Centre. Fact Sheets. **Foodborne diseases, emerging**. 2002b. (Fact Sheet, n.124). 2002b. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/. Acesso em: 10 jun. 2006.

ZHANG, X.H.; AUSTIN, B. Haemolysins in *Vibrio* species. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.5, p.1011-1019, 2005.

Apêndice A

Tabela 20. Descrição do modelo desenvolvido em planilha do Microsoft Excel (apresentada a seguir) para avaliação do risco de doença, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, associado ao consumo de ostras cruas na primavera, os procedimentos nas demais estações do ano são semelhantes.

VARIÁVEIS	CÉLULA	DESCRIÇÃO
Parâmetros da temperatura da água do mar. Nas simulações de incerteza, novos valores da média e desvio padrão foram inseridos nas respectivas células.	D5	Média da temperatura média diária da água do mar na primavera
	D6	Desvio padrão da temperatura média diária da água do mar na primavera
Distribuição da temperatura da água do mar.	D8	Os valores da temperatura da água são selecionados de uma distribuição Normal com média igual a D5 e desvio padrão igual a D6.
Equação de regressão da densidade de Vp total em ostras em função da temperatura da água do mar	C11	Intercepto da equação de regressão
	C12	Coeficiente angular ou inclinação da equação de regressão
	C13	Desvio padrão da distribuição de erro associado ao ajuste da equação.
Distribuição da população de Vp total em ostras na etapa de cultivo. Se o valor da população for maior que 7 $\log_{10}$(NMP/g), então a população é truncada na célula D16.	D15	D15 = C11 + C12*D8 + Normal(0;C13)
Distribuição da porcentagem de Vp patogênico	C17	Distribuição Beta(2;2243) representando a porcentagem de Vp patogênico em relação a Vp total.
Distribuição da população de Vp patogênico em ostras na etapa de cultivo. Se o valor da população for maior que a população máxima de Vp patogênico (célula C19), então a população é truncada na célula E22.	E21	E21 = LOG(C17)+D15
Distribuição do tempo de coleta	C30	Distribuição Pert(2; 4; 8)
Distribuição do tempo e que as ostras ficam expostas ao ar (tempo fora da água)	C31	Distribuição Uniform (1;C30)
Parâmetros da distribuição da temperatura do ar	D34	Média da temperatura média diária do ar na primavera
	D35	Desvio padrão da temperatura média diária do ar na primavera
Distribuição da temperatura média diária do ar no município de Cananéia, SP.	D37	Distribuição Normal (D34; D35)

Continuação da Tabela 18.

VARIÁVEIS	CÉLULA	DESCRIÇÃO
Estimativa da taxa de multiplicação de Vp em ostras expostas ao ar	E45	60*D40*D40/C42 onde D40 é a taxa de multiplicação máxima de Vp em ostras expostas a temperatura do ar (D37), obtida com a equação utilizada por Miles et al. (1997)
Estimativa de crescimento da população de Vp em ostras durante o transporte do local de cultivo até a indústria	E48	D45*C31
Efeito do processo de depuração com ozônio sobre a população de Vp em ostras	C57	Distribuição Normal(-0,72; 0,38)
Efeito do processo de depuração com luz ultravioleta sobre a população de Vp em ostras	C58	Distribuição Normal(0,03; 0,35)
Efeito conjugado dos processos de depuração	C60	Distribuição Discreta(C57;C58;0,5;0,5)
Distribuição da temperatura de transporte das ostras da indústria até os pontos de comercialização	C73	Distribuição Logística(19,9; 2,1)
Parâmetros da distribuição de transporte das ostras da indústria até os pontos de comercialização	C77 e C78	Distribuição uniforme(16;24) para os pontos de comercialização na Grande São Paulo, Baixada Santista e Litoral Sul (C77). Distribuição Uniforme(16;44) para os pontos de comercialização no interior do Estado e Litoral Norte.
Distribuição do tempo de transporte das ostras da indústria até os pontos de comercialização	C80	Distribuição Discreta(C77;C78; 0,9;0,1)
Estimativa da taxa de multiplicação de Vp em ostras expostas ao ar	C90	60*C84*C84/C86 onde C84 é a taxa de multiplicação máxima de Vp em ostras expostas a temperatura de transporte (C73), obtida com a equação utilizada por Miles et al. (1997)
Estimativa de crescimento da população de Vp em ostras durante o transporte das ostras da indústria até os pontos de comercialização	C94	C90*C80
Tempo de estocagem das ostras nos pontos de comercialização	C106	Distribuição Uniforme(4;120)
Estimativa da população de Vp patogênico no momento do consumo	E114	E100-C103*C106; onde E100 é a densidade de Vp patogênico no momento da entrega nos pontos de comercialização e C103 é a taxa de redução de Vp patogênico durante o tempo de estocagem.

