

**Ocorrência de *Vibrio spp* potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil.**

**Suzi de Almeida Vasconcelos Barboni**

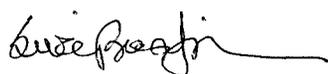
**Tese apresentada ao Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Saúde Pública.**

**Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Glavur R. Matté**

**São Paulo  
2003**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura: 

Data: 13 mai 2003

43 822 | 2003 doe

Esta pesquisa foi executada com apoio das seguintes Instituições:

Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS/Bahia)

Universidade de São Paulo/Faculdade de Saúde Pública (FSP/USP)

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

CAPES/PICDT

*“Prometo cumprir  
com dignidade, consciência  
e probidade  
os deveres do profissional  
de Saúde Pública  
e tudo farei  
com dedicação e zelo  
pela melhoria do nível de saúde  
do meu povo do meu país”.*

(Juramento dos Sanitaristas elaborado pela Congregação da Faculdade de Saúde Pública da  
Universidade de São Paulo, em 1946)

*“El Rei D. João III de Portugal, que está em glória, estava tão afeiçoado ao Estado do Brasil, especialmente à Baía de Todos os Santos, que, se vivera mais alguns anos, edificaria nele um dos mais notáveis reinos do mundo, e engrandecera a cidade do Salvador de feição que se pudera contar entre as mais notáveis de seus reinos, para o que ela estava mui capaz, e agora o está ainda mais em poder e aparelho para isso, porque é senhora desta baía, que é a maior e mais formosa que se sabe pelo mundo, assim em grandeza como em fertilidade e riqueza. Porque esta baía é grande e de bons ares, mui delgados e sadios, de muito frescas e delgadas águas, e mui abastada de mantimentos naturais da terra, de muita caça, e muitos e mui saborosos pescados e frutas.” (...)*

*(...) “Pois queremos manifestar as grandezas da Baía de Todos os Santos, a fertilidade da terra e a abastança de mantimentos, frutos e caça dela, convém que se saiba se tem o mar tão abundoso de pescado e marisco como tem a terra.”*

*(SOARES 1587)*

*“Lembre-se do rosto dos mais pobres e fracos que você viu e pergunte-se se as etapas que tem atingido lhes foram de alguma utilidade. Se lhes foram de algum ganho. Se lhes estabeleceram o controle sobre a própria vida e destino.”*

*Mahatma Gandhi*



**“Vendedora de mariscos da Bahia”** — serigrafia de Coré feita especialmente para este trabalho.

## DEDICATÓRIA

A Deus e aos Bondosos Amigos Espirituais, em especial ao Dr. André Luiz e sua equipe de mensageiros, que me concederam a oportunidade de realização deste Doutorado e, durante sua execução, assistiram-me com suas luzes, proteção e intuições, orientando-me, inspirando-me e estimulando, em meu coração, a realização deste trabalho que se destina principalmente a auxiliar à melhoria da qualidade de vida do meu povo.

À

André Renê Barboni, meu amor.

Antônio Rafael, Viviana Graziela e Natália Caroline, minha vida.

Minha mãe Dejazet, minha luz.

Às minhas madrinhas Sr.<sup>a</sup> Almerinda Bezerra de Brito e Sr.<sup>a</sup> Devanice Almeida da Cruz, simbolizando o agradecimento aos meus familiares pelas orações, pelos constantes carinho e incentivo que tenho recebido.

Aos queridos e inesquecíveis: Antonio Teófilo Moreira Vasconcelos, Esther Vasconcelos Ferreira, Laurentina Ferreira Guimarães, Valdir Guimarães de Almeida e Maria José Amaral que, da Pátria Espiritual, se emocionam comigo.

## AGRADECIMENTOS

*“E o homem da universidade imagina que tem de reprimir a emoção para produzir...”* (Milton Santos).

A caminhada para este Doutorado é uma história de vida, que não termina com a defesa desta Tese. Durante a sua realização contei com valiosas colaborações das mais diversas naturezas, mas todas fundamentais, as quais rendo esta homenagem (ainda que limitada por palavras, mas com o coração cheio de gratidão), pedindo a Deus que estes agradecimentos se transformem em bênçãos luminosas para todos aqui citados:

“Na beleza dos frutos, está o trabalho silencioso das raízes”. Com este pensamento, agradeço aos professores que tive, aqueles que pacientemente descortinaram os caminhos do saber e que contribuíram com seus exemplos de profissionalismo, honestidade, competência e dedicação para minha formação seja como professora seja como cientista: Prof.<sup>a</sup> Ana Angélica Cerqueira (Anita); Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Borges; Prof.<sup>a</sup> Margarida Lago de Castro; Prof. Ademar Lima Mendes; Prof.<sup>a</sup> Rosalva Simões Oliveira; Prof.<sup>a</sup> Yvone Mattos Cerqueira; Prof.<sup>a</sup> Yara Cunha Pires; Prof.<sup>a</sup> Cleoilda Souza Oliveira; Prof. Elói Barreto; Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kumiko Mizuta; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maristella de Oliveira Azevedo; Prof. Dr. José Geraldo Wanderley Marques.

Ao Prof. Dr. Glavur Rogério Matté (FSP/USP), que concebeu e orientou este trabalho, pelas sugestões feitas no seu decurso.

Aos irmãos do Movimento Espírita de Feira de Santana (BA), em especial aqueles que compõem a família de laços espirituais do Centro Espírita Jesus de Nazaré, pelas preces, pelos cartões e telefonemas, pelo carinho sincero e constante incentivo, fontes de energia pura, revigorante e salutar para a minha caminhada.

Aos amigos de todas as horas, companheiros de todas as “frias”, corações repletos de amor e compreensão, braços e ombros solidários sempre presentes, agradeço nas pessoas de Jorge Guilherme da Silva e Martha C. Ambrósio Laboissière.

À equipe de Coordenação do Doutorado em Saúde Pública/USP em convênio com a UEFS, nas pessoas da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Evelyn Naked Castro Sá (USP) e Sra. Tânia Lago (UEFS).

Aos professores das disciplinas ministradas durante o Doutorado pelo legado do conhecimento em Saúde Pública, destacando a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabina Léa Davidson Gotlieb e o Prof. Dr. Eurivaldo Sampaio.

Aos colegas de turma do Doutorado pela convivência e o companheirismo nos estudos e nas tarefas, em especial, Creuza Brito e Tecia Daltro Borges Alves: amigas sinceras que permanecem.

Aos sempre atenciosos e prestativos amigos do Laboratório de Apoio Didático do Departamento de Ciências Biológicas da UEFS: Cleóbula, Dimael, D. Lourdes, Elmário, Zenaide, Lindinalva, Sr. Altino, Maria José, Luciana e Verônica.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular da Faculdade de Saúde Pública da USP: Viraneide, Miriam, Milena, Marisa, Lígia, Andréa, Solange, Suzete, Rita, Agnes e Alexandre, pela paciência, ajuda, compreensão, carinho e cordialidade, que me sustentaram. Houveram muitos obstáculos até a concretização desta tese. Com vocês, a superação foi possível.

Aos colegas professores e cientistas pelas sugestões que beneficiaram este trabalho, bem como pelas referências bibliográficas fornecidas: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Matté (FSP/USP); Prof.<sup>a</sup> Suani de Almeida Vasconcelos (DLet/UEFS); Dra. Ana Carolina Paulo Vicente (FIOCRUZ/RJ); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Petra Sanchez Sanchez (Universidade Mackenzie/SP); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eneida Moraes Marcílio Cerqueira (DCBio/UEFS); Prof.<sup>a</sup> Gizélia Vieira dos Santos (DCBio/UEFS); Prof. Dr. Carlos Wallace Moura (DCBio/UEFS); Prof. Miguel Accioly (IB/UFBA); Prof. Jucelmo Dantas (DCBio/UEFS); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Martha C. Ambrósio Laboissière (UnB/DF); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane E. Azevedo (DCBio/UEFS); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marluce Assis (DSau/UEFS); Prof. Dr. Eliseu Alves Waldman (FSP/USP); Prof. Associado José Luiz Negrão Mucci (FSP/USP).

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Inez Zanoli Sato (CETESB/SP) pelas sugestões e pelo auxílio prestado na execução da sorologia das cepas de *V. cholerae*.

A UEFS, escola que me formou em Ciências Biológicas, onde iniciei os primeiros passos rumo às Ciências e onde, hoje, sou professora do Departamento de Ciências Biológicas. Meu agradecimento à Instituição nas pessoas de Vilânia Santana (PPPG/UEFS) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Celeste Costa Valverde (DCBio).

À Faculdade de Saúde Pública (USP), instituição onde tive a honra de me doutorar. Meu agradecimento na pessoa de Cleuza (COSEAS).

À minha mãe Dejazet de A. Vasconcelos, a Sr.<sup>a</sup> Viviana Parducci Barboni, minha sogra, e à Vera Lúcia Araújo, minha secretária, pelo inestimável auxílio com administração da minha casa e cuidado com meus filhos, que me deram segurança para ausentar-me e seguir para São Paulo. Meu agradecimento também a Maria de Lourdes Lino (Lurdinha) pelo desvelo com minha mãe que adoeceu, enquanto estive fora de Feira de Santana.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof.<sup>a</sup> Denice Vitória de Brito (DSau/UEFS) que lutou arduamente pela concretização do convênio USP/UEFS para realização inédita e corajosa do Doutorado interinstitucional.

Ao Prof. Dr. André Renê Barboni (DSau/UEFS) que me inscreveu (mesmo contra minha vontade!) na seleção do Doutorado, incentivou-me a fazer as provas, comemorou quando obtive aprovação e, ainda, auxiliou-me dedicadamente a escrever esta tese.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira (DCBio/UEFS) pela solidariedade e apoio técnico-científico incondicional prestado ao Projeto de Pesquisa de que trata o presente estudo; pelo empenho junto à Administração Superior da UEFS para implantação (em tempo recorde) do Laboratório de Genética de Microrganismos e Biologia Molecular, onde foram realizados os primeiros isolamentos e, ainda, pela concessão de uso em tempo integral do Laboratório de Genética Toxicológica, sob sua coordenação.

A Prof.<sup>a</sup> Anaci Bispo Paim, Reitora da UEFS, por ter acreditado no projeto de pesquisa, fornecendo as condições sejam elas físicas, materiais, transporte, etc., para realização deste estudo.

As Prof.<sup>a</sup> Cleide Mércia S. S. Pereira e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Glória Sampaio Gomes, ambas do DCBio/UEFS, que concederam generosamente o espaço físico e mobiliário, onde funcionou provisoriamente o Laboratório de Genética de Microrganismos e Biologia Molecular.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Matté (FSP – Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular/USP) pelo envolvimento científico e emocional com este trabalho; pela compreensão e respeito aos meus limites auxiliando-me execução da parte experimental e escrita desta tese com sua competente e dedicada orientação em tempo integral. Sei que, como mãe/esposa/cientista, ela já sentiu na pele o fato de que nossos filhos – mais do que ninguém – sabem o que é a “barra” de terem os pais fazendo teses de doutorado simultaneamente.

A Sr.<sup>a</sup> Maria Eugênia B. de Oliveira que me acolheu fraternalmente em sua residência em São Paulo.

Aos alunos de graduação estagiários voluntários e Prof.<sup>a</sup> Edna Lobo, do Laboratório de Genética de Microrganismos e Biologia Molecular, UEFS, que com suas presenças deram um colorido especial, movimento, energia, alegria, enchendo de vida o espaço provisório do Laboratório.

## **RECONHECIMENTO**

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marlene Campos Peso Aguiar (IB/UFBA) pelo empenho na correção da Tese, preciosas sugestões, ajuda no entendimento das condições sociais e ecológicas da Baía de Todos os Santos, disponibilidade no auxílio da classificação dos moluscos bivalves e fornecimento de informações sobre sua biologia.

## RESUMO

Barboni SAV. Ocorrência de *Vibrio spp* potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil. São Paulo; 2002. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

**Introdução.** Víbrios estão associados a diarreia em humanos após o consumo de água ou moluscos bivalves contaminados. **Objetivo.** Pesquisar a ocorrência de *Vibrio spp* em moluscos bivalves comestíveis comercializados entre 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença. **Materiais e Métodos.** 122 amostras (107 de moluscos bivalves; 15 de zooplâncton) foram analisadas por métodos microbiológicos e moleculares (PCR; ERIC-PCR). **Resultados.** 1077 cepas foram identificadas sendo 17 cepas *Vibrio cholerae* não-O1 não O139; 216 cepas *Vibrio parahaemolyticus*; 64 cepas *Vibrio alginolyticus*; 24 cepas *Vibrio fluvialis* e 14 cepas *Vibrio vulnificus*. As cepas de *V. cholerae* apresentam os cassetes de virulência incompletos, especialmente pela ausência dos genes *ctxA* e *tcpA*. Os dendrogramas de similaridade genética intraespecífica mostraram que há diversidade genética entre as espécies e cepas bacterianas isoladas. **Conclusão.** Há risco de se contrair gastroenterite tanto pelo consumo de moluscos bivalves crus, mal cozidos ou preparados em más condições de higiene, adquiridos nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença. As cepas implicadas em surtos de gastroenterites podem ser identificadas com futura a construção de banco de dados para uso em Vigilância Epidemiológica de gastroenterites, a partir dos perfis genotípicos obtidos via ERIC-PCR.

**Descritores:** Saúde Pública. Víbrios. Epidemiologia molecular. Vigilância sanitária. Higiene alimentar.

## SUMMARY

Barboni SAV. **Presence of potentially pathogenic *Vibrio spp* in edible bivalve shellfish commercialized during the years of 2000 to 2002 in the area of the Baía de Todos os Santos and Valença, Bahia – Brazil.** São Paulo; 2002. [Ph.D. Thesis – Faculdade de Saúde Pública da USP].

**Introduction.** Vibrios are associated to diarrhea in humans after the consumption of contaminated water or bivalve shellfish. **Objective.** To evaluate the presence of *Vibrio spp* in edible bivalve shellfish commercialized between 2000 and 2002 in the are of Baía de Todos os Santos e Valença. **Methods.** 122 samples (107 of bivalve shellfish and 15 of zooplankton) were analyzed through microbiologic and molecular methods (PCR; ERIC-PCR). **Results** 1077 strains were identified being 17 strains *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139; 216 strains of *Vibrio parahaemolyticus*; 64 strains of *Vibrio alginolyticus*; 24 strains of *Vibrio fluvialis* and 14 strains of *Vibrio vulnificus*. *V. cholerae* strains have incomplete virulence cassettes particularly due to the absence of genes *ctxA* e *tcpA*. Dendrograms of intraspecific genetic similarity showed the genetic diversity among the isolated species and bacterial strains. **Conclusion.** There are risks of getting gastroenteritis due to the consumption of bivalve shellfish that are raw, poorly cooked or prepared under suboptimal hygiene conditions. The genotypic profiles obtained via ERIC-PCR will be used to construct a database which, through the identification/matching of strains implicated in outbreaks, could be used in the Epidemiologic Vigilance of gastroenteritis.

**Key words:** Public health; Vibrio; Molecular Epidemiology; Health surveillance; Food safety.

## LISTA DE TABELAS

1. Principais características das espécies de vibrios patogênicos e possivelmente patogênicos para o homem utilizadas neste estudo para classificação das amostras, segundo critérios bioquímicos.....61
2. Seqüência de primers utilizados nas PCR de pesquisa de virulência ..... 66
3. Número de moluscos bivalves por nome comum e estado de conservação utilizados na pesquisa de vibrio nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia, Brasil – 2000-2002..... 72
4. Pesquisa dos fatores de virulência em *V. cholerae* isolados em zooplâncton e moluscos bivalves coletados na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002..... 105

## LISTA DE FIGURAS

1. Bactéria *Vibrio cholerae* vista ao microscópio..... 30
2. Esquema demonstrativo da hierarquia seqüencial da regulação bioquímica e genética do Regulon ToxR, segundo COOTER e MILLER (1998)..... 41
3. Mapa demonstrativo da região, exibindo os municípios e locais, onde foram realizadas as coletas, abrangendo a área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002 ..... 51
4. Fisionomia dos locais onde foi coletado o zooplâncton utilizado neste estudo. As fotografias evidenciam quatro pontos sob efeito antrópico na BTS, Bahia, Brasil, 2000-2002..... 53
5. Rede de coleta de plâncton utilizada neste estudo. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2000-2002..... 54
6. Aparência do meio Kliegler após crescimento de bactérias presuntivas de pertencerem ao gênero *Vibrio*, obtidas a partir de moluscos bivalves comercializados na BTS e em Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002 ..... 57
7. Resumo esquemático sobre a metodologia utilizada para isolamento de *Vibrio spp*..... 59
8. Comércio de peixes e de mariscos nas rodovias: venda de moluscos bivalves, tanto na concha como desconchados, ao longo das rodovias da BTS. Ilha de Itaparica, Bahia, Brasil, 2000-2002..... 69
9. Pescado e moluscos bivalves desconchados comercializados a céu aberto, em feira-livre, em ausência de congelamento e em condições precárias de higiene. Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2002 ..... 70
10. Registro da atividade de extrativismo de moluscos bivalves em manguezal da Ilha de Itaparica. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001..... 73
11. Balcão congelador, expondo moluscos bivalves comercializados em bandejas, previamente preparadas num supermercado de Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2002..... 75

12. Distribuição dos moluscos bivalves, utilizados na pesquisa, em função do tipo de estabelecimento e da apresentação. Área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002 .....	77
13. Comércio de pescados, em feira-livre, evidenciando, em sentido horário: condições precárias de higiene, (fotos 1, 2, 3 e 4); falta de congelamento (fotos 2, 3 e 4); uso de utensílios inadequados (2 e 4); vendedores sem EPI's (foto 1 e 2). Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001.....	78
14. Vendedora de moluscos bivalves na concha, utilizando lata de óleo de cozinha como medida, cesto para armazenamento e higiene precária do local de comercialização do produto. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001.....	78
15. Moluscos bivalves, adquiridos numa das coletas realizadas, vendidos em feira-livre de município da BTS, num mesmo pacote, com o nome de “mapé”, porém havendo uma possível variedade de organismos. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2002.....	82
16. Moluscos bivalves, adquiridos em algumas coletas, e sua identificação, segundo nomes vulgares dados pelos vendedores no ato da compra. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001 .....	85
17. Moluscos bivalves, adquiridos em uma das coletas com o nome “sururu”, retirados do mesmo pacote. Na fotografia, evidencia-se uma possível diversidade de espécie entre os representantes .....	86
18. Número de amostras por número de espécies de <i>víbrio</i> potencialmente patogênicos, registrados em amostras de moluscos bivalves, coletados na Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil, 2000-2002 .....	88
19. Número de amostras de zooplâncton, contendo espécies de <i>víbrio</i> , coletadas na Baía de Todos os Santos, Bahia – Brasil, 2000-2002 .....	88
20. Número de amostras de moluscos bivalves com ocorrência de <i>Vibrio</i> por espécie. Área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	92
21. Distribuição de <i>Vibrio</i> por moluscos bivalves coletados. Área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	92

22. Multiplex PCR <i>V. cholerae</i> O1 e O139: poços 1 e 15 – DNA Marker 1 Kb Ladder; poço 2 – DNA Controle O139; poços 3 e 4 – DNA Controle O1 (2 cepas); poços 5 ao 14 – DNA das cepas isoladas neste estudo .....	95
23. Proporção de população atendida por “condições mínimas de água, esgoto e lixo”, respectivamente, no Estado da Bahia de acordo com dados dos Censos Populacionais do IBGE de 1991 e 2000 .....	98
24. Gel resultante da pesquisa do fator de virulência <i>hlyA</i> via PCR das cepas <i>V. cholerae</i> isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 – DNA de cepa controle; poços 2 a 8 – DNA das cepas estudadas.....	102
25. Gel resultante da pesquisa do fator de virulência <i>toxR/zot</i> via PCR das cepas <i>V. cholerae</i> isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas.....	103
26. Gel resultante da pesquisa do fator de virulência <i>ompU/ctxA</i> via PCR das cepas <i>V. cholerae</i> isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas.....	103
27. Gel resultante da pesquisa do fator de virulência <i>tcpI</i> via PCR das cepas <i>V. cholerae</i> isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas .....	104
28. Gel resultante da pesquisa do fator de virulência <i>tcpA</i> via PCR das cepas <i>V. cholerae</i> isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas.....	104
29. Dendograma de similaridade entre cepas de <i>V. cholerae</i> , isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002.....	108
30. Dendograma de similaridade entre cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> , isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002.....	110

31. Dendograma de similaridade entre cepas de *V. vulnificus*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002..... 112
32. Dendograma de similaridade entre cepas de *V. alginolyticus*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002..... 113
33. Dendograma de similaridade entre cepas de *V. fluvialis*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002..... 114

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>BTS</b>	Baía de Todos os Santos
<b>DNTP</b>	nucleotídeo
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>ERIC</b>	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
<b>kb</b>	mil pares de base
<b>mA</b>	mili Ampére
<b>mM</b>	milimolar
<b>nm</b>	nanômetro
<b>OD</b>	densidade óptica
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia pela Polimerase
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RNAse</b>	ribonuclease
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>Tris</b>	tris (hidroximetil) aminometano
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>µl</b>	microlitro
<b>µg</b>	micrograma
<b>(-)</b>	não possui a característica
<b>(+)</b>	possui a característica

# ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A Saúde Pública e as Infecções.....	1
1.2 Relação do homem com ambientes costeiros e marinhos .....	7
1.3 A Baía de Todos os Santos (BTS) – sua área de influência – e Valença – localização geográfica e características geológicas, povoamento, história e economia .....	9
1.3.1 Saneamento básico, na região, e doenças veiculadas pela água.....	13
1.3.2 As infecções diarréicas.....	15
1.4 Moluscos Bivalves – biologia e ecologia .....	18
1.4.1 Descrição dos moluscos bivalves marinhos encontrados para comercialização na Bahia .....	20
1.4.2 Sistema de alimentação e circulação de água.....	21
1.4.3 Moluscos bivalves e a saúde humana .....	24
1.5 Aspectos biológicos e epidemiológicos de bactérias do gênero <i>Vibrio</i> .....	29
1.6 Estudos ecológicos de bactérias do gênero <i>Vibrio</i> .....	35
1.6.1 Isolamento de víbrios ambientais .....	38
1.7 Biologia Molecular de bactérias do gênero <i>Vibrio</i> .....	39
1.8 Uso de técnicas moleculares no estudo de víbrios.....	43
2 JUSTIFICATIVA.....	49
3 OBJETIVOS .....	50
3.1 Objetivo Geral .....	50
3.2 Objetivos Específicos .....	50
4 METODOLOGIA .....	51
4.1 Seleção da Área de Estudo.....	51
4.2 Delimitação do tempo de estudo e periodicidade das coletas .....	52
4.3 Amostragem.....	52
4.3.1 Amostragem de plâncton.....	52

4.3.1.1	Fisionomia dos locais de coleta de plâncton.....	53
4.3.1.2	Coleta e preparo das amostras de plâncton.....	54
4.3.2	Amostragem de moluscos bivalves.....	54
4.3.2.1	Coleta e preparo das amostras de moluscos bivalves....	55
4.4	Enriquecimento .....	56
4.5	Transferência para meio seletivo .....	56
4.6	Teste da presença da enzima citocromo oxidase .....	58
4.7	Conservação das amostras .....	59
4.8	Provas Bioquímicas.....	60
4.8.1	Identificação das espécies de vibrio.....	61
4.9	Sorologia para <i>Vibrio cholerae</i> O1 .....	62
4.10	Teste de crescimento em meio mínimo e com fonte única de carbono para <i>V. parahaemolyticus</i> .....	62
4.11	Estocagem e manutenção das células.....	62
4.12	Extração do DNA genômico.....	63
4.13	Estimativa da concentração e avaliação da qualidade do DNA genômico .....	63
4.14	Confirmação dos sorogrupos de <i>V. cholerae</i> por PCR .....	64
4.15	Pesquisa dos fatores de virulência em <i>V. cholerae</i> utilizando PCR.....	65
4.16	Estudo dos perfis genômicos (“fingerprinting”) por ERIC- PCR dos vibrios potencialmente patogênicos isolados.....	66
4.17	Eletroforese em gel de agarose .....	67
4.18	Análise dos perfis genômicos (fingerprinting) .....	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
5.1	Características do abastecimento de moluscos bivalves nas cidades estudadas .....	71
5.2	Obtenção, processamento e armazenamento dos moluscos bivalves para venda .....	73
5.3	Coleta nos Supermercados.....	75
5.4	Coleta nas feiras-livres e mercados públicos.....	76
5.4.1	Apresentação da mercadoria.....	76
5.5	Coleta em peixarias .....	80

5.6	Identificação dos moluscos bivalves utilizados na pesquisa .....	81
5.7	Ocorrência de vibrios, em moluscos bivalves, comercializados e zooplâncton .....	87
5.8	Testes bioquímicos .....	87
5.9	Ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos, em moluscos bivalves, comercializados e plâncton .....	90
5.10	Condições de Saneamento Básico no Estado da Bahia e Políticas Públicas locais.....	97
5.11	Análise molecular do genótipo dos vibrios isolados.....	101
5.12	Pesquisa dos fatores de virulência em <i>V. cholerae</i> .....	102
5.13	Caracterização genotípica de <i>Vibrio spp</i> por ERIC-PCR.....	108
5.14	Considerações finais.....	116
6	CONCLUSÕES .....	133
7	RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES.....	134
	REFERÊNCIAS.....	137

## ANEXOS

1.	Carta Náutica da Baía de Todos os Santos e Valença.....	A2
2.	Locais de coleta das amostras de plâncton com data de coleta, na área da BTS, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	A3
3.	Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “chumbinho”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002 .....	A3
4.	Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “lambreta”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002 .....	A4
5.	Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “mapé”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	A4
6.	Identificação das amostras de moluscos bivalves alóctones, referenciados como “mexilhão” ( <i>Mytilidae</i> , não pertencentes ao gênero <i>Mytella</i> ), segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	A5

7. Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “ostra”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	A5
8. Identificação das amostras de moluscos bivalves composta por várias espécies identificados para venda como “sarnambi”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	A6
9. Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “sururu”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	A6
10. Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “talioba”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.....	A7
11. Meios de Cultura.....	A8
12. Reagentes.....	A9
13. Meios, soluções e reagentes para a série bioquímica.....	A9
13.1. Crescimento em presença de aminoácidos .....	A10
13.2. Teste com carboidratos.....	A11
13.3. Redução de nitratos .....	A12
13.4 Hidrólise da Esculina.....	A12
14. Reagentes para extração do DNA genômico .....	A12
15. Soluções de eletroforese.....	A13
16. Materiais e Reagentes usados nas PCR.....	A14

# 1 INTRODUÇÃO:

## 1.1 A Saúde Pública e as Infecções:

A Organização Mundial de Saúde (OMS), organismo ligado à ONU (Organização das Nações Unidas), tem promovido, desde sua criação em 1948, amplo debate sobre a saúde e a doença em populações humanas e seus determinantes, com o propósito de reduzir a frequência dos agravos e da mortalidade.

Norteados por estes debates, vários países têm criado programas para elevação do padrão de vida de seus habitantes, tendo como “nova ordem mundial” o princípio de Saúde para todos. Nesse tocante, o atual conceito de saúde, adotado pela Constituição da República Federativa do Brasil, promulgada em 1988 (BRASIL 1988), confere maior responsabilidade ao Poder Público em relação à saúde coletiva e individual, envolvendo ações que vão desde a vacinação até a vigilância sanitária.

Estas ações compreendem um conjunto de atividades coordenadas, no campo da Saúde Pública, com o objetivo de oferecer qualidade de vida à população, mas são caracteristicamente multifacetadas, complexas e abrangentes, além de requerer estrutura e pessoal especializado, em particular, no tocante à pesquisa.

O grande sucesso obtido, no século XX, no controle das doenças, através de vacinação, controle de vetores e saneamento ambiental, parecia indicar que o conhecimento disponível era suficiente para o manejo das doenças transmissíveis. Entretanto, mesmo com os ganhos substanciais obtidos na expectativa de vida da população, através da execução destas ações, estas se mostraram ineficazes ao longo do tempo, não só pela complexidade do processo saúde-doença e seus determinantes, mas também porque só eram implementadas quando a doença atingia a população, e, às vezes, de maneira isolada, estanque e independente.

Dois outros fatores, que contribuíram para o enfraquecimento dessas demandas, orientadas pelas necessidades de saúde e suas respectivas ações de controle, foram: a mudança no perfil epidemiológico da população e surgimento de novos patógenos.

Historicamente, os anos 40 e 50, do século XX, marcaram, na América, o momento da transição do perfil de morbidade por doenças infecciosas e parasitárias para aquelas doenças relacionadas a problemas crônicos e degenerativos. Por outro lado, no mundo inteiro, coexistem, atualmente, as doenças infecciosas emergentes e reemergentes e os “velhos problemas” de Saúde Pública, para os quais não há solução em curto prazo (BARRADAS 1999).

Atualmente, as doenças infecciosas ganharam nova dimensão em virtude do aparecimento de epidemias que pareciam controladas, em adição ao surgimento de novas doenças. Essas doenças, chamadas doenças infecciosas emergentes e reemergentes (LEDERBERG, SHOPE e OAKS 1992), são definidas como aquelas cujos agentes patogênicos são desconhecidos ou cuja incidência rapidamente aumentou e concomitante ampliou sua distribuição geográfica nas últimas décadas (WALDMAN 1998; POSSAS 2001).