Continuação da Tabela 18.

VARIÁVEIS	CÉLULA	DESCRIÇÃO
Distribuição do peso por ostra consumida	C118	Distribuição LogNormal(6,86;2,43)
Distribuição do número de ostras consumidas	C120	Distribuição Discreta(6;12;0,5;0,5)
Distribuição da quantidade de ostras consumidas	C125	C118*C120
Distribuição da população de Vp (NMP) patogênico ingerida por porção	E131	10^E114*C125
Probabilidade da ocorrência de doenças associada ao consumo de uma porção de ostras	E149	1-(1+Poisson(E131)/C140)^(-C139); onde C139 e C140 representam os parâmetros do modelo dose-resposta (Beta-Poisson)
Distribuição do número de casos de doença causada por Vp.	E169	E149*C162*B169

Modelo para avaliação do risco de *Vibrio parahaemolyticus* associado ao consumo de ostra crua

			Primav		Verão		Outono		Inverno	
Parâmetros temp. da água										
	média(μ)		24,11		27,02		23,99		20,34	
	média(σ)		1,70		1,01		2,12		1,05	
Distribuição da Temperatura da água (ºC)			24,11		27,02		23,99		20,34	
Relação Vp-Temperatura										
	intercept	**-0,944**								
	slope	**0,175**								
	sigma	**0,971**								
Log Vptotal no cultivo [log(NMP/g)]			3,28		3,79		3,26		2,62	
		Truncado	3,28		3,79		3,26		2,62	
	%Vptotal que é Vppatog =	**0,0891%**								
	Densidade máxima de Vppatog =	**3,95**								
Log Vppatog no cultivo [log(NMP/g)]				0,228		0,74		0,21		-0,43
		Truncado		0,228		0,74		0,21		-0,43
Etapa Pós-Coleta/ Transporte até a indústria										
Parâmetros da Coleta										
	tempo mín (horas)	**2**								
	tempo provável (horas)	**4**								
	tempo max (horas)	**8**								
	Tempo de Coleta (horas)	**4,3**								
	Tempo fora da água (horas)	**2,7**								
Parâmetros da Temperatura do Ar (ºC)										
		média(μ)	-1,48		-1,98		-1,96		-1,49	
		média(σ)	2,09		2,03		2,32		2,47	
Distribuição Temperatura do Ar (ºC)			22,63		25,04		22,03		18,85	
Raiz da Máxima Taxa de Crescimento de Vp			0,100	0,100	0,114	0,114	0,096	0,096	0,078	0,078

Parâmetros para crescimento de Vp	
a_w	0,985
b	0,0356
c	0,34
T_min	278,5 K
T_max	319,6 K
a_w_min	0,921
a_w_max	0,998
d	263,64 K
lag	0 h

Modelo

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
42	Fator crescimento Caldo/Ostra		**4,54**								
43	(Miles e Gooch)-RiskTriang(3;4;5)										
44											
45	Estimativa da Taxa de Crescimento em Ostras			0,132	0,132	0,172	0,172	0,123	0,123	0,080	0,080
46	(log por hora)										
47											
48	Estimativa de Crescimento durante a coleta e			0,352	0,352	0,458	0,458	0,328	0,328	0,214	0,214
49	transporte até início da depuração										
50											
51											
52	Log Vp antes da depuração [log(NMP/g)]			3,63	0,580	4,25	1,195	3,58	0,534	2,83	-0,218
53											
54	**Etapa Pós-Coleta/ Processo de Depuração**			**Primavera**		**Verão**		**Outono**		**Inverno**	
55											
56	Processo de Depuração										
57	Ozônio	1	**-0,72**								
58	Ultra Violeta	1	**0,03**								
59											
60	Efeito conjugado da depuração		**0,034**								
61											
62											
63											
64	Log Vp depois da depuração [log(NMP/g)]										
65											
66											
67				3,66	0,61	4,28	1,23	3,62	0,57	2,87	-0,18
68											
69	**Etapa Pós-Coleta / Transporte até o Comércio**			**Primavera**		**Verão**		**Outono**		**Inverno**	
70											
71	Disribuição da Temperatura de Transporte (ºC)										
72											
73	Temperatura de Transporte		**19,94**								
74											
75	Parâmetros do tempo de transporte até varejo										
76			**p**								
77	São Paulo/Baixada	20	0,90								
78	Litoral Norte	41	0,10								
79											
80	Distribuição Tempo de Transporte (h)		**20**								
81											
82											
83	Raiz da Máxima Taxa de Crescimento de Vp										