Segundo WALDMAN (1998), a classificação atual das doenças em emergentes e reemergentes nada mais é do que uma abordagem das doenças infecciosas sob um novo enfoque, em que os principais instrumentos para o seu controle deixam de ser exclusivamente o saneamento, a melhoria das condições habitacionais e de educação. Sugere também que, para a auto-sustentação do Sistema Único de Saúde (SUS), no enfrentamento destas doenças, é indispensável que sejam incorporados os seguintes instrumentos:

- vigilância em Saúde Pública (no sentido da inteligência epidemiológica);
- pesquisa epidemiológica e de laboratório;
- serviços de saúde organizados.

A vigilância é considerada como principal pilar da Saúde Pública (THACKER e BERKELMAN 1988), e esta pode ser utilizada para identificar populações vulneráveis a fatores de risco, especialmente diante de doenças infecciosas, através de seus métodos de investigação que podem ser laboratoriais e/ou estatísticos.

Os problemas de saúde não se distribuem ao acaso e, muito menos têm frequência e gravidade similares em todos os grupos humanos. Por isso, cientistas americanos, vinculados ao “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), de Atlanta, Georgia, Estados Unidos, órgão de referência mundial para as atividades de vigilância, propuseram a criação, em caráter global, de um sistema de vigilância

epidemiológica de doenças infecciosas. Para estes pesquisadores, diferentes centros, espalhados pelo mundo, deveriam ser capazes de, em síntese, detectar, investigar e monitorar patógenos e as doenças causadas por eles, bem como fatores ou circunstâncias ligados aos mesmos, articulando, concomitantemente, a informação em saúde pública e ações para controle e prevenção de agravos (BARRADAS 1999; TORTORA, FUNKE e CASE 2002). Ainda, para estes pesquisadores, a vigilância em Saúde Pública seria composta de três etapas: coleta, análise, disseminação de informações, incorporação das práticas de Saúde Pública e avaliação periódica do sistema (BARRADAS 1999).

Esta preocupação quanto à vigilância de patógenos pela comunidade científica não se restringe apenas aos riscos de surtos, mas também em função do uso de vírus e bactérias como “armas biológicas” potencialmente utilizáveis em ataques terroristas ou operações militares – o chamado bioterrorismo. Segundo a OMS, há pelo menos quarenta e quatro agentes infecciosos convenientes para estes fins, sendo destes, quinze bactérias, dois fungos, vinte e quatro vírus e três protozoários. Entre as bactérias listadas encontram-se o *Clostridium botulinum*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae* (ANONYMUS 2001; BINA 2002). Este risco atinge a todo o globo, e só um sistema de vigilância eficaz e articulado poderá minimizar os efeitos de uma futura epidemia.

Só nos Estados Unidos investimentos próximos a um bilhão e meio de dólares foram destinados, em 2002, para a pesquisa genômica de patógenos, testes com drogas e criação de novos centros de pesquisa sobre doenças infecciosas (FAPESP 2002).

No Brasil, com relação ao SUS e seu sistema de vigilância, a Lei 8080/90, do Ministério da Saúde (MS), conceitua a Vigilância Sanitária e considera o meio ambiente como um fator determinante e/ou condicionante do processo saúde-doença. Dentro deste parâmetro, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), órgão do MS, criou, em 1999, como parte da estrutura do Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI), a Coordenação de Vigilância Ambiental (COVAM). Suas ações, segundo a proposta, englobam vigilância da qualidade da água para consumo humano, vigilância e controle de fatores biológicos, contaminantes ambientais e questões de

saúde relacionadas aos desastres naturais e acidentes com produtos perigosos (MACIEL et al. 1999).

As concepções, diretrizes e atribuições determinadas para o funcionamento do SUS envolvem todos estes aspectos supracitados e, com isso, colocam para os profissionais de saúde a necessidade de revisão de suas práticas de forma a transcender a clínica, incorporando ações que contribuam para o conhecimento, a utilização racional e a preservação do meio ambiente (RIBEIRO e BERTOLOZZI 2000).

Logo, a Saúde Pública, em geral, e a Epidemiologia, enquanto área de conhecimento, não pode se ausentar do debate contemporâneo sobre as alterações ambientais e climáticas e a sustentabilidade do planeta para as gerações atuais e futuras, uma vez que tais acontecimentos repercutem sobre os seres vivos modulando-os, interferindo em suas vidas e, conseqüentemente, afetando o gradiente saúde-doença (LEVINS e LOPEZ 1999).

Diante deste cenário, recentemente, as doenças reemergentes ganharam importância, entre os epidemiologistas e pesquisadores de áreas afins, pela frequência e gravidade das infecções que determinam, bem como pela dificuldade de serem eficientemente controladas. Por exemplo, é fato que a morbi-mortalidade humana por doenças infecciosas, nas últimas décadas apresentou, no Brasil, uma nítida tendência de redução, especialmente aquelas preveníveis por vacinação (WALDMAN 1998). Por outro lado, outras doenças infecciosas que estavam controladas há anos, tais como tuberculose, dengue, cólera, retornaram aos boletins epidemiológicos sob forma de epidemias em diversas regiões do globo, a partir de 1985, inclusive no Brasil. Aqui, as doenças reemergentes com maiores índices registrados foram a cólera, o dengue e a malária. Nas três há predominância da água como proporcionadora das condições para instalação dos agentes infecciosos.

Devido à precariedade ou ausência de um sistema de esgotamento sanitário, especialmente nos centros urbanos, uma série de problemas ambientais têm comprometido os corpos hídricos receptores, o que põe em risco a saúde de populações humanas.

O risco em saúde está ligado a uma idéia contrária de segurança: está ligado ao perigo (SCHWARTZ 2002). Assim, a utilização da água contaminada e dos recursos naturais, provenientes de áreas alagadas contaminadas (peixes, moluscos, crustáceos), constitui-se num importante ponto a ser considerado pela Saúde Pública pelo risco de epidemias, tendo em vista o contingente populacional que se utiliza desse extrativismo para alimentação (CARROZZO 1994).

Dentre as mais relatadas epidemias mundiais recentes está a cólera que atingiu a América Latina a partir de 1991, contabilizando, até 1997, cerca de 1 milhão de casos e 9 mil mortes. Ao longo dos anos, apesar do declínio apresentado pelo avanço da doença em alguns países, a epidemia não será extinta facilmente (OPS 1995).

O grande questionamento é: por que estas doenças voltaram?

Os agentes físicos, químicos e biológicos por si só não são determinantes das epidemias por doenças emergentes e reemergentes. Na verdade, há outros fatores apontados como “facilitadores” da ocorrência destas doenças (WALDMAN 1998; TORTORA, FUNKE e CASE 2002), tais como:

- modelos de desenvolvimento econômico determinando alterações ambientais;
- aumento da exposição humana a novos e não-usuais agentes infecciosos em áreas que estão sofrendo modificações pela ação do homem (construções, desmatamentos, por exemplo);
- migrações e processos de urbanização;
- aumento do intercâmbio internacional, que assume papel de “vetor cultural” na disseminação das doenças infecciosas;
- ampliação do consumo de alimentos industrializados, especialmente os de origem animal;
- uso inadequado e descontrolado de antibióticos e pesticidas, estimulando o crescimento de patógenos e vetores mais resistentes;
- desestruturação dos serviços de saúde e/ou desatualização das estratégias de controle de doenças;
- processo de evolução de microrganismos.

Colaborando com esta linha de pensamento, segundo CHERKASSKII (1988), para melhor compreensão do comportamento das doenças infecciosas, estas devem ser investigadas não só sob o ponto de vista epidemiológico, mas também se levando em conta seus determinantes ao nível dos sistemas biológicos, econômicos e político, inter-relacionados e interdependentes.

Considerando-se o aspecto biológico, algumas doenças infecciosas podem apresentar variantes, o que pode ser explicado por alterações observadas no comportamento dos microrganismos patogênicos. Estas alterações podem determinar o aparecimento de novas doenças ou de doenças conhecidas de forma mais agressiva, devendo-se este fato, possivelmente, a uma modificação da estrutura genética do patógeno que, às vezes, pode resultar em aumento de virulência, tornando-o mais adaptado ao organismo humano e ao meio ambiente.

A adaptação tem sido estudada através da pesquisa dos caracteres estruturais ou fisiológicos, relacionando-os às variações ambientais no tempo e no espaço (FORATTINI 1980).

As mudanças ambientais, produzidas na Terra ao longo do tempo, de forma natural ou provocada pela ação antrópica, podem extinguir espécies, introduzir outras e, como consequência, esvaziar nichos ecológicos que são ocupados por espécies exóticas que colonizarão o ambiente. Com isso, poderá a espécie colonizadora invadir vários habitats, desde que obedeça a duas estratégias fundamentais: a evolução de um genótipo versátil (que permita a sobrevivência e perpetuação em vários ambientes, resultando na disseminação da espécie); e a diversificação associada à especialização, permitindo o desenvolvimento do número de genótipos equivalentes ao de ambientes, ou seja, o número elevado de indivíduos daquela espécie seria multiplicado ao máximo. Concluindo: uma espécie será bem sucedida quanto maior a variedade de ambientes que coloniza, ou melhor, seu grau de adaptabilidade (FORATTINI 1980).

As mutações genéticas são fonte de variabilidade. E, devido a sua ocorrência aleatória, não lógica, seus impactos, sobre o genoma de um organismo, não podem ser previstos, e, assim, há possibilidade de surgirem alterações e, se estas forem favoráveis, adaptações são sempre esperadas. Baseado no princípio da seleção natural, os organismos melhores adaptados aos seus ambientes irão sobreviver e se

reproduzir. A coevolução entre um parasita e seu hospedeiro ocorrerá quando o comportamento de um influencia o do outro (TORTORA, FUNKE e CASE 2002).

A natureza não tem plano para evolução e assim a estabilidade e a previsibilidade não são características dos sistemas naturais e sociais. Logo, um objetivo que não se pode perder de vista deve ser a compreensão das mudanças que poderão ocorrer em decorrência das intervenções geradas pelas alterações ambientais, em especial, pelo desenvolvimento (PORTO, FREITAS e ALMEIDA 2000). Desta forma, a compreensão do ambiente, de sua variabilidade e de sua vulnerabilidade, auxilia pesquisas em Saúde Pública, as quais produzem resultados que permitem aos governos direcionarem corretamente políticas e objetivos sociais.

Neste sentido, nos anos 70, durante a Campanha de Erradicação da Varíola, a Vigilância Epidemiológica foi introduzida, no Brasil, como atividade dos serviços gerais de saúde (BARRADAS 1999). Com a finalidade de organizar a coleta e análise da informação voltada à agilização e ao aperfeiçoamento das atividades de controle das doenças infecciosas, a partir de 1976, o Ministério da Saúde inicia a implantação do Sistema de Vigilância Epidemiológica.

Outra conquista que contribuiu de forma direta ou indireta para aperfeiçoamento da qualidade da informação sobre doenças infecciosas, no país, foram as medidas de padronização de formulários de notificação e investigação de doenças de notificação compulsória, estabelecendo fluxo de informações sobre surtos e epidemias, permitindo identificar tendências, assim como a criação do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. Dessa forma, consagrou-se a vigilância como importante instrumento de análise epidemiológica de situação de saúde do país (WALDMAN, SILVA e MONTEIRO 1995).

## **1.2 Relação do homem com ambientes costeiros e marinhos**

Aproximadamente sete décimos da superfície do planeta Terra estão cobertos por águas salgadas. Este conjunto de águas forma os oceanos, os quais, mesmo ligados entre si, suas águas não são tão móveis quanto parece. Apesar disso, atuam como agentes muito eficientes na dispersão e diluição seja de partículas, produtos químicos ou agentes e produtos biológicos (DREW 2002).

Vários fenômenos físicos, químicos e biológicos ocorrem nos oceanos e em suas praias e área de influência. Estes provêm de duas origens distintas e fundamentais: as chamadas “forças da natureza”, como as marés e as correntes marítimas, gerando um hidrodinamismo e pela presença dos organismos e suas relações com o seu habitat. Até nos anos 70, avaliação da influência antrópica sobre os ecossistemas oceânicos permanecia obscura, devido a sua escala gigantesca e a lenta reação dos ecossistemas hídricos. Atualmente, utilizando-se tecnologia de ponta em sensoriamento remoto, os mares são bem monitorados, especialmente em função do controle da poluição.

A poluição dos mares causa desequilíbrios ecológicos. Estes desequilíbrios podem ser identificados pela mortandade de peixes, a ocorrência das “marés vermelhas”, contaminação de pescados, entre outros. E, como pouco se conhece sobre o tempo de permanência dos compostos artificiais e agentes biológicos, nas águas oceânicas, isto porque a periodicidade da mistura das águas é grande, provavelmente de mil a três mil anos (DREW 2002), ações de prevenção devem anteceder as de recuperação, uma vez que muitos acontecimentos são irreversíveis.

Apesar destas constatações, os estudos epidemiológicos bem conduzidos nestas temáticas são poucos (CARROZZO 1994). Há, porém, evidências que algumas áreas costeiras mais poluídas põem em risco a saúde humana, como a ocorrência da hepatite, pela ingestão de frutos do mar; as dermatoses contraídas pelo contato com a areia da praia; as infecções do aparelho respiratório pelo contato com a água do mar poluída (LAMPARELLI 1987).

Algumas bactérias são próprias das coleções naturais de água ou são organismos transitórios oriundos de esgotos industriais e domésticos contaminados. REINHARDT (1984 cit. LAMPARELLI 1987) reconhece que as águas normalmente não apresentam microrganismos patogênicos e que estes geralmente são introduzidos por algum mecanismo de contaminação como esgotos domésticos.

Nos últimos anos, ficou evidente que várias bactérias patogênicas para o homem são autóctones de ambientes estuarinos. Porém, a contaminação biológica dos mares e estuários constitui-se num sério problema de Saúde Pública devido à constante introdução de microrganismos e vírus patogênicos anteriormente inexistentes (GRIMES 1991).

Vários são os problemas oriundos dos lançamentos de esgotos nas áreas costeiras, além da contaminação por microrganismos e vírus, tais como: redução do teor de oxigênio dissolvido, aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), eutrofização e aumento da turbidez da água (TOMMAZI 1987).

Com uma área costeira de mais de 8.500 quilômetros de extensão, há muito que se investigar em águas litorâneas, praias, manguezais e área de influência no Brasil.

Entre os ambientes aquáticos continentais destacam-se os ecossistemas manguezais, berçário da vida marinha e de fauna e flora exuberantes. Infelizmente, o reconhecimento destas importantes funções dos manguezais na manutenção da vida na Terra é recente. A tendência mundial sempre foi de destruí-los pelo desmatamento, poluí-los com dejetos humanos (destacando-se aqui sua importância para Saúde Pública) ou aterrjá-los, por serem considerados tanto pelo imaginário popular como pela Saúde Pública, áreas insalubres e locais de proliferação de microrganismos patogênicos e de insetos nocivos à saúde humana. Ou seja, eram regiões que deviam ser sanitizadas.

Esta idéia equivocada em relação aos manguezais foi fortemente incentivada no Brasil pela corrente sanitária da Saúde Pública, especialmente no início do século XX, durante as epidemias de febre amarela que assolaram o Rio de Janeiro. Nesta época predominava na Medicina as “teorias higiênicas” que defendiam o saneamento do meio ambiente como medida preventiva de doenças, evocados segundo preceitos hipocráticos sobre a interação entre o espaço geográfico e a ocorrência de doenças.

### **1.3 A Baía de Todos os Santos (BTS) e sua área de influência e Valença – localização geográfica e características geológicas, povoamento, história e economia:**

A Baía de Todos os Santos (BTS) localiza-se a oeste da cidade de Salvador, capital do Estado da Bahia, Brasil, entre as coordenadas geográficas 12° 35' 30" e 13° 7'30" de latitude sul e 38° 29'00" e 38° 48' 00" de longitude oeste (SANTOS

1992). Abrange uma área que vai desde o Porto da Barra até a Ponto dos Garcez em Itaparica (ANEXO 1).

Possui 972 km<sup>2</sup> e é considerada a maior baía do Brasil. É foz de vinte e um rios, possui cerca de trinta ilhas (sendo a maior a Ilha de Itaparica), duas baías internas (Iguape e Aratu) e muitas enseadas (SILVA et al. 1996).

A existência da BTS é uma formação geológica relativamente jovem atribuída a acidentes tectônicos pós-cretáceos, que deprimiram numa profunda fossa o pacote de sedimentação triássico-cretáceo e propiciou condições de aparecimento de petróleo em seu entorno (Recôncavo) e suas águas (SILVA et al. 1996).

A BTS apresenta inúmeras reentrâncias e um litoral extenso equivalente à costa do estado de Pernambuco. Seu perímetro costeiro é de aproximadamente 462 km, sendo 55km (12%) de áreas urbanas de nove dos doze municípios que margeiam a Baía. As áreas urbanas apresentam, em sua maioria, praias arenosas e/ou rochosas. Cerca de 30% compõem-se de remanescentes de manguezais, áreas de intensa produção de crustáceos, moluscos e peixes. Os demais trechos da Baía são praias e áreas de lazer. Possui um rico ecossistema formado por manguezais e enseadas (SILVA et al. 1996).

As correntes marinhas que penetram na BTS transportam para o seu interior material fino em suspensão, lançados ao mar por rios e riachos da costa atlântica, ao norte de Salvador. Isto foi demonstrado por LEÃO em 1971 (cit. (SILVA et al. 1996) que encontrou carapaças de radiolários e foraminíferos em sedimentos do fundo da parte norte da Baía, que teriam sido trazidos de mar aberto. A amplitude máxima das marés é de 2,70m durante a maior parte do ano (SILVA et al. 1996).

Segundo a Diretoria de Hidrografia e Navegação (DHN), as temperaturas médias anuais do ar registradas no interior da Baía são superiores a 25° C, variando até 23°C nos meses de inverno e 28°C nos meses de verão. Já as águas superficiais apresentam valores de temperatura que variam de 27°C a 30°C, não apresentando grandes variações com a profundidade (MOURA 1979).

A salinidade das águas da Baía varia. Valores baixos são apresentados na foz do rio Paraguaçu (inferiores a 8ppm) e valores gradativamente maiores à medida que se aproxima da entrada da Baía, com registros médios de 35,2 ppm na região oeste e 36,6ppm na região sul (MOURA 1979).

Medidas de pH, na coluna d'água de amostras da BTS, realizadas nas profundidades de 0,10 e 20,0 m, durante 12h com intervalos de 4h, mostraram que não há variação nos valores, apresentando-se entre 8,01 e 8,04 (SILVA et al. 1996).

No interior da BTS, sopram ventos de NE, no verão, e SE, no inverno. Em agosto, acontecem os temporais sul com ventos soprando dois a três dias seguidos com velocidade de três e cinco m/s. O mês de abril, que precede os ventos E e SE, é de calmaria (BITTENCOURT, FERREIRA e DINAPOLI 1976; MOURA 1979; ARAÚJO 1984).

A fundação da cidade de Salvador, em 1549, permitiu a conquista e a colonização do Recôncavo, região situada ao redor da BTS que vai desde os tabuleiros terciários até as baixadas litorâneas. A sua localização estratégica associada ao fato de ser centro do poder, faz com que, até os dias atuais, Salvador mantenha sua influência direta sobre a região.

Valença, localizada no baixo sul da Bahia, é uma cidade colonial situada às margens do rio Una, formando um grande estuário famoso pelo extrativismo de moluscos bivalves, existindo aí fazendas de maricultura (ANEXO 1). Guaibim, próxima a Valença, às margens do oceano Atlântico, é uma antiga colônia de pescadores hoje *point* do verão. É conhecida pela intensa produção de moluscos bivalves a partir dos seus manguezais e é local de desova de tartarugas marinhas, sendo considerado “paraíso ecológico”.

Ao longo da BTS e Valença, os primeiros núcleos de povoamento criados pelos portugueses tiveram como elemento de fixação a lavoura canavieira e, posteriormente, a do fumo. As primeiras cidades que surgiram foram Cachoeira, São Francisco do Conde e Camamu. Nos anos seguintes, foi a criação de gado (estabelecendo o “ciclo do couro”) o principal fator de interiorização, multiplicando as fazendas, os povoados, fazendo surgir as primeiras cidades. Desta forma, o “caminho das boiadas” serviu para humanização do espaço e, conseqüentemente para irradiação social a qual não ocorreu de maneira uniforme (NASCIMENTO 1986). No século XVIII, durante o ciclo do ouro, o porto de Salvador foi um dos maiores exportadores de ouro e diamantes provenientes da Chapada Diamantina (MATTOSO 1992). Sociologicamente, este ciclo foi considerado o mais importante, pois atraiu

outras populações para a região, contrabalançando as forças de dispersão criadas no ciclo do couro.

A população distribuída de maneira desigual, com contrastes de densidade demográfica, é explicada por três fatores: 1. Marcha do povoamento com distribuição costeira; 2. Desigualdade de desenvolvimento econômico, com ênfase voltada para o litoral e suas atividades, especialmente portuárias; 3. Contraste de clima, vegetação e solo entre o Recôncavo e o interior.

Na época colonial, os portugueses dispersaram-se ao longo do litoral baiano ou espalharam-se seguindo rios para transportar o açúcar desde o engenho até o porto. As primeiras vilas da Bahia podiam ser assim caracterizadas: cerca de duzentas a trezentas casas próximas a uma igreja ou a um engenho, cujos habitantes eram o caboclo, os escravos negros, brancos pobres, mulatos livres. Os ofícios da época mais comuns foram barqueiro de rio ou tropeiro. A pesca e a mariscagem não eram reconhecidas como ocupação.

A monocultura dividia o Brasil em duas agriculturas, e esta divisão é clara no Recôncavo: a agricultura comercial, fonte de riquezas, prestígio social e poder político, como cana-de-açúcar, cacau e fumo; e a agricultura de subsistência, típica dos caboclos e brancos pobres, como milho, mandioca e feijão (PINTO DO CARMO 1993).

Até os dias atuais, a situação não é muito diferente: entre todos os analfabetos da Bahia, 80% são negros, sendo esta mão-de-obra geralmente ligada à economia informal, serviços agrários e domésticos, à pesca e a mariscagem.

No final da década de sessenta, foi criado o Centro Industrial de Aratu e posteriormente, o complexo petroquímico de Camaçari que, ao iniciarem as suas atividades industriais, alteraram o perfil agro-exportador do estado (SILVA FILHO 2000). A Bahia, à semelhança do que acontecia com as outras capitânicas hereditárias, legitimou um quadro de desenvolvimento de excessiva concentração de renda, no qual os municípios industrializados e ligados à indústria petroquímica (Salvador, São Francisco do Conde, Camaçari, Simões Filho, Dias D'Ávila, Lauro de Freitas, Candeias, Itaparica e Madre de Deus) respondem por 68,15% da arrecadação de impostos do Estado (SILVA FILHO 2000).

Diante disso, pode-se constatar que 95% dos municípios baianos são totalmente dependentes de repasses financeiros por não terem geração própria de impostos. Com isso a maioria dos investimentos públicos continua a ser feitos nas áreas de maior riqueza, aprofundando as inequidades existentes, entre elas, a distribuição de saneamento básico (SILVA FILHO 2000).

### **1.3.1 Saneamento básico, na região, e doenças veiculadas pela água:**

A Baía de Todos os Santos é porto natural o que foi essencial para o sistema de navegação e comunicação na época colonial. Até hoje ainda permanece como rota de hidrovias e, por pressão demográfica ao redor, surgiram, desordenadamente, povoados, vilas, favelas, cidades. Nesta região que recebeu o nome de “Recôncavo Baiano” (entorno), em muitos povoados os esgotos correm a céu aberto e formam pequenos córregos que se transformam em canais ao longo do percurso cujo destino final é a BTS (SILVA et al. 1996).

Associado a estes, a partir dos anos 70, com a crescente industrialização envolvendo produtos químicos e a exploração do petróleo no Recôncavo (primeira província petrolífera a ser explorada no Brasil), produtos químicos originários dos efluentes também são lançados na Baía, causando poluição de suas águas. A lógica da política de industrialização na época não previam avaliação nem controle de impacto ambiental.

Estudos realizados pelo Centro de Recursos Ambientais, Governo da Bahia, (CRA), entre 1984-1986, demonstram que a região pertencente à Enseada dos Tainheiros, subúrbio da região norte da cidade do Salvador que compreende as praias de Plataforma, Ribeira, Lobato e Itapagipe, é a mais crítica em termos de contaminação crônica pelo mercúrio, agravada pelas altas taxas de matéria orgânica oriunda dos esgotos domésticos. Apesar da alta contaminação, da impropriedade destas águas para banho, recreação e extrativismo de moluscos esta região é potencialmente extrativista e atrai marisqueiros, que daí retiram seu sustento alimentar e econômico (CARROZZO 1994).

Esta situação de falta de saneamento no Recôncavo não é recente. Na época colonial, uma das principais causas de morte em Salvador era a fome, as disenterias e as verminoses. Muitas dessas doenças eram atribuídas aos escravos ou ao excesso de

lixo acumulado no fundo das casas, terrenos baldios, formando monturos, onde animais pastavam. A conservação das fontes de abastecimento (cerca de 56) era preocupação do poder municipal, pois além de serem belos monumentos, visavam a medidas de asseio da água que a população bebia. Ainda assim, existiam padeiros que utilizavam águas de charcos dos arredores da cidade na fabricação de seus produtos (AZEVEDO 1969). Hoje estas fontes estão abandonadas e suas águas poluídas. Em 1993, apenas 22% da população residente dispunha de serviços de esgotamento sanitário, lançando seus esgotos no solo e nos corpos d'água (UFBA 1993).

O Programa Bahia Azul foi criado pelo Governo Estadual, em meados dos anos 90, para atender as necessidades de despoluição da BTS, além de esgotamento sanitário, abastecimento de água e controle da poluição hídrica de Salvador e cidades do Recôncavo, encaminhando os efluentes captados até um emissário submarino (<http://www.bahiazul.hpg.ig.com.br/relatorio.html>, acessado em 11/04/03).

Entretanto o Programa tem sido duramente criticado em função não só de sua forma de concepção (de forma burocrática e centralizadora, sem participação popular) como pela tecnologia utilizada (lançamento dos esgotos num único ponto, propiciando a vulnerabilidade operacional, sendo, portanto, questionável do ponto de vista ambiental) (<http://www.peacelink.it/zumbi/org/sindae/ba/ba03.html>, acessado em 11/04/03).

Este Programa não resolveu totalmente o problema do saneamento básico na região, uma vez que várias áreas servidas por tecnologia não adequadas (fossas, lançamentos em córregos, para exemplificar) ainda persistem.

Diante disso, pode-se concluir que o Recôncavo Baiano apresenta um perfil típico de subdesenvolvimento sócio-econômico: concentração de renda, grande densidade populacional nos grandes centros, precárias condições de saneamento básico, população com baixo grau de escolaridade e desemprego (Observações pessoais). Ao longo de sua história, o Estado da Bahia sempre apresentou uma população humana distribuída de maneira desigual, com contrastes quanto à densidade e situação econômica, gerando condições precárias para a vida humana.

A persistência destes problemas, desde a época colonial, e a falta de saneamento básico, na região, possibilitam o estabelecimento crônico de algumas

doenças de veiculação hídrica, bem como a reintrodução de outras, como, por exemplo, a cólera. Em Salvador até os dias atuais, a gastroenterite ainda é a principal causa de demanda ambulatorial e hospitalar entre menores de 5 anos (CARROZZO 1994; SILVA et al. 1996).

O ano de 1855 foi considerado “o ano da cólera na Bahia”, no qual os primeiros casos de diarreia foram registrados no então povoado Rio Vermelho (hoje bairro da cidade do Salvador). Outros casos foram registrados em diversas cidades como Cachoeira, Santo Amaro, Valença, Nazaré e na Ilha de Itaparica,— todas pertencentes à área de influência da BTS (MOREIRA 1997).

A epidemia de cólera, que ocorreu na Bahia, a partir de 1992, teve início na 10.<sup>a</sup> semana epidemiológica, com os primeiros casos confirmados. Como o sistema de informação em saúde na Bahia capta melhor os dados apenas da capital (BARBONI 2002), os números da doença melhor conhecidos são da cidade de Salvador.

A sétima pandemia de cólera chegou a região Nordeste do Brasil em 1992, com rápida expansão. Essa região se enquadra no conceito de “área de risco para a cólera”, tendo, como suporte, a estrutura sócio-econômica e ambiental propícia para instalação e rápida disseminação da bactéria.

Em se tratando de amostras ambientais, já que os vibrios estão amplamente distribuídos no ambiente aquático, em especial no ambiente marinho, estas bactérias, além de poderem ser isoladas, a partir de amostras de água e alimentos de origem marinha, podem também estar presentes em sedimentos de estuários e manguezais. Assim, os ambientes aquáticos, também como a sua fauna aquática (moluscos, ascídias, anelídeos, equinodermas, crustáceos e peixes), são potenciais reservatórios de vibrios.

### **1.3.2 As infecções diarréicas:**

KONEMAN et al (2001) definem patogenicidade como a capacidade de um microrganismo causar doença, enquanto virulência é definida como o grau de patogenicidade dentro de um grupo ou espécies de microrganismos, a qual não é

atribuível a um único fator isolado, mas dependente de vários parâmetros relacionados ao microrganismo, seu hospedeiro a interação entre ambos. O mesmo autor define infecciosidade como a capacidade de se iniciar uma infecção, a qual está relacionada a virulência.

Para que o processo infeccioso se efetive, é preciso que o microrganismo tenha capacidade de aderir e sobreviver nas superfícies mucosas do hospedeiro. Esta aderência é um processo que envolve interação entre as estruturas da superfície bacteriana e a superfície celular do hospedeiro, enquanto substâncias que permitem evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro são produzidas.