Modelo

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
83	Raiz da Máxima Taxa de Crescimento de Vp													
84			**0,084**											
85														
86	Fator crescimento Caldo/Ostra		**4,54**											
87	(Miles e Gooch)-RiskTriang(3;4;5)													
88														
89	Estimativa da Taxa de Crescimento em Ostras													
90	(log por hora)		**0,094**											
91														
92	Estimativa de Crescimento durante Transporte													
93	até o início da refrigeração													
94			**1,88**											
95														
96	Log Vp depois do transporte [log(NMP/g)]													
97														
98														
99														
100				5,54	2,49	6,16	3,11	5,50	2,45	4,74	1,69			
101														
102	Taxa de redução de Vp em ostra depois de refrigerado													
103	log(NMP/g)/h		**0,007**											
104														
105														
106	Tempo estocagem no varejo		**62**											
107	até consumo (h)													
108														
109														
110	Estimativa de Vp no momento do consumo													
111	em [log(NMP/g)]													
112														
113														
114				**5,11**	**2,06**	**5,72**	**2,67**	**5,06**	**2,01**	**4,31**	**1,26**			
115														
116	**Etapa de Consumo**			**Primavera**		**Verão**		**Outono**		**Inverno**				
117														
118	Peso por ostras (gramas)		**11,14**											
119														
120	Número de Ostras por Porção Servida		**6**											
121		6	0,5											
122		12	0,5											
123														
124	Quantidade de ostras consumidas													

Modelo

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
124	Quantidade de ostras consumidas										
125	por porção servida (g)		**66,8**								
126											
127	Estimativa de Vp total por porção servida										
128	em NMP										
129											
130											
131				8,6E+06	7,6E+03	3,5E+07	3,1E+04	7,7E+06	6,9E+03	1,4E+06	1,2E+03
132											
133	Vp patogênico consumido (NMP)										
134											
135											
136					**7634**		**31473**		**6877**		**1217**
137											
138	Parâmetros Dose-resposta										
139	(Beta-Poisson)	alfa	**0,52**								
140		beta	**97862872,2**								
141											
142											
143											
144	Probabilidade de Doença por porção										
145											
146											
147											
148											
149					**4,06E-05**		**0,000167**		**3,65E-05**		**6,47E-06**
150											
151	Comércio de Ostras (dúzias)/ Número de Porções										
152											
153	Ano	Empresa A	Empresa B								
154											
155	2002	31100									
156	2003	28900									
157	2004	21800	100000								
158	2005	30600	85000								
159	média	28100	92500								
160		28100	92500								
161		23%	77%								
162			160800								
163	Nº de doenças										
164											
165	**Consumo de Ostras**										
166	Verão	50%									
167	Outono	18%									
168	Inverno	13%									
169	Primavera	19%			**1**		**13**		**1**		**0**
170											

Modelo

Apêndice B

Dados Temperatura da água do mar

Primavera		Verão		Outono		Inverno	
média	dpadrão	média	dpadrão	média	dpadrão	média	dpadrão
24,34	1,80	26,97	1,07	23,77	1,76	20,41	1,13
23,91	1,62	27,95	1,42	24,79	1,88	20,56	1,14
24,21	1,76	26,90	0,78	23,20	2,41	19,96	1,02
23,11	1,50	27,15	1,12	23,17	2,27	20,14	1,00
23,62	1,67	26,65	0,71	21,92	3,08	20,26	1,02
23,95	1,69	26,82	1,18	25,17	1,37	20,34	1,08
23,21	1,43	26,48	0,91	24,21	2,32	20,47	1,23
23,63	1,60	25,99	0,57	25,87	1,30	20,52	1,18
24,85	1,79	26,47	1,02	22,51	2,12	20,21	0,91
23,91	1,50	25,06	0,19	21,80	3,32	20,78	1,15
23,22	1,45	27,58	1,41	23,24	2,30	20,75	1,22
24,29	1,66	26,28	0,86	22,02	2,56	20,30	0,98
24,14	1,65	26,80	0,77	25,66	1,31	20,42	0,98
23,46	1,59	28,60	1,59	23,69	1,88	20,19	1,13
24,26	1,59	27,36	1,23	23,13	2,40	20,01	0,98
24,71	1,84	27,36	0,91	23,03	2,16	20,80	1,25
23,64	1,55	27,07	0,97	23,15	2,79	20,01	0,88
24,95	1,79	27,24	1,07	26,53	1,41	20,31	1,05
24,48	1,73	27,36	0,97	25,17	1,78	20,45	0,99
24,57	1,83	28,74	1,29	23,52	2,00	20,45	1,16
23,76	1,63	27,38	0,99	24,29	1,67	20,42	1,27
23,59	1,54	26,41	0,68	25,30	1,43	20,06	0,83
24,50	1,84	26,49	0,68	24,60	2,22	20,56	1,05
23,41	1,43	26,50	0,94	23,38	2,61	20,16	0,96
24,03	1,72	26,58	0,51	24,45	2,09	20,07	1,08
24,51	1,90	27,07	0,95	24,82	1,49	20,54	0,97
24,80	1,96	27,10	1,30	24,78	1,73	20,09	1,00
24,15	1,74	27,21	0,95	23,59	1,70	20,02	1,00
23,44	1,37	26,99	0,64	24,36	2,10	20,59	0,92
24,13	1,51	26,74	1,06	22,84	2,19	19,98	0,91
24,42	1,84	26,86	0,87	24,05	2,26	20,99	0,96
24,35	1,82	27,70	0,91	24,83	2,35	20,71	1,15
24,33	1,71	28,09	1,55	25,07	1,15	19,85	0,81
24,13	1,69	27,55	1,37	23,05	2,32	20,49	1,07
23,69	1,69	26,26	0,93	24,21	2,31	19,82	0,84
23,26	1,59	27,17	0,78	22,18	2,44	20,63	1,14
24,07	1,71	27,18	1,00	23,59	2,22	20,29	1,20
24,07	1,68	26,61	0,84	22,68	2,77	20,04	0,98