Infeções intestinais são causadas por patógenos que ou invadem a mucosa e causam inflamação da parede intestinal (bactérias invasoras) ou bactérias que produzem toxinas (não invasoras), causando diarreias de variadas intensidades e outros desconfortos.

A história epidemiológica das doenças diarréicas, principalmente em surtos, é muito importante para a Saúde Pública, a fim de se verificar a ocorrência em grupos familiares, grupos que compartilham um alimento comum ou em viajantes. Isto porque estas doenças estão diretamente relacionadas ao consumo de alimentos e água de má qualidade, indicando a falta de saneamento básico.

Ao lado das estratégias governamentais de vigilância e controle de doenças, em todo o mundo, existem os programas que visam suprir as necessidades das populações em termos de infra-estrutura básica para a vida e manutenção da saúde. Entre estes programas – analisando agora especificamente a América Latina - está a ampliação da extensão das redes de água potável e esgotos tratados. Isto porque os padrões de morbi-mortalidade para doenças infecciosas, nestes países, especialmente as doenças diarréicas, ainda são causa importante de óbito em todas as faixas etárias.

Em 1990, 2,4 bilhões de pessoas não tinham acesso a condições mínimas de higiene, um número que se manteve inalterado até 1998. Segundo dados da OMS, no ano 2000, aproximadamente 1,2 bilhão de pessoas em todo o mundo não tinham acesso à água potável ou a um poço coberto. Em seu relatório intitulado “Water for Health, Taking Charge” (Água para a saúde: enfrentando o problema), a OMS destaca que seria possível reduzir drasticamente as mortes causadas pelo consumo de água insalubre com um esforço mínimo e barato para purificá-la e melhorar a higiene

pessoal das populações. Isto porque cerca de 80% de todas as doenças humanas estão relacionadas à água não tratada, saneamento precário e falta de conhecimento básico de higiene e dos mecanismos de contágio das doenças.

Doenças transmitidas pelas águas respondem por 25 milhões de mortes a cada ano no Terceiro Mundo. Águas contaminadas são responsáveis pelo tracoma, elefantíase, hepatite infecciosa, dengue, esquistossomose, cólera, entre outras doenças graves (CORSON 1996; MAKULE 2000).

Bebês e crianças com menos de cinco anos são mais vulneráveis às doenças transmitidas pela água (CORSON 1996; RAMAMURTHY et al. 2000), e existem, no Terceiro Mundo, anualmente, 4,5 bilhões de casos de diarreia, nesta faixa etária, acarretando 3 milhões de mortes (CORSON 1996). Só no Brasil, 30.000 crianças morrem anualmente devido à diarreia e cerca de US\$ 2,4 bilhões são gastos a cada ano em internações hospitalares para pacientes vítimas de doenças relacionadas à falta de saneamento (CARROZZO 1994). Logo, observa-se que há uma correlação positiva entre falta de acesso a água potável e os altos índices de mortalidade infantil (CORSON 1996; GEROLOMO e PENNA 1999). Os epidemiologistas acreditam que esta correlação pode ser potencializada por alterações nos padrões econômicos e sociais do país, sendo clássico os estudos de LESER (1975) que demonstrou que a queda da mortalidade infantil na década de 50 e sua ascensão na década de 60 estavam ligadas a tendências inversas do salário mínimo pago naqueles anos.

WARTCHOW (cit. CARROZZO 1994) relata que, até 1993, havia ausência de um planejamento integrado de infra-estrutura e de saneamento urbano no Brasil, e, por isso, 60% dos brasileiros não dispunham de serviços de coleta de esgotos, e destes, 94% não era tratado. Porém, vale ressaltar o trabalho desenvolvido via PLANASA (Plano Nacional de Saneamento), iniciado nos anos 70, que objetivava oferecer água tratada e esgotos, respectivamente, a 80% e 50% da população urbana, quando a população beneficiada pelo programa, em 1984, chegava a 63 milhões de brasileiros (IUNES 1995).

Ainda assim, não se afasta a hipótese de recrudescimento do problema ante a intensa urbanização vivida pelo país, agravada pelo aumento da população favelada, foco de disseminação de fezes em córregos e áreas abandonadas.

De acordo com CORSON (1996), em uma perspectiva mundial, a substância mais nociva à saúde humana não são os resíduos tóxicos ou radioativos, mas sim fezes contendo microrganismos patogênicos. Para este autor, os excrementos humanos representam a fonte mais séria de poluição das águas.

Esta realidade já era conhecida desde meados do século passado pelos profissionais de Saúde Pública, e, inspirada por ela, é que as ações governamentais para saneamento têm sido direcionadas à busca de alternativas para tratamento e disposição mais segura dos esgotos e não simplesmente afastá-los da convivência com humanos (SILVA et al. 1996).

Como resultado direto desta forma de poluição, 900 milhões de casos anuais de doenças diarreicas em todo o mundo são atribuídos as faltas de água tratada e de sistema de esgotamento sanitário. Observa-se, portanto, o que já se conhecia desde 1855, quando JOHN SNOW reconheceu o envolvimento da água na transmissão da principal doença diarreica, a cólera (ROSEN 1994).

A cólera, em humanos, é uma doença provocada por bactérias do gênero *Vibrio*. Caracteriza-se por ser uma enfermidade infecciosa intestinal aguda, causada pela toxina da bactéria *Vibrio cholerae*, a qual pode matar a pessoa em poucas horas depois de manifestar os primeiros sintomas. Por isso, o *V. cholerae* é considerado um dos mais eficientes “matadores da natureza”.

Esta doença é de veiculação predominantemente hídrica, que, em sua forma grave, é potencialmente letal e se manifesta como epidemia, sendo, em muitas regiões do globo, endêmica. Para exemplificar, uma epidemia de três semanas de duração ocorrida em 1994 na República Democrática do Congo matou 50.000 refugiados ruandeses (A TARDE 2003).

Diante da propagação das doenças diarreicas por todo o Brasil, o Ministério da Saúde adotou medidas de vigilância epidemiológica recomendadas pela OMS, entre elas, o monitoramento regular de ecossistemas aquáticos e de certos alimentos com maior risco de contaminação, em especial, os pescados e os moluscos bivalves (WHO 1993; MS 1992).

#### **1.4 Moluscos Bivalves – biologia e ecologia:**

Entre a fauna característica do ambiente marinho estão os moluscos bivalves – moluscos com uma concha formada por duas valvas ovais e convexas, articuladas

por uma “dobradiça”, dorsalmente, que envolvem todo o corpo. São invertebrados aquáticos, sedentários, predominantemente marinhos, que vivem enterrados no substrato não consolidado ou perfurando substratos duros, alimentando-se por filtração de partículas orgânicas em suspensão ou depositadas no meio circulante (RUPPERT e BARNES 1996).

Estudos com as espécies fósseis demonstraram que este grupo de animais possuem longa história geológica conhecida graças a presença das valvas calcárias (concha) que recobrem a sua superfície, apresentando registros fósseis nos depósitos mais antigos do período Cambriano, apesar de terem uma história pré-cambriana ainda não conhecida. Devido aos aspectos conquiliológicos (análise de conchas) preservados, estes animais têm história geológica bem conhecida ao tempo em que auxiliam os estudos sobre paleoambientes (MACHADO e KOTZIAN 2000).

Possuem o corpo mole, daí o nome “moluscos”, o qual é formado basicamente por três regiões: cabeça, pé e massa visceral que é revestida pelo manto ou pálio. Este último contém glândulas que secretam uma concha de composição calcárea sobre forma de calcita e/ou aragonita.

As brânquias, nestes animais, são geralmente muito grandes, em forma de lâminas, em função da atividade coletora/filtradora de alimento que exercem, além das trocas gasosas. Estas não apresentam capacidade seletiva de filtração, sendo o tamanho da partícula o único fator limitante à sua ingestão.

Às vezes, as bordas do manto se fundem, formando um sifão inalante – entrada de água com alimento e oxigênio – e um sifão exalante – por onde sai a água com o gás carbônico, os produtos genitais e as excretas. As correntes inalante e exalante permitem, portanto, que o organismo respire, alimente-se e libere seus produtos de excreção, assim como células reprodutivas (MACHADO e KOTZIAN 2000).

O pé dos bivalves se apresenta como uma adaptação à escavação em substratos macios, lodosos ou arenosos. Esta escavação pode ser profunda (ou seja, profundidades maiores que o comprimento de seus corpos) ou superficial. Variam ainda em termos de velocidade de escavação podendo ser rápidos.

Dependendo da espécie, o ciclo vital destes animais pode variar entre um a 20-30 anos, com registros em algumas espécies de indivíduos com 150 anos de idade. De uma forma geral, a maioria dos bivalves cresce mais rapidamente durante seus

primeiros anos. Os representantes da família Ostreidae alcançam tamanho comercializável dentro de um a três anos, dependendo das condições ambientais. No gênero *Entovalva* encontra-se a única espécie de bivalve parasita conhecido, a qual vive no intestino do pepino-do-mar (RUPPERT e BARNES 1996).

A grande maioria dos bivalves alimenta-se por filtração. A evolução da alimentação por filtração, neste grupo, permitiu uma maior invasão do habitat marinho, apesar que a maioria destes animais permaneceu em fundos de superfície mole, para os quais os graus variáveis de fusão do manto e dos sífões constituem adaptações importantes.

#### **1.4.1 Descrição dos moluscos bivalves marinhos encontrados para comercialização na Bahia:**

Há cerca de 7.700 espécies de moluscos bivalves descritas em todo o mundo, e, no Brasil, embora pouco diversificadas, mexilhões, ostras, sururus e outros moluscos bivalves (Filo Mollusca, Classe Bivalvia ou Pelecypoda, que significa “pé-de-machadinha” devido às escavações; ou Lamellibranchia que significa “brânquias em forma de lâminas” e daí sua característica de “filtrador”) são consumidos largamente, especialmente em regiões costeiras.

As maiores ocorrências de moluscos bivalves na região da BTS e Valença, são registrados em praias e manguezais sob a influência de estuários, cujas características principais são a variação da salinidade e a deposição abundante de matéria orgânica sobre os substratos areno-lodosos ou lodosos. Estas condições ambientais propiciam a colonização por uma fauna malacológica de populações densas, de grande endemicidade e de fácil captura, embora pouco diversificada (PESO-AGUIAR, VERANI e ROCHA 1998), conforme listado a seguir:

##### *Mytella charruana*

Sinonímia de *Mytella falcata*. Vulgarmente chamado na região de “sururu”. Esta designação é antiga, dada pelos índios (“ceruru”), e estes moluscos faziam parte da dieta (SOUSA 1587). Este molusco vive em águas salobras como estuários e regiões lagunares, incluindo mangues, podendo suportar grandes variações de salinidade. São geralmente encontrados em fundos lodosos, fixados em substratos duros a profundidades variadas (KLAPPENBACH 1965). São largamente utilizados

como alimento cujo teor protéico pode ser comparado à carne bovina ou de frango (KNEIP 1982). Na Bahia, a espécie mais abundante é *Mytella guyanensis*.

*Crassostrea rhizophorae*

Conhecida como “ostra de mangue” ou apenas “ostra”.

Vive aderida a substrato duro como rocha ou vegetação de mangue, região onde existe intensa troca de água durante as marés, com o abaixamento periódico da salinidade das águas pela chuva e cursos de água doce. Amplamente utilizado na alimentação humana desde a pré-história.

*Lucina pectinata*

Conhecido pelo nome de “sernambi”, “sernambim”, “ameijoa” ou “lambreta”. Segundo CUNHA (1978) “sernambitinga” é uma variedade de sernambi (do tupi: *sernambi* + *tina* “branco”). Em 1587 SOUSA observou grande endemicidade destes moluscos na Bahia, nas regiões de praia, e que os índios coletavam para alimentar-se abertos no fogo ou crus. Vive sob substrato lodoso ou areno-lodoso em águas rasas, podendo suportar baixa salinidade. Muito utilizado na alimentação dos primeiros brasileiros e suas valvas eram utilizadas para produção de artefatos e como anexo funerário.

*Anomalocardia brasiliiana*

Espécie pouco consumida pelas populações primitivas. É conhecido popularmente como “papa-fumo” ou “bebe-fumo”. Seu habitat são os substratos lodosos, areno-lodosos ou arenosos em águas rasas das zonas entre marés de praias bem abrigadas, podendo suportar variações de salinidade.

Além destas espécies nativas, há outras que são comercializadas, mas pouco conhecidas e sem ocorrência no nordeste brasileiro, sendo designadas popularmente nos supermercados e peixarias “mexilhão” (Mytilidae). Vive aderido a substratos duros e é usado como alimento no sul do Brasil e na Europa. Devido a obtenção do produto beneficiado (sem concha), é impossível identificar taxonomicamente.

#### 1.4.2 Sistema de alimentação e circulação de água:

De acordo com o seu habitat os moluscos bivalves marinhos estão sujeitos a diferentes períodos de alimentação pela água. Em geral, a difusão dos gases e a

circulação de nutrientes seguem um fluxo: a corrente alimentar/ventilatória entra pela parte inferior da cavidade do manto (câmara infrabranquial) na extremidade posterior do animal, fluindo entre os filamentos e sobe entre duas lamelas. A partir dos espaços interlamelares, a água passa no interior da câmara exalante (suprabranquial), e sai através da abertura exalante (suprabranquial) (RUPPERT e BARNES 1996).

A maioria dos bivalves alimentam-se de plâncton fino e de detritos em suspensão na água do mar. Os materiais rejeitados (pseudofeces) deixam a cavidade do manto através da abertura inalante. Periodicamente as valvas executam o movimento de abrir e fechar e aí a água é forçada a sair pela abertura inalante, levando consigo os detritos acumulados.

Estes movimentos de abrir e fechar são controlados por músculos adutores muito fortes, os quais permitem ao animal regular o fluxo de água, para mais ou para menos, pela alteração do tamanho das aberturas no interior da cavidade do manto e através da contração ou da expansão das brânquias. Com isso, alguns bivalves estabeleceram, ao longo da evolução, um ritmo de alimentação que varia em função das marés, por exemplo (BAHIA e PESO-AGUIAR 1998).

Vários grupos de bivalves invadiram substratos firmes vinculados ao ambiente aquático, como madeira, conchas, superfície de outros animais, rochas, raízes, corais, cais, entre outros. A adesão ocorre pela fusão de uma valva com o substrato através de um bisso – secreção protéica viscosa produzida por uma glândula no pé e tem forma de cordões. Entre os bivalves presos por cordões bissais a superfícies fixas estão os mexilhões, que, quando jovens utilizam os cordões bissais para escalar a superfície de adesão. Já as ostras-de-pedra prendem-se a superfície fixa por uma das valvas por cimentação, repousando de um lado fixo.

A grande maioria dos bivalves são infaunais (vivem enterrados), não são presos à superfícies e deslocam-se livremente através dos movimentos do pé.

As espécies que possuem suscetibilidade para indicar ou tolerar condições ambientais particulares ou produzem respostas que sirvam para monitorar mudanças ambientais em intervalos de tempo específicos são considerados organismos bioindicadores ou organismos sentinelas (PESO-AGUIAR 1995).

Os moluscos bivalves são conhecidos como “filtradores” devido à capacidade de retirar e concentrar em seus tecidos pequenas partículas, bactérias e

microrganismos planctônicos que lhes servem de alimento, ou, “bioacumuladores” de poluentes químicos tais como metais pesados presentes no ambiente (PESO-AGUIAR e VERANI 1998).

Segundo alguns estudos, estes moluscos podem ser indicadores mais sensíveis e estáveis da qualidade sanitária de zonas litorâneas do que a própria água (DELATTRE e DELESMONT 1981; PFEIFFER et al. 1985).

Nesta mesma linha, outros estudos apontam em seus resultados a eficiência do uso destes moluscos no que se refere a discriminação da diversidade e precisão quantitativa das bactérias, oriundas da poluição marinha (PLUSQUELLEC et al. 1983 cit. CARROZZO 1994). Aspectos fisiológicos destes organismos relacionados ao processo de fluxo da água são os responsáveis por esta característica. Mexilhões filtram entre 0,5-4,0 litros de água por hora, sendo que os microrganismos sobrevivem em seu estômago apenas por um certo período de tempo, mantendo seu poder infectivo, antes de serem fagocitados. Esta característica fisiológica origina uma concentração de microrganismos na parte comestível do animal, tornando-o além de um bom indicador de poluição marinha, um vetor de doenças transmissíveis (ANDREU 1976).

Estudos realizados no intuito de avaliar a influência do ciclo das marés sobre a capacidade de acumulação de bactérias pelos bivalves, indicam que os fatores de concentração estão em função dos diversos momentos da maré e, para coliformes fecais, os maiores fatores de concentração foram observados nas horas próximas à maré alta, em oposição àquela encontrada na baixa-maré quando encontrou-se uma menor concentração de bactérias nos bivalves (PLUSQUELLEC et al. 1983 cit. CARROZZO 1994). Por outro lado, a baixa ou nula disponibilidade alimentar causa interrupção da filtração (ANDREU 1976).

A *Crassostrea brasiliiana* foi apontada por PFEIFFER et al. (1985) como indicador biológico ideal para monitoramento de águas litorâneas. Nestes animais, a presença de microrganismos em seus tecidos foi detectada cerca de quinze minutos após distribuição bacteriana na água permanecendo viáveis até 3h. Após 24h, no intestino destes animais amostras de bactérias do gênero *Vibrio* estavam viáveis (PRIEUR 1981 cit. LAMPARELLI 1987).

Os bivalves apresentam elevado valor econômico, não só na alimentação humana pelo elevado teor protéico da carne e fonte de cálcio, ferro, vitaminas do complexo B, C e D, mas também devido às espécies produtoras de pérolas, sejam elas naturais ou cultivadas (CURRLIN 1975; PESO 1980).

### 1.4.3 Moluscos bivalves e a saúde humana

Há milhares de anos, o homem brasileiro vem utilizando a fauna nativa das regiões costeiras e dos manguezais de várias maneiras, especialmente como alimento, couro e pele, produção de utensílios. Os primitivos habitantes da costa brasileira utilizavam vértebras de peixes, dentes de pequenos mamíferos e conchas de bivalves, como contas de colar, pingentes e berloques. Achados arqueológicos e paleontológicos, no litoral fluminense, indicaram a presença de conchas perfuradas e polidas para produção de adornos. Na categoria utensílios, dados etnográficos informam a confecção do raspador feito a partir de valvas de moluscos em larga escala, demonstrando a importância deste artefato na vida do grupo. Algumas valvas foram encontradas como parte dos anexos funerários em sepultamentos, sempre colocados a altura lateral do crânio (KNEIP 1987).

Sambaquis (do tupi, *tamba* = marisco; *ki* = amontoado) ou concheiros concentram-se em regiões próximas a manguezais, sendo marcantes desde o litoral de Santa Catarina até o Recôncavo Baiano. Datados de 7.000 a 10.000 anos comprovam as evidências de que os primeiros brasileiros já se utilizavam dos recursos costeiros e dos manguezais para sua sobrevivência. As primeiras teorias sobre sua existência baseavam-se na idéia de que os concheiros se constituíam em acúmulo artificial de conchas de moluscos, vestígios da alimentação de grupos humanos coletores pré-históricos. Estes primeiros estudos que também envolviam paleoantropologia indicavam que comportamento seminômade daqueles grupos de caçadores e coletores, bem como sua estrutura social garantiram o uso eficiente dos recursos disponíveis deste ecossistema através dos tempos (PROUS 1991). O final da cultura dos sambaquis, em terras brasileiras, parece ser coincidente com a implantação da agricultura nas regiões litorâneas ([www.bibvirt.futuro.usp.br](http://www.bibvirt.futuro.usp.br) 2001).

GILMORE (1997) acredita que os sambaquis da costa brasileira não são depósitos artificiais, mas sim amontoados naturais de conchas fechadas de ostras, mexilhões, pela grande endemicidade destes animais na época pré-histórica.

Esta idéia de acúmulo natural vem perdendo sua força diante das últimas descobertas. De acordo com BLASIS e GASPAR (cit. FAPESP 2000), a corrente “artificialista” (que vê os sambaquis como obra humana) reúne duas fortes vertentes que têm norteado a pesquisa atualmente: uma os considera resultado da acumulação de restos de comida e, portanto, seriam locais de moradia; e outra que os vê como construções propositais, baseado na existência de muitos sepultamentos humanos, sendo, portanto, considerados monumentos funerários.

As investigações destes pesquisadores citados, em sambaquis do estado de Santa Catarina, têm apontado no sentido de que a população sambaqueira era, na verdade, sedentária, demograficamente expressiva, com tecnologia e conhecimento grandes, além de possuírem uma complexa organização social suficiente para justificar cemitérios comunais. Assim, os sambaquis seriam construções propositais.

Estudos, envolvendo o grau e o tipo de desgaste dentário, possibilita relacionar certos aspectos da cultura humana com a dieta e determinação dos padrões de subsistência, em função do aparelho mastigador ser o primeiro a ter contato com o alimento (MELLO 1987; KNEIP 1987).

BLASIS e GASPAR (cit. FAPESP 2000) detectaram durante a análise de esqueletos humanos encontrados em sítios arqueológicos de sambaquis, evidências de epidemias, que causaram lesões ósseas, características de doenças infecciosas. Outros estudos demonstraram, através de métodos paleopatológicos, que as doenças mais comuns a estes primeiros habitantes são quase restritas aos processos de destruição dos dentes (devido à abrasão por areia contida nas valvas dos moluscos) e aumento na freqüência de osteoporose grave, possivelmente devido à carência de ferro, não associada a fatores nutricionais (pela dieta rica em moluscos), mas pela larga incidência de parasitoses intestinais (PROUS 1991). Assim, a vinculação manguezal-moluscos bivalves-homem-doenças intestinais remonta muitos séculos na história do Brasil.

Infelizmente, a historiografia brasileira da alimentação é muito pobre, devido a dificuldade de ordem documental, explorando-se apenas textos de viajantes e naturistas (MENEZES e CARNEIRO cit. BRUNO 2000).

Além das doenças intestinais, os vîbrios também estão relacionados a outras doenças em humanos, mas que passam despercebidas, especialmente no Brasil, pela

falta de notificação. Os exemplos envolvem a exposição ao ambiente marinho, como a necrose de pele ferida, em acidentes por mordedura de peixes, cortes com conchas de moluscos bivalves ou outros artefatos cortantes como cacos de vidro (que são ocasionalmente os mecanismos de penetração dos *víbrios* no corpo humano), conjuntivites purulentas e meningites.

Estes riscos de adoecer por infecções causadas por *víbrios* não são recentes, pelos hábitos da população brasileira. Segundo GILMORE (1997), os indígenas coletavam as espécies na maré baixa, com as mãos ou com ajuda de uma vara. Além do uso na alimentação, os fragmentos de casca podiam ser utilizados como objetos cortantes, como facas, vasilhas ou ornamentos, junto com as pérolas.

Material malacológico, recuperado no sambaqui Zé Espinho, em Guaratiba, Rio de Janeiro, revelou haver, por parte das populações humanas que ali estiveram, uma preferência alimentar por moluscos bivalves, principalmente pelas ostras de mangue e de pedra. É provável que esta preferência estivesse relacionada a grande endemicidade das espécies, num período em que os bancos naturais estiveram no máximo de seu desenvolvimento tornando fácil a captura dos animais (MELLO 1987).

Há anos é reconhecida a associação entre doenças diarréicas bacterianas e ingestão de moluscos bivalves contaminados, tais como a febre tifóide, gastroenterite por *Vibrio parahaemolyticus* e infecções por *V. cholerae* (EARAMPAMOORTHY e KOFF 1975). Ou ainda os resultados de KUEH e CHAN (1985) que relataram a ocorrência de bactérias dos gêneros *Vibrio*, *Acinetobacter* e *Aeromonas* em moluscos bivalves coletados no Oceano Pacífico. Em outro trabalho, esses mesmos autores relatam a presença de *víbrios* enteropatogênicos diversos, isolados em moluscos bivalves, encontrados no Golfo Nicoya, Costa Rica (GARCIA CORTES e ANTILLON 1990). Todas estas investigações utilizaram metodologias clássicas da Microbiologia.

A estrutura epidemiológica, envolvendo moluscos bivalves e doenças humanas, é bastante ampla. Além de poderem estar contaminados por *víbrios*, os moluscos bivalves podem também estar envenenados com metais pesados ou microalgas planctônicas que produzem toxinas, em função do local onde vivem e da estação do ano. Estas circunstâncias ambientais estão diretamente relacionadas à poluição dos

mares, baías, estuários, manguezais, devido à emissão “in natura” de esgotos industriais, hospitalares e domésticos e lixo, contendo metais pesados, bactérias patogênicas e outros poluentes, tornando estes moluscos impróprios para o consumo.

A intoxicação por toxinas de algas ou por metais pesados, assim como a infecção por vibrios em humanos, provocadas pelo consumo de moluscos bivalves, provenientes de águas estuarinas ou regiões de manguezal poluídas, resultam em problemas de saúde que variam de leves a severos. Enquanto a diarreia provocada por toxinas de cianofíceas ou vibrios aparece algumas horas, após a ingestão do marisco contaminado, os metais pesados consumidos juntos com os moluscos bivalves, por sua vez, vão-se acumulando ao longo dos anos no organismo humano conduzindo a vários distúrbios de manifestação tardia.

É reconhecido que a contaminação do homem, nesta cadeia alimentar, é acidental. Porém, a propagação de agentes patogênicos, através da mesma, via frutos do mar, se constitui num mecanismo importante de veiculação de doenças, entre elas, aquelas causadas pelos vibrios.

Estudos conduzidos por COLAÇO et al. (1998), no Estado de Pernambuco, evidenciaram uma participação discreta dessa via de transmissão de doenças diarreicas. Ainda assim, os autores enfatizam que esta não deve ser negligenciada, se for considerada a participação de um manipulador assintomático ou uso da água contaminada para preparo de alimentos.

Estudos anteriores, realizados por SHEWAN e LISTON (1955 cit. BERTULLO 1975), apontam duas principais fontes de toxi-infecção alimentar produzida pelo pescado: aquele, no qual o pescado está naturalmente incriminado; e aquele que resulta da inadequada manipulação e distribuição do produto. Ambas possibilidades encontram respaldo na literatura científica, pois várias epidemias têm sido relatadas, correlacionando o consumo de pescados e doenças humanas e, por outro lado, EARAMPAMOORTHY e KOFF (1975), trabalhando com contaminação secundária de moluscos bivalves, demonstraram que esta pode ocorrer durante o acondicionamento, transporte, estocagem e exibição do produto nos mercados. Outra via encontrada por estes pesquisadores foi a manipulação imprópria de mariscos contaminados o que pode permitir a proliferação de bactérias patogênicas e levar a produção de toxinas que podem causar doenças em humanos.

A manipulação e a conservação inadequada são grandes fatores de riscos. De acordo com a OMS (1975), em vários países subdesenvolvidos, o clima pode dificultar a manipulação segura e a conservação destes produtos. Constatou-se ainda, neste estudo, a escassez de pessoal treinado, além da indisponibilidade dos recursos necessários, tais como meio de transporte, água de boa qualidade, sal e gelo como fatores agravantes. Além disso, os manipuladores de alimentos, em geral, têm pouco conhecimento dos riscos à saúde e de práticas sanitárias.

O risco de doenças transmitidas pelos mariscos aumenta especialmente se consumidos crus ou mal cozidos. Entretanto, no Brasil, com relação a este hábito alimentar, é comum as pessoas consumirem mariscos crus temperados apenas com sumo de limão. Um estudo recente de pesquisadores argentinos (DE CASTILLO et al. 2000) mostrou que o sumo do limão apresenta atividade bactericida ou bacteriostática, a diferentes tempos de exposição, contra o *V. cholerae* O1 biotipo El Tor sorotipo Inaba tox+, mesmo quando diluído. Os autores não citam se outras linhagens ou outras espécies de vibrios foram estudadas. Por isso, o risco de contaminação deve persistir para outras espécies de vibrios.

Outros estudos recentes comprovam a presença de vibrios potencialmente patogênicos em moluscos bivalves apontando estes produtos como reservatórios destas bactérias, associando seu consumo ao risco de adoecer (NDIP et al. 2002; POTASMAN, PAZ e ODEH 2002).

Uma vez detectados casos de diarreia, em que seja comprovado que as vias de contaminação envolvem alimentos de origem marinha, algumas medidas urgentes de Saúde Pública devem ser adotadas, destacando-se, entre elas, a identificação das áreas de coleta, venda e preparo de moluscos contaminados e a suspensão da mariscagem e da comercialização.

Ações da Vigilância Sanitária, neste sentido, até agora só são possíveis quando há surtos de diarreia, isto porque os moluscos infectados ou envenenados não podem ser identificados por alterações na aparência, textura, odor ou gosto, dificultando o controle de qualidade dos mesmos. Apenas os procedimentos laboratoriais podem diagnosticar com precisão a qualidade dos mariscos, ou seja, quando não há alterações macroscópicas identificáveis, especialmente quando há contaminação bacteriana.

### 1.5 Aspectos biológicos e epidemiológicos de bactérias do gênero *Vibrio*:

O gênero *Vibrio* pertence à família *Vibrionaceae*, a qual inclui também os gêneros *Plesiomonas* e *Photobacterium*, sendo este gênero o mais importante da família (HOLT 1994; MATTÉ 1996).

As espécies do gênero *Vibrio* são representadas por bacilos Gram-negativos, curvos ou retos, móveis por meio de um ou mais flagelos polares. São anaeróbias facultativas, não formam esporos, e a maior parte de seus representantes produz oxidase. São habitantes de ambientes aquáticos e a maioria requer 2-3% de cloreto de sódio para sobreviver. Formam o microbiota aquático responsável pela reciclagem de compostos orgânicos, tais como quitina.

Embora tenham sido identificadas trinta e oito ou mais espécies de *Vibrio*, todas, com exceção de apenas três, são consideradas microrganismos ambientais típicas do ambiente marinho (MATTÉ 1996).

As três espécies, reconhecidamente patogênicas para o homem, podem ser divididas em dois grupos: *V. cholerae* O1 e O139 e vibriões não-coléricos (*V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*). Por outro lado, evidências científicas recentes sugerem ainda que outros víbrios, entre eles, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii* e *V. hollisae* podem estar associadas a infecções humanas (BAUMANN e SCHUBERT 1984; FRANCO e LANDGRAF 1999; LESMANA et al. 2002).

Várias bactérias do gênero *Vibrio*, isoladas do ambiente, são agentes etiológicos de doenças em humanos que vão desde gastroenterites até septicemia letal em indivíduos debilitados (MORRIS JR. e BLACK 1985; WEST 1989; ZANETTI et al. 2001). Além da veiculação pela água, inclusive mineral, as doenças diarréicas causadas por víbrios podem ser transmitidas pelo consumo de vegetais, pescados e mariscos crus, mal cozidos ou preparados/cultivados em condições precárias de higiene (FEACHEM 1981), ou pelo contato com o ambiente onde estejam disseminados (WEST 1989).

Fica claro, portanto, que as doenças causadas por víbrios são um problema de Saúde Pública relacionado à falta de acesso à água potável e às boas condições de saneamento. Estas doenças, em especial as diarréicas, trazem consigo uma conotação de miséria e ausência de infra-estrutura, pois só ocorrem de forma epidêmica em

áreas com precárias condições de vida (WALDMAN et al. 1995). No Brasil, de uma forma geral, estas tendem a se caracterizar como doenças de pequenas cidades e vilas, nas quais inexista saneamento básico e haja indisponibilidade de água potável (WALDMAN 1998).

Dentre as mais graves doenças diarréicas causadas por víbrios, destaca-se a cólera, causada pelo *Vibrio cholerae* (FIGURA 1) cuja notificação dos casos é obrigatória em todo o mundo, de conformidade com o Regulamento Sanitário Internacional de 1969.



Fonte: [www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturecholera](http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturecholera). acesso em 28/11/2002.

FIGURA 1 – Bactéria *Vibrio cholerae* vista ao microscópio.

O aspecto clínico marcante da cólera consiste numa diarréia aquosa, repentina e intermitente levando o indivíduo acometido à desidratação, choque hipovolêmico e, em algumas horas, pode levar à morte, se não houver tratamento médico.

As descrições dessa doença remontam a tempos que antecedem a era cristã, como pode ser constatado nos escritos de Hipócrates. Foi também descrita como entidade mórbida, distinta das demais diarréias no Oriente, no século XVI, permanecendo desconhecida dos povos ocidentais até o século XIX, quando uma epidemia originária da Índia atingiu a Europa, a África e a América do Sul.

Após mais de 100 anos de estudos, esses patógenos intestinais humanos ainda causam doenças, especialmente em áreas com carência de saneamento básico (MERRELL, HAVA e CAMILLI 2002). Conhece-se atualmente cerca de 206 diferentes sorogrupos O, cuja classificação é baseada no antígeno O da parede celular, todos com potencial epidêmico e pandêmico (RIVERA et al. 2001; HOSSAIN et al. 2002).

Somente os sorogrupos O1 e O139 são conhecidos até o momento como agentes causadores da cólera epidêmica por carregarem genes de virulência necessários à patogênese em humanos, especialmente, genes relacionados com a produção da toxina colérica (CT), fator principal da virulência (COLWELL 1984; KAPER et al. 1994; MATTÉ 1996; SHARMA et al. 1998a e 1998b; SAHA, DUTTA e DE 1999; FARUQUE e NAIR 2002).

No hemisfério ocidental, a doença teve seu aparecimento recente, dentro da 7ª pandemia, iniciada na América Latina em 1991 no Peru, com o surgimento de um novo biotipo de *V. cholerae* O1, chamado El Tor, havendo rápida propagação para os países vizinhos, inclusive o Brasil, no qual foi introduzida através da região amazônica (GEROLOMO e PENNA 1999). Esta distribuição rápida é atribuída ao fato do biotipo El Tor manter-se no ambiente melhor do que o biotipo Clássico (ALI et al. 2001).

Em menos de um ano, a cólera chegou ao nordeste brasileiro, provocando diversas mortes. Entre abril de 1991 e março de 1996, foram notificados ao Ministério da Saúde 154.415 casos de cólera, e a maioria concentrou-se na região Nordeste com 91,9% (GEROLOMO e PENNA 1999). A partir de 1995 a notificação de casos de cólera no Brasil declinou de forma significativa (1997: 3.044 casos; 1998: 2.735 casos), mas o risco de surtos persiste, especialmente pela falta de saneamento básico (MOREIRA 1997; RUBIN 2000).

Desde então, ainda que seu impacto sobre a morbi-mortalidade tenha diminuído (GEROLOMO e PENNA 1999), a cólera é considerada um grave problema de Saúde Pública, pois afeta negativamente as atividades econômicas de uma região como o turismo, a exportação de alimentos envolvendo mariscos e demais produtos pesqueiros. Só no Peru, foi estimado, durante a fase epidêmica, de 1993, em 500 milhões de dólares anuais o prejuízo causado pela doença para a indústria, turismo e atividade pesqueira (SALAZAR-LINDO 1993).

A epidemia de cólera no Peru tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores, por envolver, além de aspectos relativos à Epidemiologia e à Clínica, também os econômicos, culturais, ambientais, os quais têm auxiliado o entendimento sobre como ocorreu a disseminação da doença (OPS 1995).

A exemplo, SEAS et al. (2000), entre outras conclusões, atribuem o sucesso da invasão do *V. cholerae* como resultante de condições ambientais que existiram durante o fenômeno *El Niño*, especialmente durante 1997, considerado um ano atípico em termos de condições climáticas. Este fenômeno meteorológico natural ocorre em períodos de 2 a 7 anos, caracterizado pelo aumento anormal da temperatura das águas do Oceano Pacífico. Com o aumento da temperatura da água superficial ocorre um aumento significativo do plâncton, gerando maior biomassa, e, conseqüentemente, maior proliferação das bactérias recicladoras de quitina.

O fenômeno climático *El Niño* provocou alterações nas correntes marítimas, ventos e chuvas, associado a um aumento na temperatura ambiental especialmente nas águas oceânicas (COLAVITTI e GIRARDI 2002). Casos de cólera e outras doenças foram freqüentes em épocas que aconteceram o fenômeno *El Niño*. Segundo COLWELL (1996), a sétima pandemia de cólera, iniciada em 1991, ocorreu na mesma época do fenômeno *El Niño*.

O sucesso da disseminação do vibrião colérico nas epidemias ainda é obscuro, devido aos múltiplos fatores envolvidos. Modelos animais têm sido usados no estudo da doença, porém nenhum reproduz fielmente o que acontece com humanos, especialmente no tocante ao surgimento contínuo de novas linhagens epidêmicas, como aquele relatado por COELHO et al. (1995) sobre a ocorrência de um novo clone clínico O1, denominado “variante amazônica”, o qual foi agente de surtos de diarreias coléricas na região norte do Brasil.

As bactérias pertencentes ao grupo não-O1 não-O139 que englobam linhagens autóctones da flora bacteriana de ecossistemas aquáticos também são patogênicas. Há relatos de diarreias brandas até coléricas causadas por esta linhagem após consumo de alimentos de origem marinha (COLWELL, KAPER e JOSEPH 1977; ADKINS et al. 1987; POURSHAFIE et al. 2002; LI et al. 2002).

Há outras bactérias do gênero *Vibrio* causadoras de diarreias graves, associadas à ingestão de pescados ou mariscos, conforme explicado abaixo.

O *Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria estritamente halofílica (só cresce em presença de NaCl a 2-3%), de habitat exclusivamente marinho, especialmente, águas costeiras. Sua ocorrência é sazonal, sendo encontrada em períodos de estações mais quentes.

Sendo esta bactéria mais prevalente no ambiente aquático em meses quentes, existe, portanto, uma pronunciada incidência de gastroenterite em relação a sazonalidade (KELLY e STROH 1988).

Este vibrio é conhecido como agente causador da gastroenterite desde 1950, enfermidade que foi sempre associada ao consumo de alimentos de origem marinha crus ou mal cozidos, especialmente no Japão, onde é responsável por 73% dos casos da doença (COLWELL 1984; WEST 1989; ELLISON et al. 2001; HARA-KUDO 2001).

FRANCA et al. (1980), estudando mariscos e peixes, obtidos em peixarias de Salvador, Bahia, encontraram *V. parahaemolyticus* em 5% das amostras de peixes e em 19% das amostras de mariscos.

Em 1981, DAVIS et al., estudando amostras atípicas de *V. cholerae* sacarose negativas, identificaram na verdade uma nova espécie de vibrios, o *V. mimicus*, o qual foi isolado de casos clínicos de gastroenterite contraída após ingestão de ostras cruas. Outros isolamentos foram feitos a partir de fezes humanas diarréicas e de secreções de ouvido (SHANDERA, JOHNSTON e DAVIS 1983).

O *V. fluvialis* foi identificado como patógeno potencial em 1977. KHAN e SHAHIDULLAH (1982) realizaram um extenso estudo epidemiológico sobre variáveis relacionadas à diarréia causada por *V. fluvialis* e concluíram que a água foi o veículo mais associado.

O *V. furnisii* era denominado *V. fluvialis* biogrupo 2. Sua epidemiologia ainda não está bem definida, embora tenha sido relacionado a casos de gastroenterites, devido à ingestão de alimentos marinhos (FARMER, HICKMAN-BRENNER e KELLY 1985; MORRIS JR e BLACK 1985).

O *V. vulnificus* é um patógeno emergente com potencial invasivo e letal que pode causar desde gastroenterites até septicemia (NASCIMENTO et al. 2001). Esta espécie que pode ser confundida com o *V. parahaemolyticus* durante o isolamento em ágar TCBS, requer pouco sal para o crescimento, mas é encontrado na água do mar e, especialmente, em moluscos bivalves (NASCIMENTO et al. 2001).

O primeiro caso clínico relatado, envolvendo *V. vulnificus*, foi em um indivíduo sadio, em 1970, o qual adquiriu uma infecção na perna após coleta de mariscos em águas salgadas (WEST 1989). Há outros relatos de infecções com

necrose por *V. vulnificus* provocadas por ferimentos com utensílios ou conchas durante a limpeza de frutos do mar (FRANCO e LANDGRAF 1999).

Sabe-se que este vibrio é comumente encontrado em ostras. Pesquisas sobre a sobrevivência de *V. vulnificus* em ostras (*Crassostrea gigas* e *Crassostrea virginica*), realizadas por KAYSNER et al. (1989), provaram que esse microrganismo, quando injetado em ostras mantidas a 4°C, sobrevivia por, pelo menos, 06 dias, enquanto que ostras naturalmente contaminadas mantiveram-se infectadas por 14 dias a 2°C. Foi observado também que a presença deste microrganismo no exsudato das ostras poderia contaminar outras ostras “sadias” estocadas. Por fim, esses autores concluíram que o número de *V. vulnificus* não deve aumentar em ostras mantidas a 10°C ou menos, e que, por sobreviverem mesmo sob refrigeração, indicava um alto potencial para causar doença.

Desde 1973 que o *V. alginolyticus* foi reconhecido como patógeno para humanos, estando relacionado a infecções de pele (ENGLISH e LINDBERG 1977), ouvido externo (HANSEN, CROKAERT e YOURASSOWSKY 1979) e bacteremias em indivíduos imunocomprometidos e/ou que sofreram lesões expostas associadas com exposição recente ao ambiente marinho (ENGLISH e LINDBERG 1977; PUY et al. 1989). Há também relatos de casos de conjuntivite e gastroenterite aguda provocadas por esta bactéria (KONEMAN et al. 2001).

MOLITORIS et al. (1985), estudando a distribuição de *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* em amostras de água do mar e alimentos de origem marinha, ambos coletados na Baía de Jacarta, Indonésia, isolaram estes vîbrios em aproximadamente 68% e 72%, respectivamente, das amostras dos alimentos marinhos analisados.

O *V. hollisae* é uma espécie halofílica, também associada à diarreia, típico da costa americana do norte (MORRIS JR e BLACK 1985). Cresce pouco em ágar TCBS e seu método de isolamento mais comum é a partir de fezes de indivíduos com gastroenterite. Existem poucos estudos sobre a ecologia destas bactérias, porém há uma forte correlação entre infecções por este vibrio e o consumo de alimentos crus de origem marinha (RANK, SMITH e LANGER 1988; McGIBBON 1989).

Outro vibrio marinho pouco conhecido é o *V. damsela*, o qual está associado à exposição da pele lesada ou ferida, a animais marinhos ou água do mar de áreas

tropicais e semitropicais do globo (COFFEY et al. 1986). Devido a algumas características foi proposta sua transferência para o gênero *Photobacterium* (SMITH et al. 1991).

A primeira evidência de infecção em humanos atribuída ao *V. metschnikovii* foi relatada há vinte anos por JEAN-JAQUES et al. (1981). Posteriormente, HANSEN et al. (1993) registraram dois casos de septicemia causada por este vibrio: um caso fatal de indivíduo com cirrose hepática, insuficiência renal e diabetes, e outro de uma mulher idosa, com problemas respiratórios e ferida infectada na perna, tratada com êxito.

O *V. metschnikovii* tem distribuição mundial sendo com frequência isolado do ambiente (coleções de água doce e marinhas com vegetação, rios e esgotos; também em lagostins e caranguejos) e raras vezes de fezes ou tecidos humanos. Difere dos demais víbrios pela ausência da enzima citocromo oxidase, típica das bactérias deste gênero (KONEMAN et al. 2001).

Há apenas um relato de infecção humana causada por *V. cincinnatiensis*. Este patógeno foi descrito por BRAYTON et al. (1986) num caso de bacteremia e meningite, em mulher idosa, a qual, após tratamento com antibióticos, teve recuperação sem seqüelas. Contudo, sobre sua virulência e ecologia, não há outros registros na literatura.

Também foi descrito caso único de infecção em humanos, em uma menina de 11 anos, nos Estados Unidos, causado pelo *V. carchariae*, conhecido patógeno de tubarões (PAVIA, BRYAN e MAHER 1989).

## **1.6 Estudos ecológicos de bactérias do gênero *Vibrio*:**

Os microrganismos procariotos, dentre todos os seres vivos, foram as primeiras formas de vida a surgirem na Terra, e, desta forma, estes têm maior tempo de evolução. Associado ao fato de possuírem um curto ciclo vital, material genético simples, conseqüentemente, estes seres vivos possuem maior potencial para rápida evolução e adaptação.

Mesmo com seu desenvolvimento morfológico limitado, os microrganismos possuem características fisiológicas bem diversificadas, permitindo a sobrevivência de algumas espécies em ambientes extremos, inabitáveis para outras formas de vida.

Ao mesmo tempo, outras espécies conseguem sobreviver a mudanças ambientais drásticas.

As bactérias do gênero *Vibrio* são pertencentes à flora normal da superfície das águas salobras, onde podem ser encontradas livres ou em associação com o plâncton (ALI et al. 2002). Neste ambiente, a temperatura é o principal parâmetro que controla sua distribuição, aparecendo em grandes concentrações (*blooms*) quando a temperatura das águas sobe (TAMPLIN et al. 1990). Outros fatores como salinidade e pH também interferem, sendo que algumas espécies adaptam-se bem às mudanças de temperatura e salinidade.

Sabe-se, até então, que dentre todas as espécies, os *V. cholerae* não-O1 não-O139 são as mais encontradas em isolados a partir de amostras ambientais (COLWELL 1996). Entretanto, LI et al. (2002) sugerem a possibilidade da existência de linhagens patogênicas pertencentes a este sorogrupo. Para testar esta hipótese estes pesquisadores realizaram um “screening” com 300 cepas de *V. cholerae* não-O1 não-O139 para a presença de genes de virulência, encontrando, em diversas amostras, uma certa heterogeneidade em relação à região de virulência, mas a presença universal do fago CTXphi. A identificação de *V. cholerae* não-O1 não-O139, com potencial patogênico, indica a possibilidade de uma futura epidemia causada por bactérias deste sorogrupo, tornando-o, desta forma um patógeno emergente.

Devido à ocorrência de *V. cholerae* O1 e O139 em ambientes aquáticos de zonas endêmicas e epidêmicas, pensava-se que estas bactérias eram oriundas do trato intestinal humano, apenas. Pesquisas realizadas por COLWELL et al. (1977) demonstraram que este microrganismo é autóctone do ambiente aquático. Assim, os estudos têm convergido ultimamente para o estudo de víbrios ambientais, uma vez que seu habitat natural parece ser o ambiente, e sua entrada no corpo humano é considerada acidental.

Com a pouca produção científica sobre o gênero *Vibrio*, no Brasil, a possibilidade de se estabelecer correlações e previsões ecológicas-climáticas com uma possível eclosão de surtos torna-se difícil, pois, a maior parte destes estudos está restrita à área clínica. Sobre a ocorrência de víbrios ambientais muito pouco se sabe, e o maior parte dos estudos está direcionado à espécie *V. cholerae* em amostras

oriundas dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, a partir de 1981, como aqueles realizados por MARTINS et al. (1991), MARTINS et al. (1993), SATO (1995), MATTE (1996) e BARROS (2000). Destaca-se o trabalho pioneiro de MARTINS (1988) como marco na pesquisa da ecologia de vibrio no Brasil.

A Organização Mundial de Saúde instituiu como um dos pontos básicos para controle das epidemias de cólera o rastreamento de *Vibrio cholerae* O1 a partir do monitoramento bacteriológico de ecossistemas aquáticos, especialmente no período que antecede a eclosão de surtos (WHO 1993).

Esta mesma metodologia pode ser utilizada para outros víbrios, potencialmente patogênicos, especialmente em áreas de influência costeira, como é o caso da região da Baía de Todos os Santos. Alguns municípios próximos a sua área de influência tiveram, desde 1991 até então, casos notificados de cólera, e ocorrência de doenças diarreicas de origem não identificada é comum (MOREIRA 1997). Outras patologias envolvendo víbrios na região igualmente não há registros.

Neste sentido, as pesquisas ambientais podem ser dirigidas para investigação da sobrevivência e os possíveis nichos ecológicos das bactérias, como forma para explicar sua propagação.

O monitoramento ambiental, associado ao estudo do genoma de microrganismos patogênicos autóctones ou exóticos, permite a detecção e o acompanhamento do surgimento de variações genéticas entre os microrganismos estudados, o que seria útil para permitir aos gestores de Saúde Pública estabelecerem estratégias de prevenção, controle e intervenção de agravos transmitidos por estes.

Populações microbianas de ambientes marinhos têm sido monitoradas há mais de 100 anos. A presença de certas bactérias, em destaque as patogênicas, neste ambiente, pode indicar os parâmetros biológicos e físico-químicos locais, além de permitir planejamento de estratégias em saúde de forma a garantir áreas livres à recreação, lazer, pesca e mariscagem.

O monitoramento acurado de bactérias, no ambiente, requer uso de métodos apropriados derivados de diversas áreas do conhecimento humano, especialmente no tocante aos ecossistemas marinhos. As bactérias do gênero *Vibrio* aí se incluem: são próprias deste ambiente, são pouco conhecidas e possuem interesse para o homem no

sentido de que podem causar surtos ou epidemias. Os resultados de estudos, conduzidos sobre a relação víbrios versus meio ambiente, podem facilitar o entendimento sobre a sazonalidade em relação à densidade populacional e autoecologia (HUQ e COLWELL 1995).

Assim, o trabalho conjunto de microbiologistas, ecologistas, oceanógrafos e epidemiologistas, através da utilização de dados meteorológicos pode prevenir novas epidemias (COLWELL e HUQ 1999).

### 1.6.1 Isolamento de víbrios ambientais:

O isolamento e a caracterização de bactérias são feitos por meio de análises dos microrganismos e aplicação de critérios de identificação permitindo a inclusão em estruturas taxonômicas, e, assim, o gênero e a espécie podem ser determinados. Os critérios de identificação vão desde a morfologia celular (forma, tamanho); morfologia das colônias em meio seletivo de crescimento; características bioquímicas (por exemplo: formação de produtos bioquímicos finais, presença de enzimas, etc); testes sorológicos (como a detecção direta de antígenos); análises genéticas com sondas de ácidos nucléicos e outras técnicas moleculares por amplificação de genes (por exemplo, a reação em cadeia da polimerase).

Conforme já dito anteriormente, estudos da ecologia de bactérias do gênero *Vibrio* são escassos no Brasil, dificultando o conhecimento sobre este gênero. O isolamento de algumas espécies pertencentes a este gênero é difícil e partem, geralmente de amostras de plâncton obtido por concentração ou amostras de animais marinhos (RUBIN 2000).

O meio de cultura de enriquecimento é de pH alcalino, seguido pelo isolamento em meio seletivo, como o ágar TCBS, também de pH alcalino. Após a incubação, as colônias presuntivas de serem do gênero *Vibrio* aparecem nas colorações amarelas (espécies fermentativas de sacarose, por isso chamadas sacaroses positivas) ou azul-esverdeada (espécies não-fermentativas de sacarose, por isso chamadas sacaroses negativas). Geralmente ambas são redondas, planas de 2-3mm de diâmetro e opacas (TRABULSI 1991; KONEMAN et al. 2001; TORTORA, FUNKE e CASE 2002).

Podem ser realizados cerca de 20 testes bioquímicos para identificação das espécies, porém sabe-se que em *V. cholerae* os isolados ambientais respondem de

forma diferente a algumas destas provas quando comparadas com as respostas dos isolados clínicos (RUBIN 2000).

Estes testes bioquímicos além de trabalhosos são caros e sujeitos a diversas variáveis que interferem nos resultados (FRANCO 1999). Assim, testes mais refinados e sensíveis – como as análises moleculares – poderão ajudar a confirmar a espécie a que pertence a bactéria em estudo.

Com a evolução dos estudos em Biologia Molecular, estes vêm contribuindo com várias técnicas alternativas para identificação de microrganismos, de forma rápida, eficaz e mais acurada, todos baseados em Biologia Molecular, como PCR.

Nos últimos anos, métodos imunológicos para detecção de microrganismos patogênicos foram muito utilizados com sucesso, como base de triagem e identificação, seguidos de longe dos métodos moleculares, ainda pouco difundidos no Brasil, especialmente no campo da Saúde Pública.

### **1.7 Biologia Molecular de bactérias do gênero *Vibrio*:**

Há muito tempo que se conhece os princípios moleculares da organização e regulação da expressão gênica em procariotos, devido a sua extrema simplicidade.

Em linhas gerais, baseado nas informações obtidas a partir de *Escherichia coli*, o cromossomo bacteriano é uma molécula circular de dupla fita de DNA com  $5 \times 10^6$  pares de bases, com peso molecular médio de  $2 \times 10^9$  daltons e apresentando pouca proteína associada. A replicação é semiconservativa, e os processos de transcrição e tradução são simultâneos (TRABULSI 1991; KONEMAN et al. 2001).

A expressão gênica em bactérias é regulada por condições intracelulares e/ou ambientais, mediada por sinais físicos ou químicos. Existem duas categorias de regulação: a indução e a repressão, as quais são interdependentes. Genes que codificam enzimas que participam de uma via metabólica particular freqüentemente estão em posições próximas no cromossomo bacteriano formando blocos gênicos denominados **operons**. A organização gênica em operons é muito comum em procariotos e constitui numa estratégia eficaz de regulação coordenada de genes.

Como os genes bacterianos, em geral, estão organizados em operons, deduz-se que esta disposição facilita a eficiência da regulação da expressão gênica, por colocar próximos uns dos outros genes envolvidos no mesmo processo metabólico, fazendo

do operon uma unidade genética da expressão coordenada por uma região regulatória única afetando a expressão de todo conjunto gênico (ALBERTS et al. 1997).

Os genes que compõem um operon são transcritos em um único RNA mensageiro e são coordenadamente induzidos ou reprimidos. Conjunto de operons que são conjuntamente regulados por um mesmo sinal regulador são chamados **regulons**.

Em geral, o aspecto mais importante do material genético de víbrios está relacionado à presença de genes de virulência, os quais estão ligados a elaboração de várias toxinas extracelulares. Os principais genes de virulência em víbrio estão organizados em operons (FRANCO e LANDGRAF 1999).

Muito pouco se conhece quanto à Biologia Molecular das bactérias do gênero *Vibrio*, e, entre suas espécies, a mais conhecida ainda é o *V. cholerae*. Esta bactéria possui dois cromossomos sendo o maior de 2,3 Mb, e o menor de 1,07 Mb (também conhecido como megaplasmídeo) (TAGOMORIK, IIDA e HONDA 2002; HEIDELBERG et al. 2000).

A maior parte dos genes para as funções celulares como replicação do DNA, transcrição, toxinas, adesinas, estão no cromossomo maior. No cromossomo menor são encontrados genes adicionais, como nos plasmídios, e daí, ser considerado um megaplasmídeo, possivelmente capturado por um ancestral *V. cholerae* ao longo de sua história evolutiva (HEIDELBERG et al. 2000).

Trabalhando com cepas virulentas de *V. cholerae*, MILLER e MEKALANOS (1984) identificaram um *locus* regulatório identificado como *toxRtoxS* que controla a expressão de *ctx* (gene relacionado à proteína colérica) e *tcp* (gene relacionado a fatores de colonização: toxina co-regulada por *pillus*), OmpU e mais outros 20 genes adicionais com função desconhecida e dispersos no cromossomo, presente em cepas virulentas de *V. cholerae*, conforme apresentado na FIGURA 2 (MILLER e MEKALANOS 1984; COTTER e MILLER 1998).

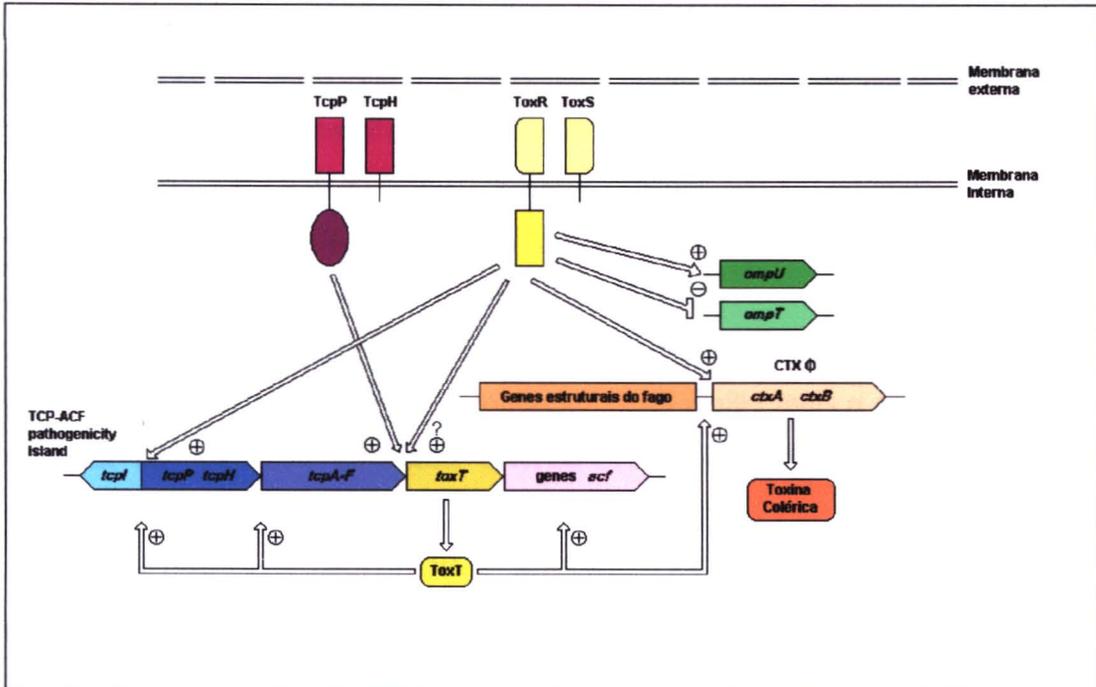


FIGURA 2 – Esquema demonstrativo da hierarquia seqüencial da regulação bioquímica e genética do Regulon ToxR, segundo COOTER e MILLER (1998).

Análises genéticas e bioquímicas que posteriormente foram realizadas permitiram elucidação quanto à hierarquia regulatória deste conjunto de genes, exibido na figura 2, sendo chamado “regulon ToxR/ToxS de *V. cholerae*”.

Este regulon é formado por dois operons co-regulados, *ctxAB* e *tcp*, ambos modulados pelas proteínas ToxR, ToxS e ToxT, que funcionam como reguladores e não como repressores. Estas proteínas são sensíveis e respondem a certos sinais ambientais como temperatura, pH, osmolaridade. Cada uma delas tem um papel nesta resposta aos estímulos: ToxR, proteína transmembrana mais sensível às alterações ambientais; ToxS, localização periplasmática, auxiliando a formação do dímero toxR; ToxT, localização citoplasmática, sendo ativada por ToxR, que por sua vez ativa *tcp*.

A região chamada “pathogenicity island” é também conhecida como “cassete de virulência”. Foi descrita pela primeira vez em *E. coli*, como um segmento genético longo e instável associado à virulência, variando de 1,6 kb em *Salmonella typhi* a 35-190 kb em *E. coli* uropatogênica e *V. cholerae*. Estudos subseqüentes demonstraram que estes cassetes de virulência por serem móveis são derivados, possivelmente, da transmissão horizontal (ANDREONI 1999).