Valores para simulação de incerteza do modelo
(Vp em função da Temperatura da água do mar)

intercept	Tágua	dpadrão
-0,94396	0,1751	0,97072
0,76047	0,10231	0,90924
-0,36261	0,14591	0,96855
-1,02922	0,18181	0,97699
-1,4938	0,1947	0,98655
-0,89039	0,17183	0,9607
-0,39475	0,1489	0,94392
-0,61386	0,15759	0,96162
-0,09772	0,14196	0,90224
-0,17712	0,14714	0,96947
-0,79067	0,17545	0,93333
-0,55132	0,15888	0,93248
-2,38992	0,24108	0,96735
-1,08121	0,18076	0,97029
-1,18787	0,18566	1,07265
-0,97263	0,17804	0,85598
-1,11615	0,18454	0,93629
-1,19692	0,19005	0,99492
-0,63559	0,16203	0,931
-0,8428	0,16562	1,00142
-0,98619	0,18317	0,97143
-1,42418	0,19472	0,98252
-2,07008	0,22488	0,97143
-1,91477	0,21479	0,888
-2,12027	0,22696	0,98347
-1,63569	0,20224	0,96669
-1,14445	0,18198	0,88675
-1,00188	0,17787	1,0109
-0,052	0,13952	0,99041
-1,57017	0,20188	1,07922
-0,47564	0,15792	0,86675
-1,30382	0,19314	1,01206
-1,69605	0,20059	0,99138
-1,16364	0,18982	1,00943
-1,46897	0,19119	0,98102
-0,21687	0,14415	0,99761
-0,82684	0,16951	0,95555
-0,1629	0,14601	0,81669

Fator de Crescimento de Vp em caldo e em ostras
(Modelado Triangular(3;4;5))
Vpcaldo = (Fator)*VpOstras

4,74
3,78
4,54
4,14
4,30
4,17
4,65
4,47
3,90
4,20
4,18
3,83
4,42
3,90
4,01
4,23
4,21
4,78
4,49
3,94
4,52
3,77
4,20
3,46
3,78
3,83
4,14
4,19
3,98
4,07
4,26
4,19
3,36
3,37
4,41
3,71
4,00
3,10
4,41

Modelo

Apêndice C

	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP
1							
2		Parâmetros da Dose-resposta					
3		(modelo Beta-Poisson)					
4		(Obtidos do FDA, 2005)					
5							
6							
7		0,52	97862872				
8		0,69	11751462				
9		1	48753803				
10		8,59	3,51E+08				
11		6,92	1,22E+08				
12		0,43	8238829				
13		0,69	11751462				
14		35,81	1,47E+10				
15		1	48753803				
16		35,81	1,47E+10				
17		6,92	1,22E+08				
18		1	48753803				
981		20,84	5,39E+09				
982		0,52	97862872				
983		1	48753803				
984		0,47	40623614				
985		1	48753803				
986		0,52	97862872				
987		0,6	35560454				
988		0,32	6960692				
989		0,32	6960692				
990		0,47	40623614				
991		0,6	35560454				
992		1	48753803				
993		0,6	35560454				
994		0,43	8238829				
995		0,6	35560454				
996		0,32	6960692				
997		0,47	40623614				
998		1	48753803				
999		8,59	3,51E+08				
1000		0,52	97862872				
1001		0,6	35560454				
1002		14,87	2,38E+09				
1003		0,6	35560454				
1004		0,47	40623614				
1005		0,32	6960692				
1006		1	48753803				
1007							
1008							
1009							

Modelo