Em *V. cholerae* as toxinas Zot (zona occludens toxin) e Ace (accessory cholera enterotoxin), e, destacadamente, a toxina colérica (CT) têm papel fundamental na patogênese da cólera. Esta última é codificada pelo operon *ctxAB*, sendo uma toxina dimérica, onde A é a porção com atividade enzimática e B é o domínio responsável pela ligação da toxina ao receptor (MEKALANOS et al. 1983).

Estudos comparativos entre cepas toxigênicas e não-toxigênicas de *V. cholerae* revelaram a presença, nas primeiras, de uma região de aproximadamente 6 kb na posição 5' do operon de função desconhecida. Esta região mais o operon *ctxAB* foi chamada de “elemento da toxina colérica” (CTXphi) (WALDOR et al. 1997; COOTER e MILLER 1998; HEIDELBERG et al. 2000).

Há alguns anos, WALDOR e MEKALANOS (1996) descobriram que o chamado “elemento da toxina colérica” corresponde, na verdade, ao genoma de um fago filamentosso integrado, relacionado ao fago M13 de *Escherichia coli* o qual é encontrado tanto no biótipo El Tor O1 como no O139 (DAVIS et al. 2000).

Estes achados sugerem que a estrutura hierárquica de regulação do regulon ToxR reflete a aquisição horizontal de elementos genéticos determinantes para a patogênese em humanos, uma vez que é proposto que as proteínas ToxR/ToxS originalmente estiveram envolvidas em controle da síntese de proteínas da membrana externa. Esta hipótese encontra respaldo no fato de que proteínas homólogas a ToxR/ToxS estão presentes em cepas de *V. cholerae* não-toxigênicas que não expressam TCP. Estas proteínas homólogas também são encontradas em bactérias não patogênicas para humanos, como, *V. fischeri* e *Photobacterium sp* (WALDOR e MEKALANOS 1996; COOTER e MILLER 1998).

O reconhecimento da possibilidade de transferência horizontal de genes remete a possibilidade de conversão de cepas não-patogênicas em cepas patogênicas responsáveis por diversas doenças em humanos, caracterizando a possibilidade constante da emergência de patógenos (COOTER e MILLER 1998; HEIDELBERG et al. 2000).

Como já foi dito, estes genes são fortemente influenciados por condições ambientais. A cascata do sinal de transdução (ToxR/ToxS/ToxT) é responsável pela captura da informação ambiental e pelo controle do regulon, tornando-se fácil entender porque a bactéria inicia a produção da toxina colérica: o intestino delgado

humano possui temperatura de 37°C, baixo pH e alta osmolaridade, em oposição ao ambiente aquático tropical com temperatura de mais ou menos 25°C e baixa osmolaridade. Logo, este sistema regulatório ToxR/ToxS/ToxT deve conferir alguma vantagem ainda não conhecida à bactéria dentro do ambiente marinho (COOTER e MILLER 1998; ZHU et al. 2002; PETERSON 2002).

Tanto o gene *zot* como o gene *ace* são encontrados no operon CTX. Enquanto a toxina Ace é uma enterotoxina acessória da cólera, a proteína Zot é, por sua vez, capaz de causar rearranjos de actina nas junções intercelulares dos enterócitos, aumentando a permeabilidade da mucosa intestinal, contribuindo para a diarreia observada na cólera (FASANO et al. 1991).

Outros genes codificadores de outras toxinas também são conhecidos, como aqueles relacionados a hemolisinas, proteases e lipases. O gene da hemolisina (*hly*) codifica uma proteína com atividade enterotóxica, e em oposição a outros fatores de virulência está localizado no cromossomo menor de *V. cholerae* (HEIDELBERG et al. 2000).

### **1.8 Uso de técnicas moleculares no estudo de vibrios:**

Técnicas de Microbiologia têm auxiliado os estudos no sentido de identificar a presença dos vibrios potencialmente patogênicos em alimentos. Estas técnicas são baseadas em características fenotípicas, e graças a elas é que foram possíveis os primeiros estudos taxonômicos de bactérias.

Além dos estudos com metodologias tradicionais da Microbiologia, a identificação e detecção de vírus e microrganismos patogênicos têm sido incrementadas nos últimos anos graças aos avanços das técnicas moleculares. As metodologias tradicionais revelavam apenas uma pequena fração da informação genética contida nos ácidos nucleicos dos microrganismos (SILVEIRA et al. 2000).

As técnicas moleculares possibilitaram a aplicação de novas metodologias para identificação e caracterização de microrganismos e, com isso, tornaram-se ferramentas essenciais em experimentos biológicos, com diversas aplicações sejam elas clínicas, ecológicas, taxonômicas ou epidemiológicas.

Em especial, os estudos taxonômicos têm como pressuposto o fato que o material genético de um organismo uni ou pluricelular, é resultante dos processos

evolucionários de mutação e seleção natural e, por isso, devem refletir sua filogenia. Dessa forma, os ácidos nucléicos e até as proteínas podem servir como “fósseis moleculares” para estudos comparativos, orientando as conclusões sobre os relacionamentos filogenéticos intraespecíficos (SILVEIRA et al. 2000). Assim, sondas genéticas de DNA vêm sendo empregadas com sucesso de forma crescente em estudos laboratoriais, epidemiológicos e clínicos (MATTÉ 1996).

O princípio fundamental das técnicas, baseadas em tecnologia de sondas de DNA, é a hibridização, baseada na homologia das bases, envolvendo a desnaturação do DNA dupla fita e a detecção de regiões homólogas complementares. Este princípio é muito utilizado em estudos envolvendo taxonomia e filogenia de microrganismos (KONEMAN et al. 2001).

Outros estudos estão baseados nas variações de seqüência e tamanho que a molécula de DNA pode ter: os chamados polimorfismos. Estes métodos genotípicos, baseados na estrutura molecular, podem ser utilizados tanto para análise do DNA como do RNA.

O polimorfismo do DNA total ou de regiões selecionadas do genoma constitui uma alternativa segura na diferenciação entre indivíduos de uma mesma espécie (PENNA e JEFFREYS 1993). Por exemplo, possibilita a identificação, dentro da mesma espécie, de um microrganismo entre vários semelhantes ou de linhagens novas, constituindo-se, por isso, importante instrumento da Epidemiologia Molecular.

As espécies bacterianas são definidas como cepas que mostraram uma homologia acima de 70% entre seus DNA e 5% ou menos de divergência em suas seqüências nucleotídicas. Algumas espécies bacterianas apresentam homologia acima de 70% e, ainda assim, podem ser consideradas espécies distintas em função do seu comportamento clínico. As espécies *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* são virtualmente idênticas quando analisadas por diversas metodologias, inclusive por hibridização de ácidos nucléicos. No entanto, causam doenças diferentes em humanos, como a gonorréia e a meningite cerebrospinal, respectivamente (KONEMAN et al. 2001).

Entre as várias técnicas moleculares, que permitem investigações de polimorfismos, inclui-se a eletroforese de campo pulsado em gel (PFGE). Consiste

no uso de enzimas de restrição que reconhecem sítios de restrição “infreqüentes” no DNA. A molécula tratada com as enzimas é, então, submetida a uma eletroforese especial na qual mudanças periódicas, na direção do campo elétrico, a intervalos de tempo fixados, permitem a separação de grandes moléculas DNA (>50kb). Algumas aplicações com sucesso para demonstração do polimorfismo e mapeamento cromossômico de patógenos foram realizados utilizando tripanossomatídeos, giárdia e plasmódios como modelos.

Desde 1996 os protocolos de PFGE para *V. parahaemolyticus* foram publicados (LU et al. 2000). Associada a outras técnicas moleculares, foi possível o desenvolvimento de métodos para diferenciação e tipagem, com êxito, destes organismos (MARSHALL et al. 1999). Esta técnica também foi utilizada com sucesso para estudos com diversidade de *Vibrio tapetis* (CASTRO et al. 1997), *Vibrio vulnificus* (RYANG et al. 1999) e *Vibrio cholerae* (MAHALINGAN et al. 1994; KURASONO et al. 1994; SINGH et al. 2001).

Outra técnica molecular, considerada como ferramenta ideal para pesquisa de fatores de virulência, é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Esta técnica foi idealizada em 1980 e descrita em 1987, por MULLIS e FALOONA a qual é realizada usando aparelho computadorizado que funciona como um “suporte quente” denominado termociclador. Consiste na amplificação de seqüências específicas do DNA a partir de amostras do cromossomo e/ou cDNA, sem necessidade de clonagem molecular. É uma reação em cadeia, pois as novas cópias de DNA formadas servirão de molde para outras cópias nas sínteses sucessivas de DNA. Após 30-40 ciclos de síntese de DNA, o produto da PCR incluirá o DNA inicial e  $10^5$  cópias da seqüência amplificada desejada, que poderá ser visualizada após separação em eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio e iluminado com luz UV (ALBERTS et al. 1997).

Esta técnica é caracterizada pela facilidade de sua execução, rapidez, baixo custo relativo, versatilidade e sensibilidade, podendo ser utilizada para estudos genético moleculares envolvendo grande número de indivíduos, mas não substitui as demais metodologias empregadas, inclusive aquelas tradicionais da Microbiologia (FERREIRA e GRATAPAGLIA 1996; SILVEIRA et al. 2000).

Protocolos para detecção de espécies de *Vibrio*, utilizando PCR, têm sido publicados, demonstrando a sensibilidade e a eficiência da técnica (KAPLEY e PUROHIT 2001). Outros estudos que fortaleceram mais o uso da técnica para víbrios envolveram a caracterização molecular para genes relacionados à virulência de variantes de *V. cholerae* (MITRA et al. 2001; ZANETTI et al. 2001).

Em 1999 CHUN et al. desenvolveram iniciadores (primers) baseados em regiões altamente conservadas de espaços intergênicos localizadas entre o 16S e 23S rDNA de *V. cholerae*. Testes moleculares utilizando produto da PCR e estes iniciadores permitem a identificação de *V. cholerae* isolado diretamente do ambiente, excluindo as etapas de enriquecimento e realização de provas bioquímicas (RUBIN 2000). Assim, esta ferramenta se constitui num avanço muito grande para identificação da presença destas bactérias tanto em amostras clínicas como ambientais, além da extrema sensibilidade.

Mesmo com a eficiência comprovada pela técnica PCR na produção de grandes quantidades de segmentos específicos de DNA, esta apresenta limitações na detecção de marcadores “anônimos” distribuídos pelo genoma em estudo. Por isso, surgiram as adaptações de seus protocolos para permitir maior eficácia do teste (FERREIRA e GRATTAPAGLIA 1996).

Várias adaptações da técnica PCR têm sido descritas, como a PCR Multiplex, a qual consiste na utilização de múltiplos pares de *primers* (iniciadores) para diferentes regiões moleculares, incluídos no mesmo sistema de reação, amplificando simultaneamente seqüências-alvo diferentes. Evidências experimentais demonstraram que este procedimento era eficaz para detectar genes de virulência em *V. cholerae* (RIVERA et al. 2001).

Outra adaptação com sucesso da técnica PCR foi obtida após identificação das seqüências ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e IRU (Intergenic Repetitive Unit) no genoma bacteriano. Atualmente, ambas seqüências são tidas como sinônimas para seqüências repetitivas altamente conservadas de 126-128 pb, localizadas em regiões transcritas mas não traduzidas. Sua função não é clara e sua localização varia de espécie para espécie, podendo também ser encontrada variações intraespecíficas (HULTON et al. 1991).

Estas seqüências formam estruturas em laço e até então já foram identificadas em patógenos importantes como *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi* e *V. cholerae*. As seqüências ERIC identificadas em *V. cholerae* estão localizadas próximas ao gene que codifica hemolisina, formando um nó com este gene (HULTON et al.1991).

A técnica ERIC-PCR pode ser utilizada para análise de similaridade genética, permitindo conhecer a variabilidade genética da população em estudo, prestando-se, portanto, para estudos epidemiológicos e de tipagem molecular (BARROS 2000). Exemplificando, SHANGKUAN et al. (2001) investigaram a caracterização molecular de *Bacillus anthracis* utilizando uma combinação de ERIC-PCR e RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente), onde foi possível a diferenciação de cepas virulentas daquelas avirulentas. Outro estudo similar conduzido por RAFIEE et al. (2000) demonstrou que ERIC-PCR era uma técnica adequada para diferenciação de subtipos de *Haemophilus parasuis*.

Estudos conduzidos por RIVERA, em 1995, demonstraram ser possível a caracterização genotípica através da técnica ERIC-PCR de cepas toxigênicas de *V. cholerae* O1 e O139, cepas não-toxigênicas de *V. cholerae* O1 e cepas de *V. cholerae* não O1 e não-O139. Os resultados destes estudos indicaram padrões de “impressão digital” (fingerprinting) idênticos em cepas toxigênicas de *V. cholerae* O1 e O139 e padrões diferentes para *V. cholerae* O1 não-toxigênicos e sorogrupos não-O1/não-139. Adicionalmente, também foi observada a presença de um fragmento comum de 0,5 kb em todos os perfis exibidos pelas cepas de *V. cholerae* estudadas, não conhecido até então.

Até o presente, as normas atuais de Vigilância no Brasil não consideram as características genotípicas como parâmetro a ser monitorado em patógenos. No entanto, um crescente conjunto de técnicas de Biologia Molecular está se tornando rotina em Laboratórios de Saúde Pública em todo o mundo, e o próximo desafio será consolidar estas técnicas para controle e monitoramento de patógenos incorporando-as definitivamente à Vigilância Sanitária.

Programas de vigilância que permitam alertar as autoridades de Saúde Pública sobre a presença de vibrios potencialmente patogênicos precisam ser rapidamente implementados, especialmente em áreas de risco.

Estudos ecológicos e epidemiológicos demonstram que a biodiversidade de bactérias pode ser estudada em vários níveis desde a biosfera até os genes. Assim, a estimativa da variabilidade gênica das espécies é importante, porque permite, por exemplo, avaliar impactos sobre populações. Neste aspecto, torna-se importante o estudo da variabilidade gênica como referencial para indicar possíveis migrações de patógenos, seus limites geográficos e taxonômicos, bem como suas relações filogenéticas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS, entre as doenças de maior incidência estão as infecções intestinais provocadas pelo consumo de pescados contaminados, em especial, moluscos bivalves. Várias bactérias do gênero *Vibrio*, são agentes etiológicos de doenças em humanos que vão desde gastroenterites brandas até a cólera, as quais são veiculadas pela água, e também pelo consumo de vegetais, pescados e mariscos crus, mal cozidos ou preparados/cultivados em condições precárias de higiene. Logo, a manipulação e a conservação inadequada de alimentos de origem marinha são grandes fatores de riscos à saúde humana. Assim, diante da relevância e atualidade do tema, e ainda:

- Considerando que as doenças causadas por víbrios são um grave problema de Saúde Pública;
- Considerando que a área de influência da BTS e de Valença estão relacionadas tanto a intensa mariscagem como comércio varejista de moluscos bivalves, especialmente, aqueles processados artesanalmente;
- Considerando a escassez de pessoal treinado tanto no processamento como no comércio varejista, além da indisponibilidade dos recursos necessários para conservação dos moluscos bivalves, tais como meio de transporte, água de boa qualidade, sal e gelo;
- Considerando que há poucos estudos envolvendo Microbiologia da BTS e, em especial, sobre a ocorrência de víbrios, seja na água ou em pescados;
- Considerando que os moluscos infectados ou envenenados não podem ser identificados por alterações na aparência, textura, odor ou gosto, dificultando o controle de qualidade dos mesmos e que apenas os procedimentos laboratoriais podem diagnosticar com precisão a qualidade dos mariscos, ou seja, quando não há alterações macroscópicas identificáveis, especialmente quando há contaminação bacteriana;

Assim, este estudo foi proposto com os objetivos indicados a seguir.

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1 Objetivo Geral:

Descrever a ocorrência de *Vibrio spp*, potencialmente patogênicos em zooplâncton e moluscos bivalves, processados artesanalmente ou não, e comercializados no varejo nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e de Valença, Bahia - Brasil, durante o período de agosto de 2000 a fevereiro de 2002, caracterizando as cepas isoladas através de métodos moleculares.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

1. Identificar *Vibrio spp*, potencialmente patogênicos, a partir de zooplâncton e moluscos bivalves comercializados nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia, Brasil;
2. Caracterizar os fatores genéticos *hlyA*, *tcpA*, *toxR*, *zot*, *ompU*, *ctxA* e *tcpI* associados a virulência de *V. cholerae* através da técnica PCR;
3. Caracterizar genotipicamente, através da técnica ERIC-PCR, os *Vibrio spp* potencialmente patogênicos;
4. Descrever a diversidade dos víbrios potencialmente patogênicos isolados com base nos perfis genômicos, obtidos a partir da técnica ERIC-PCR, visando observar a diversidade existente nas espécies estudadas.

## 4. METODOLOGIA:

### 4.1 Seleção da Área de Estudo

As localidades selecionadas para o estudo foram Valença (incluindo Guaibim) e municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos (Jaguaripe, Nazaré, Aratuípe, Muniz Ferreira, Dom Macedo, Santo Antônio de Jesus, Salinas da Margarida, Maragogipe, São Felipe, Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Muritiba, São Félix, Cachoeira, Governador Mangabeira, Conceição da Feira, São Gonçalo dos Campos, Feira de Santana, São Francisco do Conde, Santo Amaro da Purificação, Saubara, Ilha de Itaparica, Candeias, Madre Deus, Camaçari, Simões Filho, Salvador, Lauro de Freitas) (FIGURA 3).

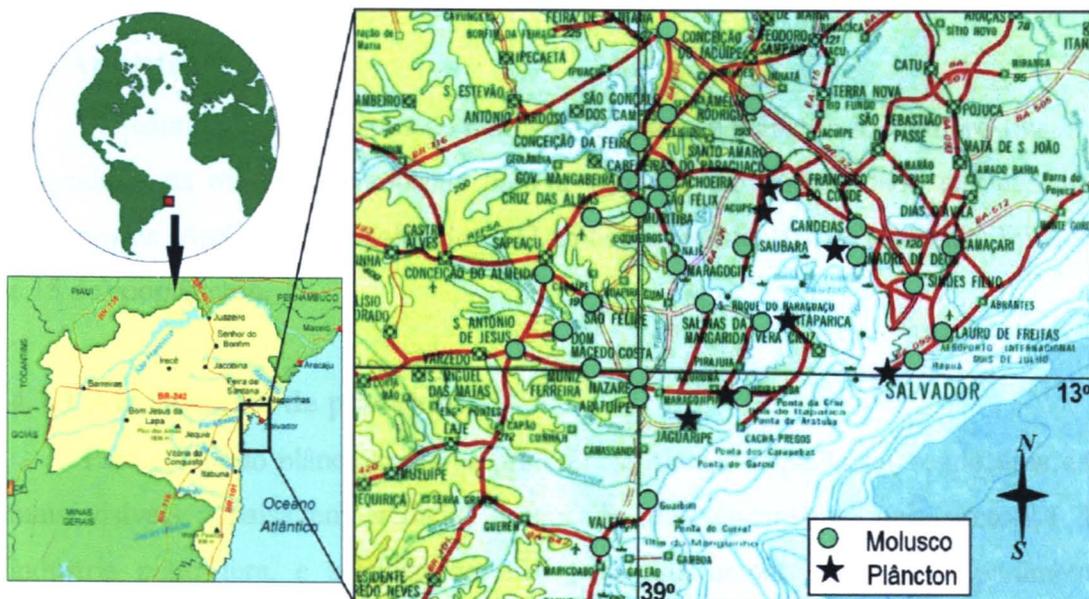


FIGURA 3 – Mapa demonstrativo da região, exibindo os municípios e locais, onde foram realizadas as coletas, abrangendo a área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

Parte da região estudada foi chamada genericamente de “área de influência da Baía de Todos os Santos” por compreender municípios que se localizam no raio de mais ou menos de 50 km de suas águas e por terem características socioculturais semelhantes e comércio de moluscos bivalves provenientes de seus manguezais/praias.

## **4.2 Delimitação do tempo de estudo e periodicidade das coletas:**

Este estudo foi realizado no período de agosto de 2000 a fevereiro de 2002 no Estado da Bahia. Quanto à periodicidade, como constatou-se que na maioria dos municípios estudados as feiras-livres e o funcionamento dos mercados públicos aconteciam aos sábados, as excursões, em sua maioria, foram programadas de oito em oito dias, isto é, sempre aos sábados, sendo os trajetos para a coleta otimizados em função do tempo disponível, da distância entre os locais a serem visitados e o Laboratório de apoio (Laboratório de Genética de Microrganismos – LAGEM – Departamento de Ciências Biológicas da UEFS), onde as amostras eram parcialmente processadas para envio a São Paulo.

## **4.3 Amostragem:**

A quantidade de amostras de moluscos bivalves e plâncton não foi pré-fixada e dependeria da oferta de moluscos para a venda e da variabilidade das espécies encontradas. Assim, foram coletadas 122 amostras, sendo 107 de moluscos bivalves e 15 de zooplâncton.

### **4.3.1 Amostragem de plâncton:**

Para coleta do plâncton deu-se preferência a áreas impactadas, sendo uma das mais visíveis a paisagem artificial provocada, destacadamente, pela presença da indústria petrolífera, e urbanização. Foi feita esta amostragem como parâmetro complementar utilizando água do mar coletada em regiões próximas a localidades que não possuem feira-livre, ou áreas impactadas, para verificação da presença de bactérias do gênero *Vibrio* nas águas próximas às áreas produtivas de moluscos bivalves. Por motivos de limitação de tempo e técnica, estas coletas restringiram-se apenas à área de influência da BTS não tendo sido colhidas amostras em Valença.

Observou-se, no entanto, em alguns pontos, áreas remanescentes do ecossistema manguezal que resistem a estas influências e que ainda sobrevivem, representadas, pela vegetação e fauna típicas, especialmente moluscos bivalves.

Algumas destas áreas, mesmo com a devastação do mangue nativo, ainda são muito produtivas e se constituem em locais de coleta de moluscos pela população humana.

Assim, áreas de obtenção de amostras de plâncton, na BTS, foram escolhidas em função ambientes próximos ou relacionados com a mariscagem, manguezais ou remanescentes; ambientes com histórico de contaminação ambiental (industrial e sanitária) sob estresse crônico fosse ele natural ou induzido pelo homem.

#### 4.3.1.1 Fisionomia dos locais de coleta de plâncton:

As áreas de realização de coletas de zooplâncton (FIGURA 4; ANEXO 2) eram próximas a manguezais, apresentando intensa influência antrópica causada pelo desmatamento (FIGURA 4a), industrialização (FIGURA 4b), monocultura da cana-de-açúcar, urbanização, lançamentos de esgotos e lixo (FIGURA 4c), entre outros. A ocupação humana na área data da época do descobrimento do Brasil, exaustivamente descrita pela História e facilmente identificável pela arquitetura dos prédios e igrejas, com construções típicas da época colonial (FIGURA 4d), tornando a paisagem mais ou menos uniforme, em termos de urbanização, ao longo de toda região estudada.



a – Desmatamento em manguezal



b – Industrialização petrolífera



c – Lançamentos de esgoto da área de maricultura



d – Urbanização desde a época colonial

FIGURA 4 – Fisionomia dos locais onde foi coletado o zooplâncton utilizado neste estudo. As fotografias evidenciam quatro pontos sob efeito antrópico na BTS, Bahia, Brasil, 2000-2002.

#### 4.3.1.2 Coleta e preparo das amostras de plâncton:

A rede de captura de plâncton (rede cônico-cilíndrico de 64 micra de porosidade) era submersa a 50-100cm de profundidade, em águas rasas, diversas vezes seguidas e de forma ininterrupta na corrente de água, durante o período de 15 minutos, no mesmo ponto, através de vários arrastos superficiais (FIGURA 5).

Após este tempo, o material em suspensão, recolhido pela rede e retido no “sifão”, era transferido para recipientes estéreis, mantido à temperatura ambiente e levado para o Laboratório para processamento.



FIGURA 5 – Rede de coleta de plâncton utilizada neste estudo. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2000-2002.

#### 4.3.2 Amostragem de moluscos bivalves:

Nas localidades, selecionadas para coleta de moluscos bivalves, foram visitadas preferencialmente as feiras-livres, mercados públicos seguindo-se as peixarias e os supermercados (ANEXOS 3 a 10).

Foram adquiridos, aleatoriamente, mediante compra moluscos bivalves comestíveis sob forma *in natura* (vivos) e desconchados, disponíveis para comercialização, que não sofreram processamento ou beneficiamento industrial, comercializados em pontos de venda no varejo (tais como feiras-livres,

supermercados, ambulantes e peixarias) dos municípios da área de influência da BTS e Valença.

Os moluscos bivalves estudados foram descritos e analisados para determinação da espécie, usando as chaves de classificação de BOFFI (1979) e RIOS (1994), e caracterizados biologicamente segundo RIOS (1994) e RUPPERT e BARNES (1996).

Durante as coletas, foi solicitada aos vendedores/marisqueiras apenas informação pertinente à amostra (nome comum, preço, local de origem, data de coleta ou processamento). Todas as informações relevantes para o estudo prestadas foram registradas de forma escrita.

As fotografias de aspectos típicos da comercialização, cultura e prática da coleta dos moluscos bivalves, nas quais aparecem humanos em destaque, também foram feitas com permissão dos indivíduos envolvidos, sendo utilizados recursos de computação nas imagens para preservar a identidade das pessoas e dos estabelecimentos comerciais. Estas foram incluídas, neste estudo, apenas como forma de esclarecer situações relevantes e melhor documentar a realidade.

Nas peixarias e estabelecimentos comerciais de venda de peixes e mariscos, sempre foi solicitada permissão ao balconista/proprietário para observação das condições de estocagem. Já nas feiras-livres e mercados públicos, devido à exposição a céu aberto da mercadoria, estas observações eram imediatas, sem maiores impedimentos.

#### **4.3.2.1 Coleta e preparo das amostras de moluscos bivalves:**

As amostras de moluscos bivalves *in natura* ou desconchados foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos, com identificação de nome dado ao animal pelo vendedor ou marisqueira, bem como o local de compra e local de origem. Estas foram colocadas em caixa de isopor com gelo e processadas no mesmo dia da coleta.

Para os moluscos bivalves na concha, obedecia-se a uma rotina: escolhia-se aqueles com valvas fechadas (indicativo de que estavam vivos), lavavam-se ambas superfícies externas das conchas em água corrente com escova, enxaguando-se em seguida com água destilada (APHA 2001).

A abertura era feita pela parte posterior da concha, no ponto de articulação (charneira) entre as valvas, utilizando-se faca pontiaguda, previamente flambada, e, em seguida seccionava-se o músculo abdutor. Os tecidos moles e o líquido intervalvar eram recolhidos em recipientes estéreis e cerca de 100g era transferido para liquidificador comum, com copos previamente esterilizados, para trituração por 2 minutos.

O preparado era feito a partir das amostras de moluscos bivalves desconchados à temperatura ambiente, resfriado e congelado.

Para aqueles congelados, esperava-se o degelo total da amostra, colocando-a em béquer estéril por cerca de 2h. Após este tempo, o procedimento era igual ao citado acima: 100g de amostra era transferido para liquidificador comum, com copos previamente esterilizados, para trituração por 2 minutos.

#### **4.4 Enriquecimento:**

O material em suspensão, recolhido pela rede de arrasto (aproximadamente 25ml), era transferido, em condições estéreis, para 225ml de água peptonada alcalina 1% de NaCl, pH 8,6 e incubado a 35°C por 24h (ANEXO 11).

Para os moluscos bivalves o processo era similar: do homogenato resultante da trituração, 25 g de amostra eram retiradas e inoculadas em 225 ml de água peptonada alcalina 1% de NaCl, pH 8,6, correspondendo à diluição de 1:10 ( $10^{-1}$ ). A incubação era feita por 24h a 35°C (ANEXO 11).

#### **4.5 Transferência para meio seletivo:**

Após o período de incubação, o isolamento foi feito recolhendo-se com alça bacteriológica a película formada, na superfície do meio de cultura, tanto para as amostras provenientes do plâncton quanto dos moluscos bivalves triturados, seguindo-se a passagem por sementeira, via esgotamento, para o meio de ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS), na proporção 10 placas/amostra, sendo em seguida incubadas por 24h a 35°C (ANEXO 11).

Foi observado que nas placas, contendo TCBS, semeadas com material proveniente das culturas de plâncton ou de moluscos bivalves, após incubação a 35°C por 24h, apareciam diversas colônias exibindo cores e formas diferentes. As colônias

fermentadoras de sacarose (amarelas) e não-fermentadoras de sacarose (verde ou verde-azulada), de 2 a 3 mm de diâmetro, sem pontos pretos, foram as selecionadas para prosseguimento da pesquisa. Os isolados, com essa característica, foram semeados em meio de ágar ferro Kliegler (meio Kliegler – ANEXO 11), em tubo inclinado, em cultura submersa, finalizados por espalhamento na superfície do meio. Foram retiradas no máximo 10 colônias por placa.

Estes tubos foram vedados com algodão, cuja extremidade mantinha contato com o interior do tubo e estava umedecido em reativo de Erlich (teste de indofenoloxidase) (ANEXO 12) (KONEMAN et al. 1983).

As colônias que apresentavam características presuntivas de *Vibrio spp*, neste meio de cultura, após 24 horas de incubação a 35°C, produziam fermentação da glicose com o meio, passando de rosado para amarelo, mantendo a superfície do mesmo na cor rosa “pink” (FIGURA 6), uma vez que estas culturas não utilizam lactose. Ainda, nestes tubos, observavam-se, como critério de exclusão, produção de H<sub>2</sub>S (visualizada pelo aparecimento de depósito preto no fundo do tubo) e bolhas de gás no meio de cultura.

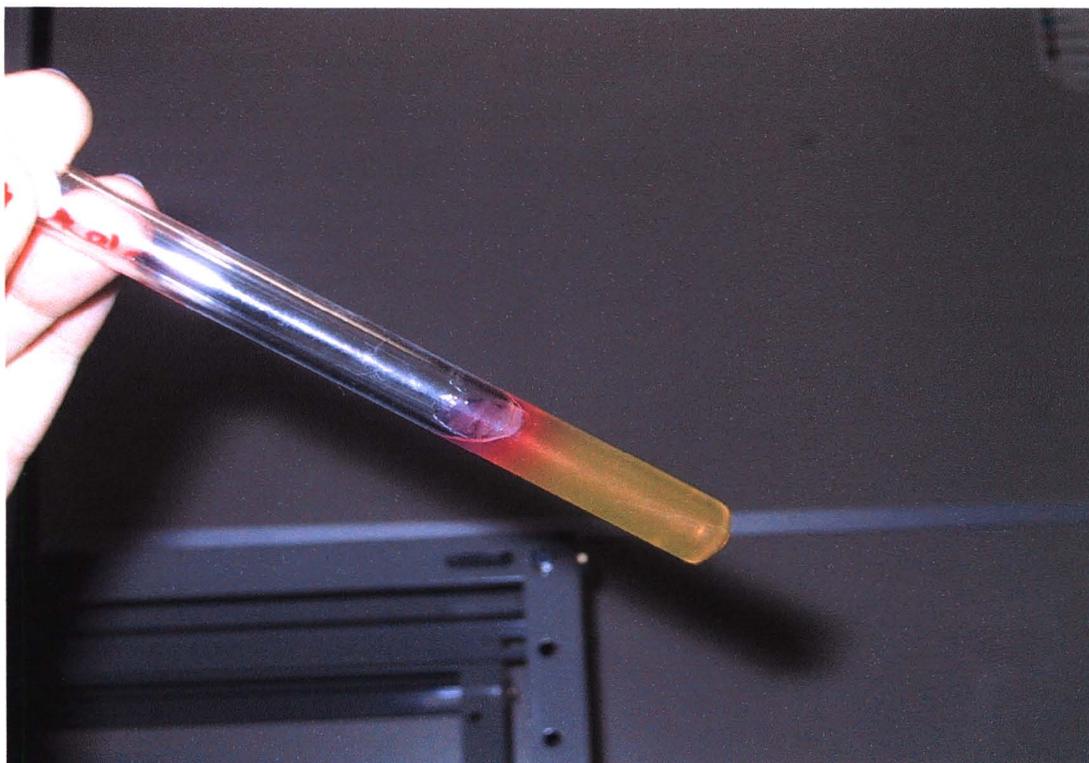


FIGURA 6 – Aparência do meio Kliegler após crescimento de bactérias presuntivas de pertencerem ao gênero *Vibrio*, obtidas a partir de moluscos bivalves comercializados na BTS e em Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

Foi observado, também, se a extremidade do algodão, umedecido no reagente de Erlich (ANEXO 12), passava à cor rosa (positivo), obtendo-se, assim, mais uma prova na identificação.

#### **4.6 Teste da presença da enzima citocromo oxidase:**

Adicionalmente, também era feito, a partir das colônias presuntivas, existentes nos tubos contendo meio Kliegler, o teste envolvendo o reativo de oxidase dicloridrato de tetrametil p-fenilenodiamino 0,5% (ANEXO 13), para detecção da enzima citocromo oxidase (KONEMAN et al. 1983).

Utilizando papel de filtro, este era colocado dentro de uma placa de Petri onde era umedecido com reativo de oxidase (dicloridrato de tetrametil p-fenilenodiamino 0,5%). O papel era deixado para secar à temperatura ambiente. Após secagem, uma colônia de bactéria a ser testada era tocada com palito de madeira estéril (ou alça de platina), e a massa celular obtida era esfregada no papel para produzir pequeno risco. As colônias citocromo oxidase positivas produziam um risco de coloração roxa (em até 10 segundos); naquelas negativas, não havia mudança na coloração. As mudanças de coloração, nestas últimas, após 1 minuto da realização do teste, não eram consideradas, e, conseqüentemente, estas cepas eram desprezadas.

A FIGURA 7 apresenta um resumo esquemático dos procedimentos utilizados na pesquisa de *Vibrio spp.*

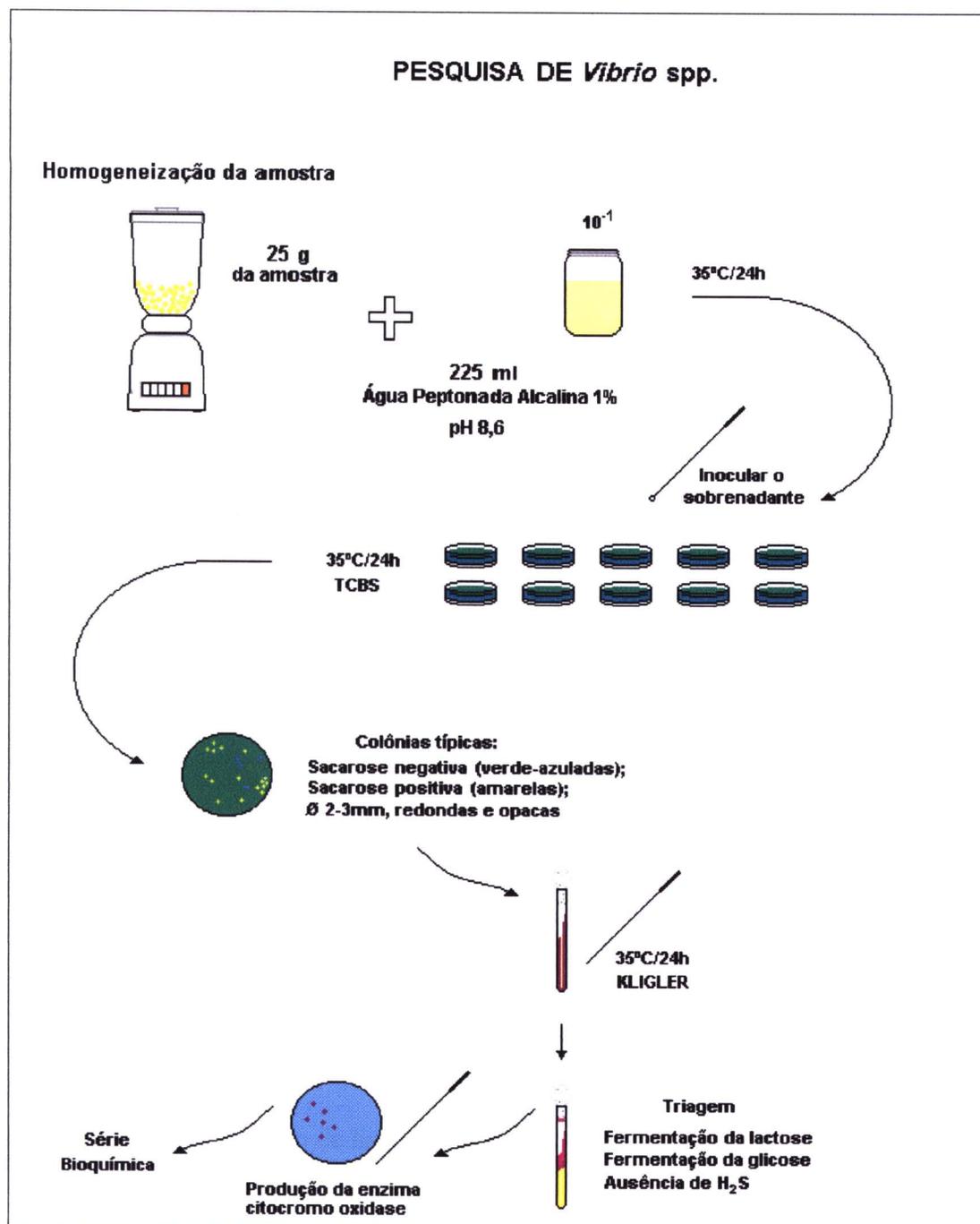


FIGURA 7 – Resumo esquemático sobre a metodologia utilizada para isolamento de *Vibrio* spp.

#### 4.7 Conservação das amostras

As cepas bacterianas isoladas presuntivas de pertencerem ao gênero *Vibrio* foram semeadas em microtubos de 1,5ml (tipo eppendorf), contendo meio ágar Luria-Bertoni (0,5% de ágar) conhecido como “soft ágar” (ASTOLFI FILHO,

comunicação pessoal – ANEXO 11) e enviadas para o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LSP) da Faculdade de Saúde Pública (FSP) da Universidade de São Paulo (USP), onde eram reisoladas.

Após o reisolamento, as cepas de vîbrios obtidas foram submetidas a estudos bacteriológicos, sorológicos (apenas para *V. cholerae*) e bioquímicos para identificação das espécies e avaliação de aspectos moleculares relativos à similaridade genética e presença de genes de virulência (apenas para *V. cholerae*).

#### **4.8 Provas Bioquímicas:**

A identificação por métodos bioquímicos das espécies foi feita no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública (FSP) da USP.

As provas bioquímicas foram realizadas com as colônias presuntivas de pertencerem ao gênero *Vibrio* para identificação das espécies, utilizando 20 provas, em microplaca múltipla de 96 orifícios adaptada (RUBIN 2000; MATTE GR, comunicação pessoal).

As provas bioquímicas utilizadas consistiam na identificação de:

- produção de nitrato
- crescimento em peptona sem ou com NaCl em diferentes concentrações (0%, 6%, 8% e 10%)
- fermentação de manitol, inositol, arabinose, lactose, salicina, sacarose e manose
- descarboxilação de lisina e ornitina
- dehidrólise de arginina
- hidrólise da esculina

Em condições assépticas, utilizando a pipeta multi-canais, os respectivos meios para realização de cada prova bioquímica foram colocados em microplaca. A partir de colônias obtidas em tubos contendo meio L ágar, acrescido de 3% NaCl, crescidos 24h/35°C, foram retiradas utilizando-se palitos estéreis, e o raspado obtido foi colocado em poços de microplaca contendo solução salina estéril. Com sistema de múltiplas agulhas de inoculação flambadas, as células diluídas, em solução salina,

foram transferidas para os meios-testes. Após serem semeadas, estas placas foram vedadas com tampa e incubadas a 35°C/18h, onde, findo este tempo eram analisadas. Os poços, contendo material teste para esculina, foram retirados da incubadora bacteriológica somente 48h depois de inoculados, para análise do resultado.

A composição química dos meios e reagentes empregados nas provas bioquímicas estão descritos no ANEXO 13.

#### 4.8.1 Identificação das espécies de víbrio:

A TABELA 1 apresenta critérios comparativos de resultados de provas bioquímicas para identificação de espécies de *Vibrio*, segundo KONEMAN et al. (2001) e ELLIOT et al. (1998).

TABELA 1 – Principais características das espécies de víbrios patogênicos e possivelmente patogênicos para o homem utilizadas neste estudo para classificação das amostras, segundo critérios bioquímicos.

Teste bioquímico	<i>V.</i>	<i>V.</i>	<i>V.</i>	<i>V.</i>	<i>V.</i>	<i>V.</i>
	<i>cholerae</i>	<i>parahaemolyticus</i>	<i>vulnificus</i>	<i>alginolyticus</i>	<i>fluvialis</i>	<i>mimicus</i>
Cor da colônia crescida em TCBS	amarela	Verde	verde	Amarela	Amarela	verde
Oxidase	+	+	+	+	+	+
O/F glicose	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F
Teste de indol	+	+	+	[+]	[-]	+
Fermentação da sacarose	+	-	[-]	+	+	+
Ferm. Manitol	+	+	d	+	+	+
Ferm. Lactose	-	-	[+]	-	-	[-]
Ferm. L-arabinose	-	[+]	-	-	+	-
Arginina deidrolase	-	-	-	-	+	-
Lisina descarboxilase	+	+	+	+	-	+
Ornitina descarboxilase	+	+	d	d	-	+
Cresc. NaCl 0%	+	-	-	-	-	-
Cresc. NaCl 6%	d	+	d	+	+	d
Cresc. NaCl 8%	-	[+]	-	+	d	-
Cresc. NaCl 10%	-	-	-	+	-	-

O = oxidativo; F = fermentativo; d = 11 a 89% das cepas são positivas; [+] = 76 a 89% das cepas são positivas; [-] = 11 a 25 % das cepas são positivas.

Na identificação das espécies, as provas bioquímicas consideradas mais importantes foram as reações: oxidase, produção de nitrato, fermentação de sacarose, produção de H<sub>2</sub>S, indol, fermentação de glicose, descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrólise de arginina, e crescimento em peptona com NaCl em diferentes concentrações (0%, 6%, 8% e 10%). As outras reações não foram consideradas critério seletivo para espécie.

#### **4.9 Sorologia para *Vibrio cholerae* O1:**

Para as espécies confirmadas bioquimicamente como *V. cholerae*, foi realizada a sorologia pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Zanoli Sato, Departamento de Análises Ambientais, CETESB/SP.

#### **4.10 Teste de crescimento em meio mínimo e com fonte única de carbono para *V. parahaemolyticus*:**

Este teste foi realizado segundo descrito por WEST e COLWELL (1983). O meio mínimo, com única fonte de carbono (meio MBM), era misturado ao ágar gelificado apenas no momento do uso, na proporção 1:1, acrescido de etanol filtrado 0,1%, e distribuído em placas de Petri. As colônias presuntivas de serem *V. parahaemolyticus* eram subcultivadas do meio L ágar, utilizando-se agulha microbiológica e semeadas em pequenas ranhuras sobre o meio MBM ágar (ANEXO 11). As placas eram incubadas a 35°C por 72 h e após este tempo era observado o crescimento. Este, ainda que discreto, era considerado positivo para *V. parahaemolyticus*.

#### **4.11 Estocagem e manutenção das células:**

As 1077 cepas com as espécies de *Vibrio* confirmadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar Luria, para obtenção de unidades formadoras de colônias isoladas. A colônia era semeada em 3ml de caldo Luria, incubada a 35°C por 24h. e, pós este período de tempo, 0,5ml da cultura era adicionada a um microtubo (tubo eppendorf) contendo 0,5ml de glicerina 60%, estéril (ANEXO 11). Estas culturas receberam um número, documentado em protocolo próprio e foram estocadas no congelador – 70°C do Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular da FSP/USP.

#### **4.12 Extração do DNA genômico:**

Foram retiradas do congelador  $-70^{\circ}\text{C}$  apenas amostras dos vibrios potencialmente patogênicos, conforme descrição da literatura. Este procedimento foi feito pela obtenção de um “raspado”, na superfície da cultura congelada, utilizando-se, para tal, alça bacteriológica, sendo inoculado, em condições estéreis, em 1ml de caldo Luria (NaCl 3%) e mantidos a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24h.

Para isolamento do DNA genômico destas células, foi aplicada a metodologia utilizada por MURRAY & THOMPSON (1980), com modificações, ou seja, sem a utilização de fenol. Os reagentes utilizados encontram-se descritos no ANEXO 14.

Foi feito um subcultivo 10 ml de caldo Luria NaCl 3%, a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24h, sendo centrifugada, após este tempo a 5.000 rpm a  $24^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. O “sedimento” foi ressuspenso em 567 $\mu\text{l}$  de tampão Tris-EDTA (TE I), onde foram adicionados 30 $\mu\text{l}$  de SDS 10% e 3 $\mu\text{l}$  de proteinase K, agitando-se e incubado por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Após incubação, adicionavam-se 100 $\mu\text{l}$  de NaCl 5M e 80 $\mu\text{l}$  de CTAB (brometo de cetilmetilamônio) pré-aquecido a  $65^{\circ}\text{C}$ , agitado e incubados na mesma temperatura por 20 minutos. Após esse período, foi adicionada igual quantidade de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1); a mistura era homogeneizada e centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a  $24^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa, então, foi transferida para novo tubo e tratada com 5 $\mu\text{l}$  de RNase A (10mg/ml), incubada por uma hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , tratada novamente com igual volume de clorofórmio, com agitação vigorosa, e centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e precipitado com 0,6 vezes o volume de 2-propanol gelado e mantido em gelo por 30 minutos. A mistura foi, assim, agitada suavemente por inversão dos tubos, centrifugada por 5 minutos/10.000 rpm/ $24^{\circ}\text{C}$ ; o sedimento foi lavado com etanol 70% novamente centrifugado por 5 minutos/10.000 rpm/ $24^{\circ}\text{C}$  e secado a vácuo, por 24h. O material obtido foi ressuspenso em 100 $\mu\text{l}$  de TE II e mantido a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.13 Estimativa da concentração e avaliação da qualidade do DNA genômico:**

A concentração do DNA genômico foi estimada por espectrofotometria de luz ultravioleta nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (1 unidade de absorbância a

260nm equivale a 50µg/ml de DNA, segundo DUGAICZYC et al. 1985, cit. SAMBROOK, FITS e MANIATIS 1989), com fator entre 1,8 e 2,0, utilizando Biofotômetro Eppendorf tipo 6131. Amostras, com concentração de DNA inferiores a 50ng/µl, não foram utilizadas nos estudos moleculares.

Já a avaliação da qualidade foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TAE 1X, à temperatura ambiente a 100v (ANEXO 15). O gel foi corado com 0,5µg/ml de solução de brometo de etídio, por 15 minutos e descorados no mesmo tampão de corrida, por uma hora. O gel, então, foi analisado, através de fluorescência de brometo de etídio, pela emissão de luz ultravioleta, no qual a qualidade do DNA era avaliada (SAMBROOK, FITS e MANIATIS 1989). Amostras contendo impurezas não eram utilizadas nos estudos moleculares seguintes.

#### **4.14 Confirmação dos sorogrupos de *V. cholerae* por PCR:**

Foi realizado PCR-Multiplex para identificação de cepas de *V. cholerae* O1 e O139, segundo HOSHINO et al. (1998). Como controle foram utilizadas as cepas *V. cholerae* O1 ATCC14035 e *V. cholerae* não-O1 da coleção de bactérias do Laboratório de Saúde Pública e Biologia Molecular da FSP/USP.

Em microtubos (tipo eppendorf) individuais, 5µl de DNA foram colocados na concentração de 50ng/µl, onde já havia sido adicionado de 2,5µl de tampão de amplificação 10X (Tris-HCl 100mM pH 8,3; KCl 500mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, gelatina 0,01% peso/volume) (Promega, Madison, WI, USA); 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM; 0,5µl de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2,5mM (Promega); 1µl de cada primer reverso e direto (20µM); 0,125µl de enzima *Taq* polimerase 5U/µl (Promega) e água miliQ para o volume final de 25µl. Este sistema de reação foi colocado em Termociclador Eppendorf por 35 ciclos, sendo: desnaturação a 94°C por 5min; anelamento, 94°C por 1 min seguida de 55°C por 1 min; e extensão de 72°C por 1 min e 72°C por 7 min, finalizando a 4°C.

Os primers utilizados foram:

- O1 F2 5' GTTTCCTGAACAGATGGG 3'

- O1 R2 5' GGTCATCTGTAAGTACAAC 3'
- O139 F2 5' AGCCTCTTTATTACGGGTGG 3'
- O139 R2 5' GTCAAACCCGATCGTAAAGG 3'

O DNA de cepas *V. cholerae* O139 e *V. cholerae* O1 ATCC14035 foram utilizados como controle positivo para pesquisa dos genes para antígeno de membrana.

Os produtos da PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% por 60 minutos em intensidade de corrente de 100V. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado. Os produtos finais da PCR foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da eletroforese. Todos os reagentes para estes procedimentos estão listados no ANEXO 16.

#### 4.15 Pesquisa dos fatores de virulência em *V. cholerae* utilizando PCR:

Ensaio experimentais realizados por RIVERA et al. (1995a e 2001) foram executados, para verificar presença destes genes em *V. cholerae*. Reações de PCR multiplex foram realizadas em Termociclador Eppendorf para determinação da presença dos genes *ctxA*, *zot*, *tcpA*, *hlyA*, *ompU*, *tcpI* e *toxR*, utilizando-se *primers* específicos, apresentados na TABELA 2.

As condições de ensaio para pesquisa de *tcpI*, por exemplo, para cada 18 $\mu\text{l}$  de reação foi feita como se segue, segundo realizado por RIVERA et al. (2001): distribuía-se 5 $\mu\text{l}$  de DNA (para concentração final de 50ng) em microtubos de 0,2ml (tipo eppendorf) e adicionava-se em seguida 13  $\mu\text{l}$  da mistura de reação, em cada um, proveniente do kit do fabricante [Promega Corp., Madison, WI], para volume final de 550 $\mu\text{l}$  (276,1 $\mu\text{l}$  de água miliQ; 55 $\mu\text{l}$  de tampão de amplificação 10X (Tris-HCl 100mM pH 8,3; KCl 500mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, gelatina 0,01% peso/volume) (Promega, Madison, WI, USA); 55 $\mu\text{l}$  de MgCl<sub>2</sub>, 25mM; 4,4 $\mu\text{l}$  de mix dNTP 2,5mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 22 $\mu\text{l}$  de cada primer (20 $\mu\text{M}$ ); 5,5  $\mu\text{l}$  de enzima *Taq* DNA polimerase 5U/ $\mu\text{l}$ ).

A programação dos ciclos térmicos da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), para detecção dos genes relacionados à produção de toxinas, foi

esquematizada da seguinte forma: uma desnaturação da fita de DNA, que contém a seqüência a ser amplificada, a 94°C/5min; 30 ciclos consistindo de 94°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos, sendo o anelamento a 60°C por 3 minutos para *tcpI*, segundo RIVERA et al. 2001 (ANEXO 16).

TABELA 2 – Seqüência de primers utilizados nas PCR de pesquisa de virulência.

Alvo	Seqüência nucleotídica (5' para 3')	Direção (*)	Tamanho do amplicon (pb)	Condições da PCR (**)
<i>ctxA</i>	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	D	564	60-1
	CGATGATCTTGGAGCATTCCAC	R		
<i>zot</i>	TCGCTTAACGATGGCGCGTTTT	D	947	60-1
	AACCCCGTTTCACTTCTACCCA	R		
<i>ompU</i>	ACGCTGACGGAATCAACCAAAG	D	869	60-1
	GCGGAAGTTTGGCTTGAAGTAG	R		
<i>tcpA</i>	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	D	451	60-1
	TTACCAAATGCAACGCGAATG	R	620	
	CGAAAGCACCTTCTTTCACACGTTG	R	453	
<i>tcpI</i>	TAGCCTTAGTTCTCAGCAGGCA	D	862	60-3
	GGCAATAGTGTGCGAGCTCGTTA	R		
<i>hlyA</i>	GGCAAACAGCGAAACAAATACC	D	481	60-1
	GAGCCGGCATTTCATCTGAAT	D	738/727	
	CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA	R		
<i>toxR</i>	CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC	D	779	60-1
	AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG	R		

FONTE: RIVERA et al. 2001.

(\*) D = direto; R = reverso

(\*\*) Temperatura de anelamento (°C); tempo de extensão (min)

Os produtos da PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1% por 60 minutos em intensidade de corrente de 100V. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta, e fotodocumentado (ANEXO 15).

Os produtos finais da PCR foram mantidos a -20°C até o momento da eletroforese.

#### 4.16 Estudo do perfis genômicos (“fingerprinting”) por ERIC-PCR dos vibrios potencialmente patogênicos isolados:

A etapa de caracterização molecular para estudo da diversidade foi feita utilizando-se a técnica ERIC-PCR, conforme descrito por RIVERA et al. (1995b).

Para realização da ERIC-PCR, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos (VERSALOVIC, KOEUTH e LUPISKI 1991):

ERIC 1R (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3')

ERIC 2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3')

As condições de amplificação foram assim definidas para cada 100µl de mistura de reação da PCR: 10µl de tampão de amplificação 10X sem MgCl<sub>2</sub>; 6µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM; 4µl de cada solução 1,25mM dATP, dCTP, dGTP e dTTP; primers diretos (F) e primers reversos (R) e 2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase. Todos os reagentes, obtidos do kit Promega, Madison, WI, foram utilizados conforme instruções do fabricante.

Foi dado prosseguimento a reação em microtubos de 0,2ml (tipo eppendorf) em termociclador. O DNA contido, nesta reação, foi denaturado a 92°C, por 45s, com anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C, por 20 minutos até totalizar 35 ciclos, com uma extensão final de 72°C por 20 minutos. Os produtos finais da PCR eram conservados a -20°C até o momento da eletroforese.

#### 4.17 Eletroforese em gel de agarose:

Foi adicionado em um tubo tipo eppendorf 8µl do produto da PCR, ao qual misturou-se azul de bromofenol. Em cada gel também foi adicionado marcador de peso molecular (1 Kb DNA *ladder*; 1µg/µl, Invitrogen, USA) mais 5µl de solução de azul de bromofenol.

As amostras foram aplicadas nas posições correspondentes aos poços do gel de agarose e anotadas. Imediatamente foi colocado tampão TAE 1X na cuba de eletroforese, onde a corrida foi realizada a 2,30 v/cm, por 6h, à temperatura ambiente.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel agarose 1,8% em tampão TAE 1X. A eletroforese foi realizada a 2,30v/cm, no período de 6h.

Para análise do gel, este foi corado com 1µl de uma solução de Vistra Green por 12h, visualizado em uma fonte de luz ultravioleta a 302nm, fotodocumentado com equipamento computadorizado, a imagem digitalizada e o *fingerprinting* analisado.

#### **4.18 Análise dos perfis genômicos (*fingerprinting*):**

O polimorfismo de bandas obtido foi analisado com o auxílio de um software específico para comparação do padrão de bandas (Gel Works 1D Advanced-UVP, versão 4.01), e os perfis de cada espécie foram agrupados, usando coeficiente de DICE e algoritmo UPGMA e demonstrados, graficamente, na forma de dendrogramas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram obtidas, para este estudo, 122 amostras, das quais 15 (12,2%) de zooplâncton e 107 de moluscos bivalves (87,8%), sendo 81 amostras desconchadas (66,4%) e 26 na concha (21,4%), colhidas na área de influência da BTS e Valença em pontos de comercialização.

Além das feiras-livres, peixarias e supermercados previstos, em alguns casos, também foram visitados, como ponto comercial, casa da marisqueira, restaurantes e vendedores às margens das rodovias próximas a manguezais (FIGURA 8). Estes últimos só foram percebidos como vendedores de moluscos bivalves nos meses de verão (dezembro a fevereiro) dos anos de transcurso das coletas deste estudo. Sua presença parece estar associada ou à maior endemicidade dos moluscos bivalves nos bancos naturais ou à maior procura do produto pelos consumidores, por se tratar de época de turismo na região, quando o contingente populacional aumenta.



FIGURA 8 – Comércio de peixes e de mariscos nas rodovias: venda de moluscos bivalves tanto na concha como desconchados, ao longo das rodovias da BTS. Ilha de Itaparica, Bahia, Brasil, 2000-2002.

Nos pontos de venda das cidades, pertencentes à área de estudo, foram procurados moluscos bivalves comestíveis não-industrializados expostos à venda. Os moluscos bivalves foram encontrados em duas formas: vivos, na concha (*in natura*)

ou mortos, ferventados e desconchados. Estes últimos podem ser encontrados para comercialização em três situações diferentes com relação à temperatura de conservação: temperatura ambiente, resfriados ou congelados. Os ANEXOS 3 a 10 apresentam as informações para identificação das amostras dos moluscos bivalves na ocasião da amostragem.

A busca pelos moluscos bivalves foi feita a partir de informações da própria comunidade sobre o local de venda, o qual podia ser as feiras-livres, mercados públicos, peixarias, ambulantes, supermercados e a casa da marisqueira.

Apenas em Feira de Santana e Salvador foram encontrados moluscos bivalves à venda todos os dias da semana em diferentes pontos de comercialização. Nas demais cidades, os moluscos bivalves foram encontrados alguns dias da semana em mercados públicos ou feiras-livres ou ambulantes, em diversas formas de estocagem e em condições precárias de higiene, conforme observado na FIGURA 9.



FIGURA 9 – Pescado e moluscos bivalves desconchados comercializados a céu aberto, em feira-livre, em ausência de congelamento e em condições precárias de higiene. Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2002.

Em algumas cidades visitadas, não foi possível fazer coleta por motivos variados, tais como, ausência de vendedor (5 ocasiões), não haver ponto de venda (1 ocasião), não haver molusco bivalve à venda (1 ocasião) e feriado municipal (1 ocasião).

### **5.1 Características do abastecimento de moluscos bivalves nas cidades estudadas:**

Ainda que o objeto deste estudo se refira a ocorrência de víbrios em moluscos bivalves, no contexto da avaliação do seu potencial em provocar doenças, alguns achados relevantes que elucidam a prática comercial e oferta destes produtos podem dar ao leitor melhor apreensão sobre a dimensão do social do problema tratado.

Os moluscos bivalves comercializados no varejo, na região estudada, provêm, em geral, de manguezais e regiões alagadas da BTS e de Valença. Achados esporádicos, em especial na cidade de Salvador, evidenciaram, segundo informações dos vendedores, a presença de moluscos bivalves (na concha) provenientes de Maceió (AL), Guarajuba (litoral norte da Bahia) e Canavieiras (região sul da Bahia).

A maior comercialização destes produtos, levando-se em consideração volume de oferta da mercadoria, acontece nas feiras-livres, secundariamente nos supermercados e peixarias.

As feiras-livres de cidades como Salvador e Feira de Santana são as que possuem maior número de barracas dedicadas ao comércio de pescado, sendo que a oferta ao consumidor de moluscos bivalves é sempre menor do que a de crustáceos e peixes. Já nas feiras das demais cidades, as barracas dedicadas ao comércio de moluscos bivalves são unitárias, e os vendedores ambulantes do produto são poucos. Com isso, houve dificuldade em obter amostras variadas quanto à espécie em alguns municípios.

As cidades de Valença e Maragogipe, devido à proximidade com regiões de mariscagem, possuem mercados públicos destinados exclusivamente ao comércio de mariscos e, assim, constituem-se em pólos de comercialização e distribuição de moluscos bivalves para todo Estado.

Em termos de volume de oferta da mercadoria em função da espécie, encontrou-se maior quantidade de ostras e sururus desconchados, em toda região estudada, ao longo dos anos 2000-2002, em todos os locais de venda. Estes moluscos bivalves, além de possuírem maior valor comercial, parecem ser melhor aceitos pelo consumidor.

O molusco bivalve com menor oferta foi o mexilhão, devido ao fato de ser um produto importado de outras regiões do país ou do exterior, e cujo preço para comercialização é elevado em relação aos demais.

Considerado difícil de desconchar pelo tamanho diminuto das conchas e de baixo valor comercial, o chumbinho é pouco abundante para comercialização.

O comércio de moluscos bivalves nas conchas é menor se comparado aos moluscos bivalves desconchados. Na concha, a lambreta foi o molusco bivalve que apareceu em maior quantidade em toda a região, seguida pelo sururu e mapé, conforme TABELA 3.

TABELA 3 – Número de moluscos bivalves por nome comum e estado de conservação utilizados na pesquisa de vibrio nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia, Brasil – 2000-2002.

<b>Molusco bivalve</b>	<b>Na Concha</b>	<b>Congelado</b>	<b>Resfriado</b>	<b>Temperatura Ambiente</b>	<b>Total</b>
Ostra	2	10	9	6	27
Sururu	3	10	7	8	28
Chumbinho	1	2	3	4	10
Lambreta	16	-	-	2	18
Mexilhão	-	4	-	1	5
Sarnambi	1	2	-	3	6
Mapé	2	1	3	3	9
Talioba	1	-	2	1	4
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>29</b>	<b>24</b>	<b>28</b>	<b>107</b>

Outro critério analisado foi a oferta de molusco bivalve em relação ao local de comercialização. Genericamente, observou-se que em supermercados sempre havia oferta de ostras e sururus tanto congelados quanto resfriados, e as demais variedades eram ofertadas em menor quantidade. Todavia, nas feiras-livres havia maior diversificação de mercadoria.

## 5.2 Obtenção, processamento e armazenamento dos moluscos bivalves para venda:

A atividade de apanhar moluscos bivalves em praias ou em manguezais, praticada pelas populações locais, assim como as demais que se seguem (processamento, armazenamento, venda), parece ser, segundo os achados, sem fiscalização ou controle. Assim, por não haver fiscalização, esta atividade não atende às exigências dos organismos de defesa e proteção ambiental nem aquelas higiênico-sanitárias previstas por lei (ANVISA – RDC 12/2001 e Ministério da Agricultura – Decreto 99.244/1990).

Observou-se, em dois locais diferentes da área estudada, pessoas em atividade de mariscagem de moluscos bivalves enterrados ou no sedimento encoberto por água de praia ou no lamaçal de manguezais (FIGURA 10). Ainda que tenha sido uma observação rápida foi possível identificar algumas características na atividade desenvolvida por aquelas pessoas: intensa retirada dos moluscos bivalves dos locais onde estavam alojados e reconhecimento dos animais pelo habitat e formato de concha.



FIGURA 10 – Registro da atividade de extrativismo de moluscos bivalves em manguezal da Ilha de Itaparica. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001.

Sabe-se que tanto a obtenção quanto o manuseio para desconchar os moluscos bivalves é rudimentar, com pouca incorporação de tecnologia: à proporção que os moluscos bivalves são encontrados, estes são colocados em cestos ou baldes. Posteriormente são lavados, geralmente, em água parada e colocadas para ferver em água de várias origens, como torneira, cisternas. Durante a fervura, as valvas abrem-se com a morte do animal cujas partes moles são removidas da concha utilizando-se facas e reservadas em recipientes, sendo expostas para a venda, colocadas em sacos plásticos transparentes ou soltos, em pratos, bacias, etc. Se o produto for ensacado, a água utilizada para fervura, bem como o líquido intervalvar podem ser utilizados para “completar o volume” ou “manter o sabor da mercadoria”.

A inspeção dos pacotes contendo moluscos bivalves, expostos a venda nas feiras-livres, mostrou graus diferenciados de resfriamento dos mesmos levando a crer que o produto havia sido acondicionados por algum tempo em geladeira ou congelador, mas, no local de comercialização, ficam em caixas de isopor ou à temperatura ambiente.

As marisqueiras tradicionais são pobres, descapitalizadas para aquisição de congeladores e equipamentos auxiliares no processamento do produto, o que interfere na qualidade da mercadoria e dificulta sua comercialização, baixando ainda mais o preço.

Observou-se também outra forma de comercialização: em alguns vilarejos de região de praias e mangues, é comum encontrar crianças ambulantes comercializando “o prato” de moluscos bivalves desconchados, à temperatura ambiente.

Foi observado também que nos pontos de venda, em especial nas feiras-livres e mercados públicos, encontram-se alguns vendedores utilizando caixas de isopor com gelo em blocos, sob pacotes de moluscos bivalves desconchados. Outros, utilizam apenas o próprio produto congelado para manter o resfriamento. Outros vendedores expõem, a título de amostra, alguns pacotes do produto sobre a tampa da caixa de isopor, ou seja, à temperatura ambiente, enquanto em peixarias e mercados de mariscos, os moluscos bivalves encontram-se em pacotes congelados. Em alguns congeladores, porém, era visível a superlotação na câmara e não foi possível verificar a temperatura ou o tempo de congelamento e estocagem no equipamento ou a data do processamento e validade dos moluscos bivalves expostos à venda.

### 5.3 Coleta nos Supermercados:

Os supermercados, onde foram recolhidas amostras, ficavam nas cidades de Feira de Santana e Salvador. Nas demais cidades ou não havia supermercado ou os supermercados visitados não vendiam o produto.

Os supermercados apresentavam oferta de várias espécies de moluscos bivalves, todos pré-cozidos e desconchados. Durante o período do estudo não foi observada a venda de moluscos bivalves vivos nestas duas cidades.

Os moluscos bivalves estavam expostos ao consumidor de duas formas básicas: aqueles industrializados e os não industrializados. Os não industrializados, que são objeto do presente estudo, podiam ser encontrados embalados em bandejas plásticas ou de isopor recobertas com filme plástico transparente, em balcões congeladores, com quantidade variando entre 150-400 g (FIGURA 11), ou nos setores de pescados, à granel, formando pequenos montes, sobre camada de gelo em escamas.



FIGURA 11 – Balcão congelador, expondo moluscos bivalves comercializados em bandejas, previamente preparadas num supermercado de Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2002.

Nestes balcões congeladores, o consumidor encontra a mercadoria identificada pelo nome comum, peso, preço e previamente embalada. Nos setores de pescados, há por trás dos balcões com gelo, um funcionário específico e fixo no setor para atendimento, usando equipamentos de proteção individual (EPI), de acordo com regras sanitárias de comercialização de pescados.

Em nenhum supermercado visitado, nestas cidades, foi observado nos balcões ou setor de pescados: termômetros indicadores de temperatura, data da coleta, origem do produto, validade, temperatura de estocagem.

Nos supermercados foi observado desconhecimento de maiores detalhes quanto à origem do produto por parte do funcionário do setor de pescados. Já nas feiras-livres, observou-se algum conhecimento do vendedor quanto ao local de origem/coleta e o processamento dos moluscos bivalves.

## **5.4 Coleta nas feiras-livres e mercados públicos:**

### **5.4.1 Apresentação da mercadoria:**

Nas feiras-livres os moluscos bivalves são apresentados em pacotes ou soltos em bacias ou outro recipiente para aqueles pré-cozidos; ou, em montes dentro de sacos de ráfia para os vivos (*in natura*) nas conchas. Os mariscos pré-cozidos mais encontrados nestes locais foram a ostra, o sururu e o chumbinho. Na concha, os mais encontrados foram a lambreta e o sururu, talvez devido a suas resistências naturais à dessecação.

Observou-se que o produto era considerado como “fresco”, pelos vendedores aqueles que exibiam moluscos bivalves catados refrigerados ou à temperatura ambiente, os quais, segundo eles, havia sido processado no dia anterior.

Como já foi dito, as feiras-livres, na maioria das cidades visitadas, acontecem aos sábados. Apenas em Feira de Santana e Salvador estas acontecem em diversos pontos das cidades todos os dias da semana, exceto, feriados.

Para este estudo, a maior parte dos moluscos bivalves analisados foram adquiridos em feiras livres (FIGURAS 12 e 13), uma vez que nestes locais foi observado o maior comércio varejista de venda direta ao consumidor.

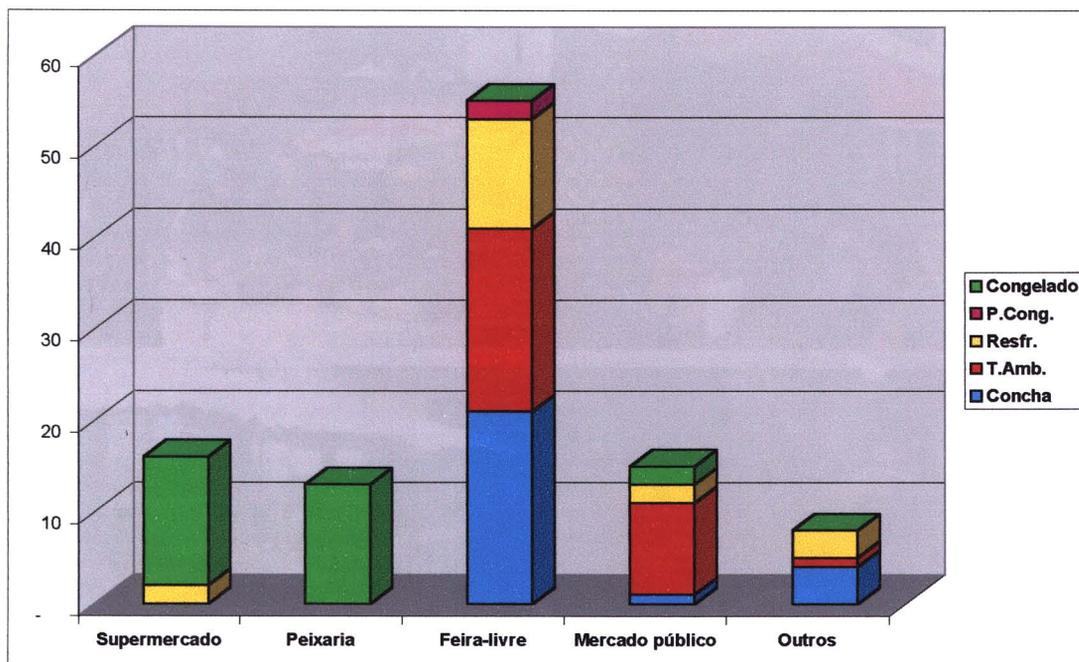


FIGURA 12 – Distribuição dos moluscos bivalves, utilizados na pesquisa, em função do tipo de estabelecimento e da apresentação. Área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

Os locais de venda são específicos, dentro da feira-livre ou nas cercanias, destinados ao comércio de pescados, apresentando-se em barracas de madeira, algumas clandestinas. Apresenta-se com cobertura de lona (em alguns municípios são padronizadas) ou simplesmente ao ar livre, com a mercadoria exposta à temperatura ambiente, ao sol, a insetos, à poeira, manuseio pelos compradores, sobre ou dentro de caixas de isopor, bacias, baldes ou outros vasilhames para os moluscos catados (FIGURA 13).

Os moluscos bivalves também são vendidos vivos ainda nas suas conchas com resíduos de lama ou areia. São comercializados por dúzia ou medido nas latas de óleo de cozinha de 1,0 litro (FIGURA 14), à temperatura ambiente, ao sol. Estes são expostos à venda principalmente em grandes cestos de cipós nativos da região (balaies) (FIGURA 14) ou sacos de ráfia e, secundariamente, em latas de tinta, baldes, etc., podendo ainda ser encontrados nos vendedores ambulantes sobre carros de mão.

Em diversas feiras-livres visitadas, alguns pacotes contendo moluscos bivalves resfriados, já preparados pelo vendedor, possuíam fendas ou perfurações que deixavam escapar exsudato do produto sobre outros pacotes.



FIGURA 13 – Comércio de pescados, em feira-livre, evidenciando, em sentido horário: condições precárias de higiene, (fotos 1, 2, 3 e 4); falta de congelamento (fotos 2, 3 e 4); uso de utensílios inadequados (2 e 4); vendedores sem EPI's (foto 1 e 2). Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001.



FIGURA 14 – Vendedora de moluscos bivalves na concha, utilizando lata de óleo de cozinha como medida, cesto para armazenamento e higiene precária do local de comercialização do produto. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001.

Notou-se que alguns vendedores comercializam o pacote já pronto como tendo 1kg, mas, depois de aferido em balança, alguns não atingiam 800g. Os pacotes de alguns pontos de venda, apresentavam conteúdo líquido cujo volume variava entre 100ml até 400ml. Grande presença de líquido era observada em pacotes de moluscos bivalves desconchados e congelados e pouca ou ausência naqueles resfriados ou sob temperatura ambiente.

O líquido presente na mercadoria só era observado após o descongelamento. Este apresentava, em geral, coloração escura variando entre tons de verde ao marrom, turbidez, partículas em suspensão, areia, fragmentos de concha e duas vezes foram encontrados insetos (mosquitos) mortos, exalando forte odor. Este líquido era sempre considerado como parte integrante das amostras, na produção do homogenato.

Informação espontânea, colhida de um dos vendedores, sugere que a utilização da água da própria fervura dos animais, além de oferecer um sabor especial ao produto durante a preparação final do alimento, era uma fonte de nutrientes para o consumidor.

Os pacotes são feitos em embalagens de saco plástico transparente, com capacidade de 1 litro e com a abertura (boca) amarrada. Estes pacotes possuem peso e preço muito variáveis, a depender da espécie do molusco comercializado, época do ano, localidade, horário da venda e vendedor.

Sem as conchas, são vendidos nos pacotes supostamente de um quilograma, no litro, no copo de vidro (tipo americano) ou descartável ou ainda na “medida” (pequena caixa de madeira que pode ter cerca de 10 cm<sup>3</sup>). O vendedor, com a própria mão, coloca a quantidade de molusco bivalve a granel, pedida pelo consumidor, na medida utilizada. Depois de conferido, coloca-os em sacos plásticos transparentes e amarra a abertura. Nenhum vendedor de moluscos bivalves em feiras-livres que foi visitado possuía balança.

Ainda com relação à venda de moluscos bivalves na concha, observou-se nas feiras-livres que, periodicamente os vendedores podem utilizar o artifício de molhar as conchas pulverizando água sobre as mesmas para manter o aspecto “fresco” da mercadoria, bem como evitar a desidratação dos moluscos, uma vez que o comércio

ocorre à exposição da luz e calor do sol, evitando, assim, prejuízos econômicos ao vendedor pela morte em série dos animais.

Como já foi dito, no Recôncavo baiano, as cidades de Salvador e Feira de Santana apresentam-se como importantes centros industriais/comerciais mas permanecem dependentes economicamente dos empregos da atividade agropecuária ou do comércio em geral, tendo como forte presença o comércio varejista na modalidade informal ou em feiras-livres. Devido ao caráter da informalidade no tocante ao comércio de pescados, especialmente nas feiras-livres, não foram verificados mecanismos de fiscalização tanto da atividade como atendimento as leis sanitárias e tributárias.

O extrativismo dos recursos pesqueiros, especialmente moluscos bivalves, tanto na subsistência ou como recurso econômico, vem servindo de forma de vida para populações menos favorecidas da região, as quais atuam de forma autônoma ou vinculados a grupos pesqueiros cooperativados ou não. Pelo volume de oferta de mercadoria observada em toda a região estudada, nota-se que a atividade passou de subsistência para exploratória comercial. Estudos futuros poderão avaliar o possível caráter predatório da atividade mariscagem e sua influência na dinâmica populacional dos moluscos bivalves.

### **5.5 Coleta em peixarias:**

De todas as cidades visitadas só foi encontrado o estabelecimento comercial tipo peixaria em Salvador, Feira de Santana, Valença, Bom Jesus dos Pobres, Lauro de Freitas, São Gonçalo dos Campos, Guaibim e Simões Filho. Impedimentos mais encontrados para aquisição das amostras em determinadas peixarias: excesso de congelamento dos pacotes que dificultavam sua remoção, pacotes grandes muito congelados e de grande peso impossibilitando o fracionamento e até mesmo a falta do produto para venda.

Em todas as peixarias visitadas, os moluscos bivalves comercializados estavam desconchados e congelados em pacotes de tamanho variado. Estes eram acondicionados dentro de congeladores horizontais domésticos, embalados em sacos plásticos transparentes fechados. Foi observado que os pacotes eram colocados no congelador desordenadamente, causando o congelamento de blocos disformes da

mercadoria, impossibilitando, muitas vezes, a procura por uma determinada espécie e o seu reconhecimento. Conseqüentemente, aqueles pacotes mais velhos, ficam por baixo, os mais recentes por cima e são logo vendidos. Enquanto isso, os pacotes da parte baixa vão se tornando blocos difíceis de serem removidos devido ao congelamento que provoca adesão entre eles.

Em todas as peixarias, é prática comum colocar nos congeladores pacotes de moluscos bivalves junto com os de crustáceos – todos sem concha ou exoesqueleto – o que, após o congelamento, a identificação é dificultada. A questão da identificação das mercadorias, nas peixarias, só acontece de forma visual através do vendedor mais experiente, pois não há nos pacotes etiquetas de identificação com nome do produto, coleta, origem nem validade.

A maior parte das peixarias visitadas já vende o pacote pronto, e o preço é arbitrário semelhante ao que acontece nas feiras-livres, pois muitas tabelas de preços expostas não indicam o valor do peso dos mesmos. O peso é aferido em balança e poucas são aquelas que fracionam o produto. Apenas em Feira de Santana foi possível comprar frações, por exemplo, 200g de molusco congelado a partir de um pacote congelado. Para tal, a peixaria dispõe de um sistema de corte, usando ferramenta elétrica (serra), que torna possível ao consumidor adquirir qualquer quantidade do produto.

Esta serra é utilizada para cortes em série dos produtos congelados inclusive peixes e crustáceos. Durante o corte há contato do produto com a parte denteada da serra, sugerindo ser esta ferramenta uma fonte de infecção cruzada entre os diversos produtos cortados.

## **5.6 Identificação dos moluscos bivalves utilizados na pesquisa**

Aspectos culturais regionais influenciaram a existência de um vocabulário próprio para se referir tanto as espécies de moluscos bivalves como a atividade de coleta/processamento dos mesmos. O termo “marisco” é utilizado tanto para identificação de moluscos bivalves como crustáceos comestíveis comercializados. Chama-se “mariscagem” a coleta de moluscos bivalves seja na praia ou no mangue (FIGURA 10), a qual acontece na maré-baixa; e “marisqueiro (a)” o indivíduo

praticante da atividade tanto de coleta como a de processamento (“catar”, retirar da concha depois de ferventado, ou seja, desconchar).

Devido à impossibilidade de identificar taxonomicamente os moluscos ferventados, foi levado em consideração apenas os nomes vulgares dados pelos vendedores/marisqueiras. Esta identificação era feita no ato da aquisição dos moluscos, e seus nomes eram anotados e comparados com nomes/informações anteriores obtidas de vendedores e marisqueiras de outros municípios.

Esta dificuldade de se classificar os moluscos bivalves desconchados e cozidos, como são encontrados em feiras-livres para a venda foi devido ao fato de que os moluscos bivalves depois de cozidos e desconchados podem apresentar profundas alterações das características anatômicas (FIGURA 15).



FIGURA 15 – Moluscos bivalves, adquiridos numa das coletas realizadas, vendidos em feira-livre de município da BTS, num mesmo pacote, com o nome de “mapé”, porém havendo uma possível variedade de organismos. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2002.

Em se tratando dos moluscos bivalves, obtidos na concha, em especial, as ostras, à primeira vista, a identificação pela morfologia da concha pode parecer difícil. Isto porque a concha ao ser removida da superfície onde estava aderida pode trazer presa, às suas valvas, partes de substrato rochoso, por exemplo, onde o

molusco bivalve cresceu. Esta adesão leva a uma assimetria na formação das valvas ocasionando desproporção entre as mesmas e dificuldade de localização da parte posterior para a abertura.

Em conchas de mapé, por exemplo, esta assimetria não foi observada, em função do habitat do animal ser outro. As conchas apareciam recobertas apenas de fino material limoso de coloração marrom-esverdeada, facilmente removido com escova. Já as conchas de lambreta são brancas e calcáreas, com circunvoluções e guardam em sua superfície externa resíduos de areia e substância areno-lodosa.

Mesmo com a impossibilidade de se fazer um estudo taxonômico de todos moluscos bivalves coletados para esta pesquisa, devido ao grande número de amostras desconchadas, ainda assim, sugere-se a classificação abaixo:

Classe: Bivalvia

1. Família: Mytilidae

*Mytella falcata* (sinonímia *Mytella charruana*) (LAMARCK 1819)  
chamado “sururu”

*Mytella guyanensis* (LAMARCK 1819) chamado “sururu”  
(no presente estudo ambas espécies são chamadas sururu)

2. Família: Ostreidae

*Crassostrea rhizophorae* (GUILDING 1828) chamado “ostra” ou “ostra de mergulho”  
(no presente estudo é chamado ostra)

3. Família: Lucinidae

*Lucina pectinata* (GMELI 1791) chamado “lambreta”

4. Família: Veneridae

*Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN 1791) chamado “bebe-fumo” ou “papa-fumo” ou “chumbinho” ou “machadinho”  
(no presente estudo é chamado chumbinho)

5. Família: Donacidae

*Iphigenia brasiliensis* (LAMARCK 1818) chamado “talioba” ou “tarioba”  
ou “taioba”  
(no presente estudo é chamado talioba)

6. Família: Solecurtidae

*Tagelus plebeius* (SPENGLER 1794) chamado “mapé”

Conforme já explicado na Introdução, além destas espécies nativas supracitadas há outras que são comercializadas, mas pouco conhecidas e sem ocorrência no nordeste brasileiro, sendo designadas popularmente nos supermercados e peixarias “mexilhão” (Mytilidae). Devido a obtenção do produto desconchado, é impossível identificar taxonomicamente, podendo ser *Perna perna* (LINNAEUS 1758).

Além da dificuldade de classificação, pode ocorrer mistura de várias espécies em um mesmo pacote para a venda o que impossibilita a identificação baseada em nome vulgar (FIGURA 15). Esta mistura de moluscos bivalves num mesmo pacote parece não ser intencional por parte do vendedor, derivando possivelmente do fato de que durante a mariscagem os catadores não têm facilidade em discriminar as espécies de moluscos bivalves pelo aspecto externo das conchas, agrupando os animais por alguma similaridade aleatória. Normalmente esta mistura é encontrada em produtos oriundos da mariscagem em areia de praia pela grande biodiversidade dos moluscos bivalves, nestes locais, não ocorrendo o mesmo em manguezais.

Partindo do nome vulgar para identificação taxonômica, outros obstáculos surgem: os nomes vulgares às vezes variam entre as localidades para um mesmo animal, e, um único nome pode designar moluscos bivalves diferentes na mesma região; ou ainda, a dúvida ou troca de nomes comuns para designação dos moluscos bivalves por parte dos vendedores.

Sabe-se que na Bahia há diversos nomes vulgares para designar os moluscos bivalves comestíveis: ostra; sururu; mapé; sarnambi ou sarnambitinga; machadinho ou chumbinho ou papa-fumo ou bebe-fumo; lambreta ou concha; talioba ou tarioba (este último não usual entre a população pesquisada, sendo mais conhecido entre os malacologistas) – (FIGURA 16). Esta variedade de nomes foi encontrada em todos os pontos de comercialização ao longo de toda a área de coleta.

A controvérsia envolvendo esta tentativa de classificação, merece alguns comentários, ainda que não seja objeto central deste estudo. Isto porque a identificação mais precisa dos animais coletados é importante para discussão sobre ocorrência de vibrios, pois permite fazer associações quanto ao habitat, nicho ecológico, influência das marés sobre os mesmos. Algumas espécies de moluscos bivalves vivem aderidas à superfícies submersas, e, com isso, o animal pode filtrar ininterruptamente durante todo o dia. Outras espécies filtram água do mar à mercê

das marés que variam conforme o ciclo lunar, deixando o molusco bivalve a seco ou submerso em momentos diferentes ao longo do dia.

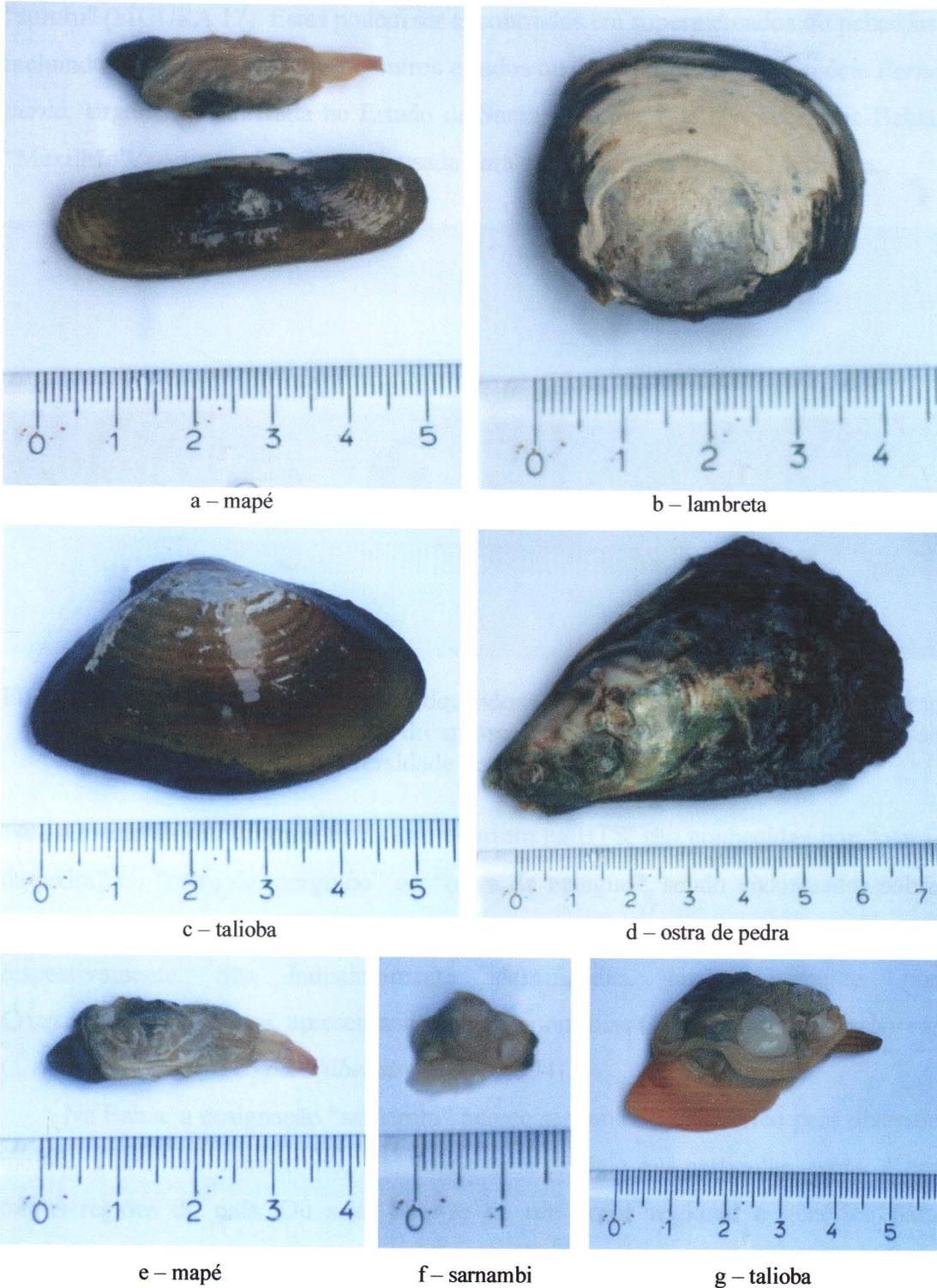


FIGURA 16 – Moluscos bivalves, adquiridos em algumas coletas, e sua identificação, segundo nomes vulgares dados pelos vendedores no ato da compra. Área de influência da BTS, Bahia, Brasil, 2001.

Quanto às designações regionais, apesar de não ser comum, pode-se encontrar referências a moluscos bivalves coletados na região como sendo “mexilhão” ou “sururu” (FIGURA 17). Estes podem ser encontrados em supermercados ou peixarias, incluindo espécies importadas de outros estados ou do exterior como a espécie *Perna perna*, largamente cultivada no Estado de Santa Catarina, que não ocorre na Bahia. “Mexilhão”, portanto, é designação usada para as espécies da família Mytilidae.



FIGURA 17 – Moluscos bivalves, adquiridos em uma das coletas com o nome “sururu”, retirados do mesmo pacote. Na fotografia, evidencia-se uma possível diversidade de espécie entre os representantes.

Quanto às ostras comestíveis que ocorrem na BTS, são conhecidas por “ostra-de-pedra” ou “ostra de mergulho” ou “ostra de mangue”, sendo encontradas sobre substratos duros tais como rochas, pedras e raízes de *Rhizophora mangle*, respectivamente. São indistintamente identificadas, taxonomicamente, por *Crassostrea rhizophorae*, apresentando várias sinonímias (*C. brasiliana*, *C. arborea*, *C. rhizophora praia*, *C. parahibensis*) (RIOS 1994).

Na Bahia, a designação “sarnambi” parece ser um nome genérico para diversos moluscos bivalves comestíveis, não sendo uma espécie em particular, como é em outras regiões do país. Ou seja, trata-se de um nome regional e genérico para moluscos bivalves comestíveis semelhantes ao chumbinho. Assim, parece que sarnambi é também sinônimo de chumbinho e só é encontrado à venda desconchado com o nome de sarnambi em alguns locais do litoral baiano.

Assim, por não haver condições de se ter uma classificação precisa, os moluscos bivalves serão tratados doravante, neste estudo, pelos seus nomes populares.

### **5.7 Ocorrência de víbrios, em moluscos bivalves, comercializados e zooplâncton:**

Em todas as 122 amostras estudadas houve crescimento bacteriano inespecífico tanto nos meios de enriquecimento, caracterizado pela aquisição de aspecto turvo, como crescimento de bactérias presuntivas de pertencerem ao gênero *Vibrio* em meio seletivo TCBS pelo aparecimento de colônias típicas.

Das 122 amostras estudadas, 103 (84,4 %) apresentaram alguma espécie de víbrio, sendo que as 19 restantes (15,5%) não apresentaram nenhuma ocorrência.

Destas 19 amostras, quanto ao molusco bivalve analisado (substrato), 7 amostras (36,8%) eram sururu; 7 amostras (36,8%) eram ostra; 2 amostras (10,5%), mexilhão; 2 amostras (10,5%), talioba; 1 amostra (5,2%), mapé.

Quanto ao estado de conservação dos substratos apenas oito delas (42%) estavam congeladas, sendo cinco delas adquiridas em supermercados. Como o local de origem do molusco bivalve era muito variado (amostras da BTS, Valença, de outras regiões do litoral baiano e de fora do Estado) não foi possível fazer inferências à respeito, indicando que, possivelmente, a ausência dos víbrios pudesse estar mais relacionada à eficácia da fervura para desconchar.

A partir das demais 103 amostras tanto de zooplâncton como de moluscos bivalves foram isoladas um total de 5.000 colônias características de pertencerem ao gênero *Vibrio*. Um total de 1077 cepas exibiu, em meio Kliegler, características presumíveis de pertencerem ao gênero *Vibrio* (fermentação da glicose, não produção de gás nem H<sub>2</sub>S, presença da enzima citocromo oxidase) e foram passadas para caldo L suplementado com NaCl a 3% e pela adição de glicerol, conservadas a -70°C.

### **5.8 Testes bioquímicos:**

Obteve-se, tanto nas amostras de moluscos bivalves (FIGURA 18) como nas de zooplâncton (FIGURA 19), várias espécies de víbrios numa mesma amostra, ou em alguns casos, apenas uma única espécie de víbrio.

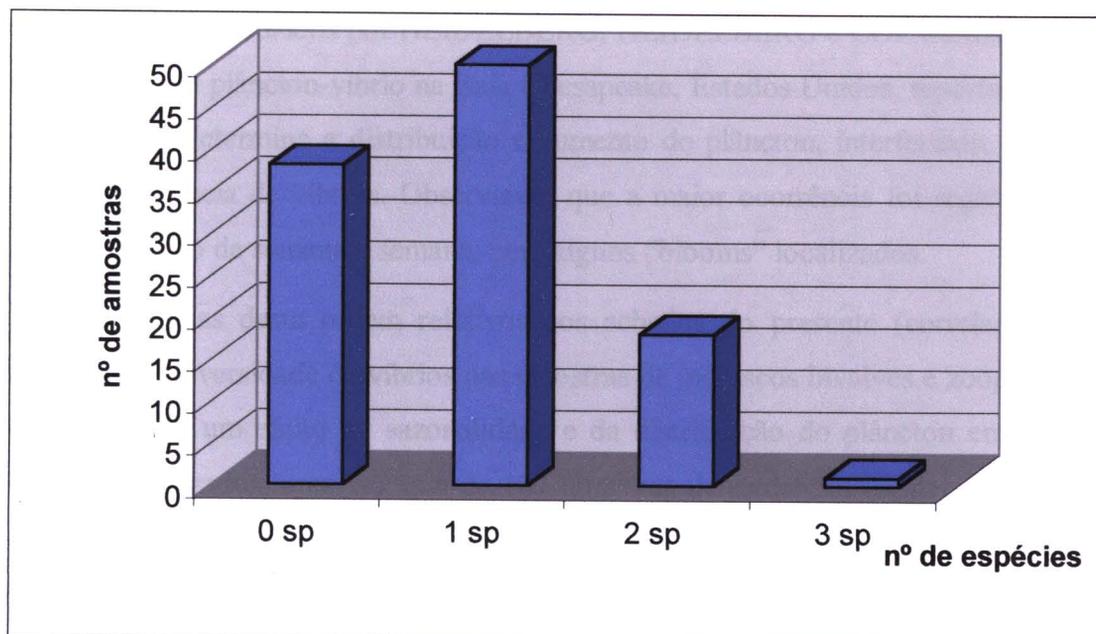


FIGURA 18 – Número de amostras por número de espécies de vibrio potencialmente patogênicos, registrados em amostras de moluscos bivalves, coletados na Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil, 2000-2002.

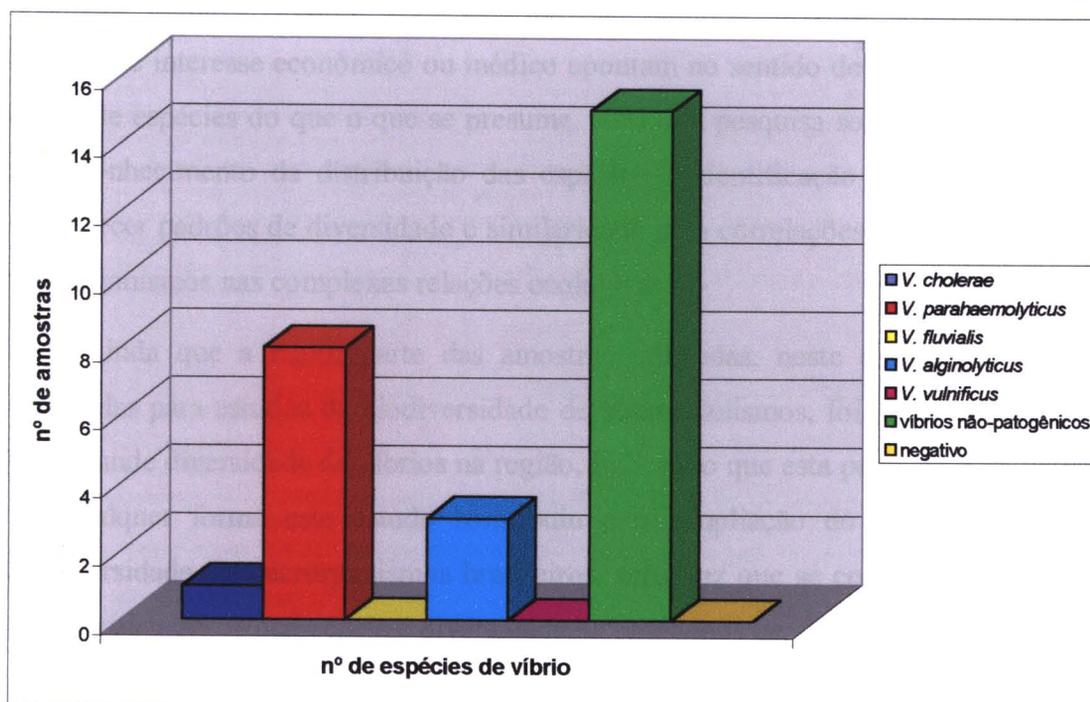


FIGURA 19 – Número de amostras de zooplâncton, contendo espécies de vibrio, coletadas na Baía de Todos os Santos, Bahia – Brasil, 2000-2002.

Estudos conduzidos por HEIDELBERG, HEIDELBERG e COLWELL (2002), sobre a relação plâncton-víbrio na Baía Chesapeake, Estados Unidos, reportam que a sazonalidade determina a distribuição e aumento do plâncton, interferindo, por sua vez na ocorrência de vírios. Observaram que a maior ocorrência foi registrada no verão, variando de semana a semana, com alguns “blooms” localizados.

Inferências desta ordem relativos aos achados do presente (correlacionar a ocorrência e diversidade de vírios nas amostras de moluscos bivalves e zooplâncton em função de um efeito da sazonalidade e da distribuição do plâncton em geral), estão inviabilizados, uma vez que de 107 amostras de moluscos bivalves coletados 29% eram congeladas e sem informações confiáveis sobre a data e local da coleta. Quanto às amostras de plâncton, por sua vez, nenhum parâmetro físico-químico foi mensurado na água antes da coleta.

O conhecimento desta biodiversidade tem sido objeto de estudo em todo o mundo, uma vez que ainda é muito pouco conhecida. Ainda, neste início do século XXI, a diversidade microbiológica é praticamente desconhecida, especialmente a brasileira. Estudos circunscritos a determinadas famílias bacterianas, especialmente aquelas de interesse econômico ou médico apontam no sentido de um número muito maior de espécies do que o que se presume. Assim, a pesquisa sobre biodiversidade para conhecimento da distribuição das espécies e identificação de novas permite estabelecer padrões de diversidade e similaridade para correlações sobre o papel dos microrganismos nas complexas relações ecológicas.

Ainda que a maior parte das amostras utilizadas, neste estudo, não sejam adequadas para estudos da biodiversidade de microrganismos, foi possível constatar uma grande diversidade de vírios na região, indicando que esta pode ser bem maior. De qualquer forma este estudo contribuiu para ampliação do conhecimento da biodiversidade de microrganismos brasileiros, uma vez que se constituiu num meio de identificação de ocorrência e diversidade de patógenos de alimentos e a circulação destes no meio ambiente em estudo.

### 5.9 Ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos, em moluscos bivalves, comercializados e plâncton:

Os moluscos bivalves são, sabidamente, animais filtradores/bioacumuladores, e devido a essa característica, estão ligados ao risco de se contrair gastroenterites, como a cólera pelo consumo de produtos marinhos sem controle sanitário ou mal preparados. Devido à constatação de alto consumo de moluscos bivalves especialmente crus na região, e que aqueles consumidos cozidos são coletados e processados artesanalmente, conseqüentemente não passando por nenhum controle de qualidade microbiológico/sanitário, optou-se por estudar os moluscos bivalves como fonte de infecção diarréica.

Tanto amostras de plâncton quanto de moluscos bivalves estudados apresentaram vibrios potencialmente patogênicos. A ocorrência de vibrios, em ambos, têm sido amplamente divulgado na literatura, conforme explanado na introdução deste estudo, entretanto, constitui-se objeto de constante interesse a verificação da ocorrência destas bactérias em alimentos e águas recreacionais.

Foram isoladas 1077 cepas, sendo 741 cepas (68,8%) consideradas como vibrios ambientais, e 336 cepas (31,2%) consideradas como vibrios potencialmente patogênicos. Estes últimos, em sua maior parte foram isolados de amostras de moluscos bivalves, que se mostraram mais importantes do que o zooplâncton como indicadores da ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos. Estudos futuros que contemplem a coleta, num mesmo local, de plâncton e de moluscos bivalves *in natura*, podem ser auxiliares no balizamento dos achados microbianos nos produtos expostos à venda, ainda que não hajam garantias de sua procedência.

Os vibrios mais abundantes, encontrados nas amostras analisadas, neste estudo, são os chamados vibrios ambientais, não patogênicos (738 cepas, aproximadamente 70% do total estudado), destacando-se o *V. anguillarum*. A ocorrência de vibrios ambientais, nas amostras estudadas, pode ser considerada um aspecto relevante, uma vez que de 107 amostras de moluscos bivalves colhidas 86% sofreram escaldamento para abertura das conchas, e 29% congelamento, fatores adversos para presença de bactérias do gênero *Vibrio*.

Para exemplificar a diversidade encontrada entre as 122 amostras, uma delas, proveniente do zooplâncton apresentou maior número de isolados (105 cepas),

pequena diversificação, sendo a maior parte das cepas *V. anguillarum*, dentre os vibrios ambientais em que foi possível a identificação. Esta pequena diversidade, marcada pela ocorrência do *V. anguillarum* (entre os vibrios ambientais) e secundariamente do *V. parahaemolyticus* (entre os vibrios potencialmente patogênicos), foi registrada na maior parte das amostras analisadas originárias das águas da BTS.

As amostras que apresentaram maior diversidade de espécies isoladas eram provenientes de Valença e coletadas entre agosto de 2000 a setembro de 2001, as quais apresentaram, entre os vibrios ambientais possíveis de serem identificados além do *V. anguillarum*, *V. cincinnatiensis*, *V. proteolyticus*, *V. natriengens*, *V. fisheri*, e *V. campbelli*.

Vale ressaltar que aquelas cepas consideradas atípicas, devido ao perfil bioquímico corresponder parcialmente ao gênero *Vibrio*, foram inclusas na categoria “vibrios ambientais”, pois podem ser espécies novas ainda não descritas. Ficam recomendados estudos adicionais envolvendo genética molecular para identificação destas bactérias.

Entretanto dos vibrios potencialmente patogênicos conhecidos da comunidade científica e descritos na literatura, foram identificadas na coleção 336 cepas de espécies potencialmente patogênicas, das quais, 17 cepas (1,5%) eram *Vibrio cholerae*; 216 cepas (20,0%) eram *Vibrio parahaemolyticus*; 64 cepas (5,9%) eram *Vibrio alginolyticus*; 24 cepas (2,2%) *Vibrio fluvialis*; 01 cepa (0,1%) *Vibrio mimicus*, e 14 cepas (1,3%) *Vibrio vulnificus* (FIGURA 20 e FIGURA 21). Devido a baixa ocorrência do *Vibrio mimicus*, este não será citado neste estudo.

Enquanto a distribuição dos vibrios ambientais e *V. parahaemolyticus* parece ser mais ou menos homogênea na região estudada, o mesmo não ocorre com os demais vibrios potencialmente patogênicos.

Apesar da ocorrência de *V. parahaemolyticus*, segundo a literatura, estar ligada aos meses quentes do ano (KELLY e STROH 1988), esta constatação não pode ser verificada em função das amostras congeladas não terem data de coleta. Sua presença, porém, foi detectada independente da origem e natureza da amostra, fosse o molusco bivalve congelado ou sob temperatura ambiente, ou no zooplâncton.

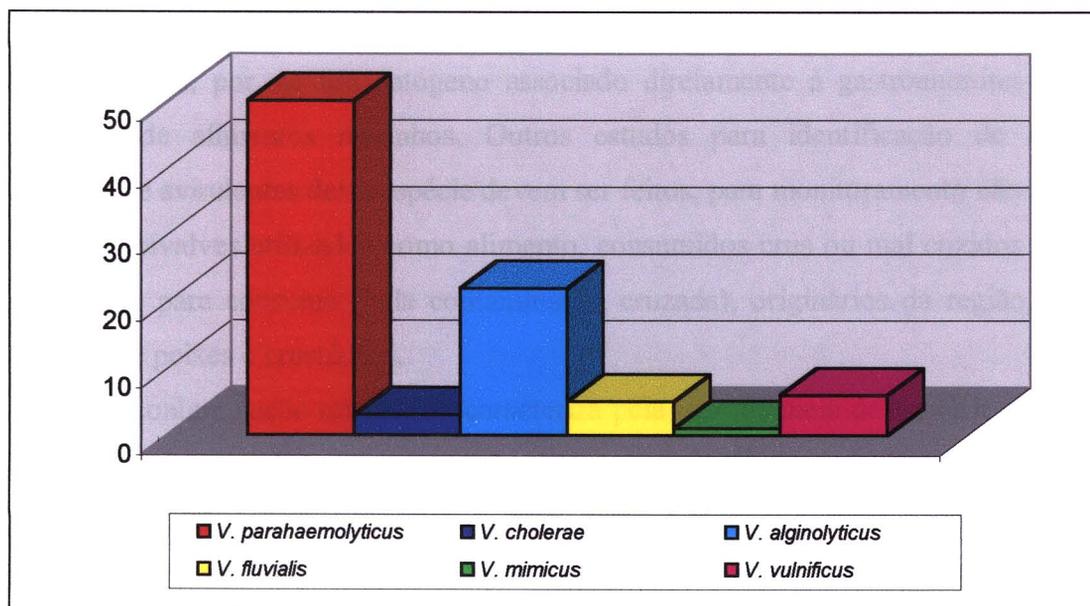
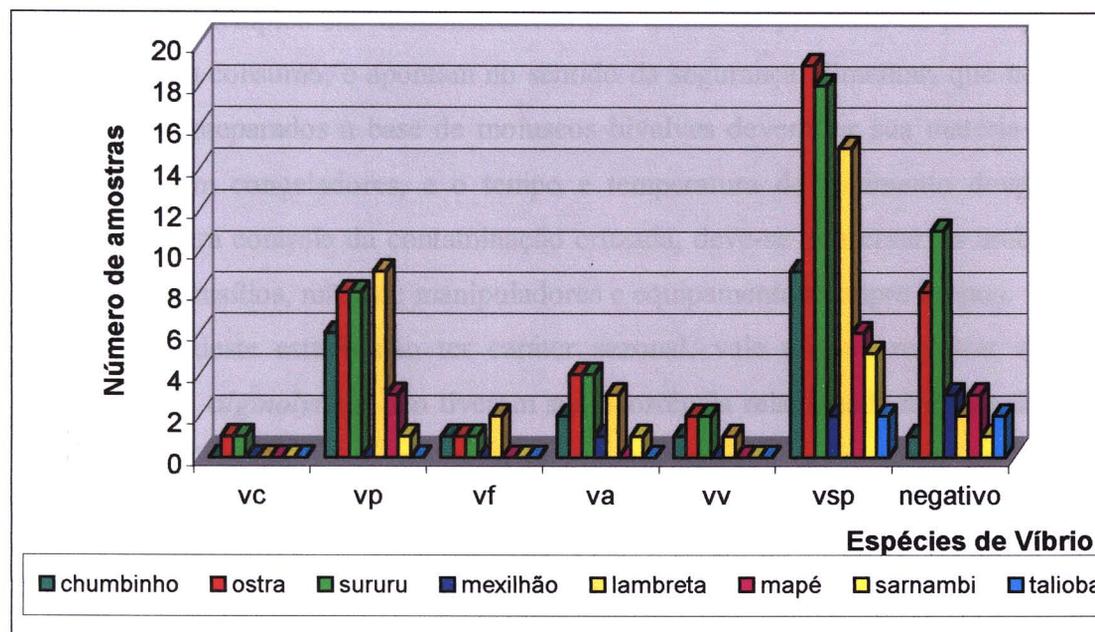


FIGURA 20 – Número de amostras de moluscos bivalves com ocorrência de *Vibrio* por espécie. Área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

No entanto, LIRA et al. (2001), estudando a ocorrência de *V. parahaemolyticus* em moluscos bivalves comercializados em Recife (PE), identificaram que os sururus estavam mais contaminados por este patógeno do que as ostras, e que, na água onde foram capturados os moluscos bivalves, estes apareciam em número bem menor.



vc – *V. cholerae* vp – *V. parahaemolyticus* vf – *V. fluvialis* va – *V. alginolyticus* vv – *V. vulnificus* vsp – *Vibrio spp*

FIGURA 21 – Distribuição de *Vibrio* por moluscos bivalves coletados. Área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

A contaminação de alimentos por *V. parahaemolyticus* tem importância para a Saúde Pública, por ser um patógeno associado diretamente à gastroenterites após consumo de alimentos marinhos. Outros estudos para identificação de cepas virulentas e avirulentas desta espécie devem ser feitos, para monitoramento não só de moluscos bivalves utilizados como alimento, consumidos crus ou mal cozidos ou já preparados para consumo (pela contaminação cruzada), originários da região, mas também de peixes e crustáceos.

A contaminação cruzada se caracteriza pela transferência de bactérias de um alimento contaminado para outro não, seja por via direta (mal armazenamento conjunto de moluscos com outros alimentos em congeladores e geladeiras, permitindo vazamento do exsudato, por exemplo) ou indireta (entre outras formas, pela contaminação dos objetos e utensílios de cozinha que são usados simultaneamente para mexer nos alimentos crus e nos já preparados). A cocção adequada poderá vir a ser uma forma de minimizar eventuais casos de gastroenterites, pois o calor elimina os vibrios.

Ressalta-se, desse modo, a possibilidade de contaminação cruzada por moluscos bivalves ou outro alimento de origem marinha em cozinhas tanto residenciais como restaurantes.

Esses exemplos são demonstrativos das falhas no processo de produção de alimentos para consumo, e apontam no sentido da segurança alimentar, que no caso de alimentos preparados a base de moluscos bivalves devem ter sua matéria-prima armazenada em congeladores, e o tempo e temperatura de cozimento devem ser adequados. Para controle da contaminação cruzada, deve-se conservar os ambientes de preparo, utensílios, mãos de manipuladores e equipamentos sempre limpos.

Apesar deste estudo não ter caráter sazonal, vale a pena registrar que *V. fluvialis* e o *V. alginolyticus* não tiveram sua ocorrência relacionada à época do ano. Enquanto o *V. alginolyticus* apareceu predominantemente entre agosto de 2000 a setembro de 2001, o *V. fluvialis* apareceu predominou em apenas uma amostra que contribuindo com 19 cepas, das 24 totais isoladas, a partir dos moluscos bivalves.

Cepas de *V. vulnificus* também foram isoladas em número representativo, em apenas duas amostras de moluscos bivalves. Fato digno de nota deste isolamento advém do fato de que, mesmo utilizando uma metodologia inadequada para

isolamento desta espécie, ainda assim foi possível registrar sua ocorrência indicando que sua presença deve ser ainda maior. O risco de infecções causadas por este vibrio está relacionado a atividade ocupacional tanto na mariscagem/manipulação dos moluscos bivalves, como na atividade de pesca (acidentes por mordedura de peixes ou outros animais marinhos), bem como eventuais acidentes com banhistas.

Um total de dezessete cepas de *V. cholerae* foram isoladas. As amostras onde foram registradas a sua ocorrência, foram: 1 amostra de ostra congelada (12 cepas); 1 amostra de zooplâncton (03 cepas); e 1 amostra de sururu em água de fervura (02 cepas). Esta última amostra citada revelou estar com algum comprometimento higiênico, uma vez que de 21 cepas presumíveis de serem víbrios isoladas, duas foram identificadas como *V. cholerae* e as dezenove restantes *V. fluvialis*.

Apesar das amostras com ocorrência de *V. cholerae* serem bastante diferenciadas quanto à origem, natureza e maneira de conservação (plâncton, moluscos bivalves congelado ou temperatura ambiente), o traço de semelhança entre elas é a presença abundante de líquido (exsudato, água de fervura ou água do ambiente) nas três. Em uma delas, ao sofrer descongelamento, apresentou um volume de água de 400 ml, a qual foi recuperada e incluída, em parte, junto com a amostra sólida a ser triturada. Outra amostra possuía a peculiaridade de ter os sururus desconchados conservados em sua própria água de fervura, à temperatura ambiente. E a terceira, é pela sua própria natureza, destacada por ser amostra de zooplâncton.

Nas duas primeiras amostras, os moluscos bivalves passaram por diversas situações, tais como mudança de ambiente, fervura/congelamento e retirada das valvas e ainda, assim, a presença de *V. cholerae* foi registrada. Destaca-se o fato de que *V. cholerae* foi detectado mesmo sob as condições adversas, indicando que o vibrio sobrevive após fervura, quando não realizada de modo adequado, isentando os moluscos bivalves comestíveis de sua presença. Ou seja, o escaldamento para abertura das conchas não elimina os víbrios.

Outra possibilidade seria a contaminação cruzada, após a abertura das mesmas, seja pelos objetos e recipientes utilizados contaminados seja pela adição de água contaminada. Estes achados indicam que, possivelmente, as cepas isoladas não foram obtidos dos tecidos animais, mas sim do líquido, que tornou-se local de multiplicação das bactérias.

Os testes imunológicos de aglutinação com anticorpo policlonal com as 17 cepas de *V. cholerae* indicaram que estas pertenciam ao sorogrupo não-O1 não-O139.

A confirmação dos dados sorológicos obtidos entre as cepas de *V. cholerae* foi feita pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Conforme se observa nos padrões exibidos pelo gel (FIGURA 22), todas as cepas isoladas são *V. cholerae* não-O1 não-O139, confirmando os resultados obtidos na sorologia.

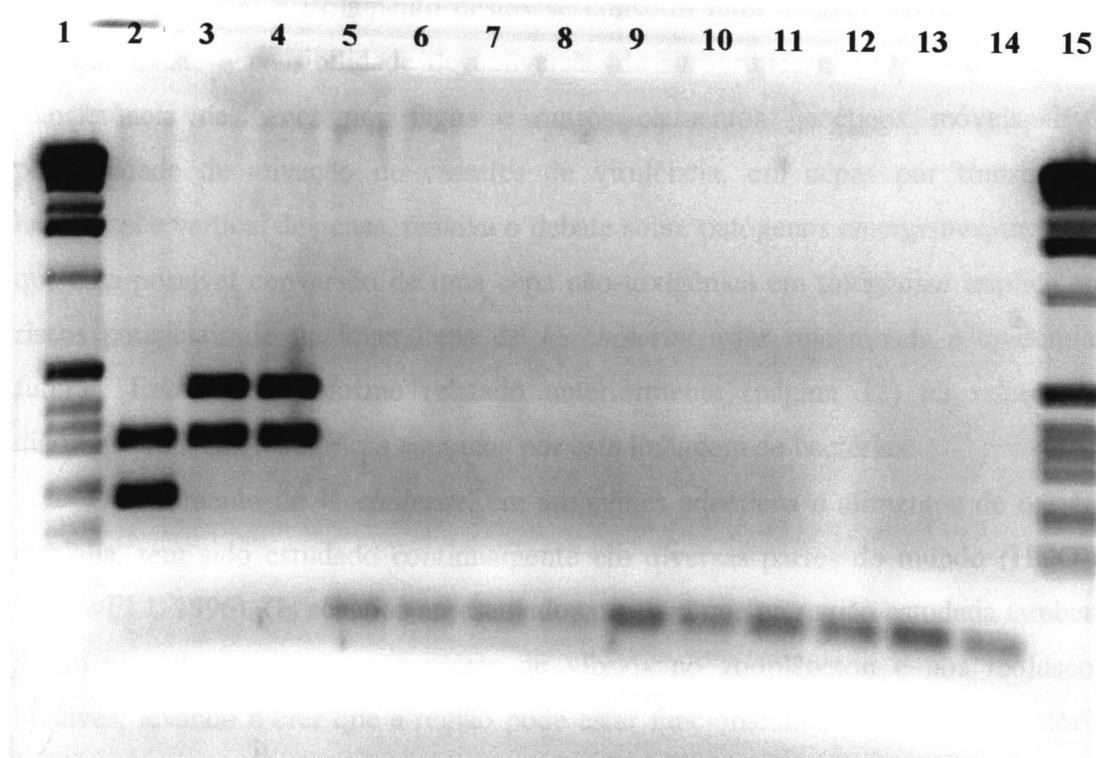


FIGURA 22 – Multiplex PCR *V. cholerae* O1 e O139: poços 1 e 15 – DNA Marker 1 Kb Ladder; poço 2 – DNA Controle O139; poços 3 e 4 – DNA Controle O1 (2 cepas); poços 5 ao 14 – DNA das cepas isoladas neste estudo.

Este resultado ratifica a possibilidade da incorporação das técnicas moleculares na rotina dos Laboratórios de Saúde Pública, pela precisão e sensibilidade, especialmente, para avaliação de antígenos nas cepas de *V. cholerae* brasileiras, ainda pouco conhecidas.

Ressalta-se, também, que a introdução, neste estudo, da técnica PCR para pesquisa de antígeno em *V. cholerae* se constitui numa inovação envolvendo cepas do Brasil.

Os testes moleculares se constituem, portanto, numa alternativa segura para esta distinção, além disso trata-se de uma identificação rápida e eficaz em situações de riscos de epidemia. Entretanto, os testes moleculares possuem limitações em função dos primers disponíveis serem específicos para os sorogrupos O1 e O139, não fornecendo possibilidade de identificação dos demais que no total somam 206 (HOSHINO et al. 1998; RIVERA et al. 2001).

Nem todas as cepas *V. cholerae* não-O1 não-O139 são patogênicas ou toxigênicas, porém o isolamento destas se constitui num achado interessante, uma vez que existe a possibilidade de conversão de sorogrupos não-O1 para O1, pela transferência de genes por fagos e outros elementos genéticos móveis. Esta possibilidade de ativação de cassetes de virulência, em cepas por transmissão horizontal e vertical de genes, reaviva o debate sobre patógenos emergentes, uma vez que essa possível conversão de uma cepa não-toxigênica em toxigênica implica em riscos potenciais de qualquer cepa de *V. cholerae* estar relacionada a epidemias futuras. Entretanto conforme relatado anteriormente (página 32) há relatos de diarreias brandas ou coléricas causadas por esta linhagem de bactérias.

O isolamento de *V. cholerae*, em ambientes aquáticos e alimentos de origem marinha, tem sido estudado continuamente em diversas partes do mundo (HUQ e COLWELL 1996). Os achados apresentados revelam que na região estudada também foram encontrados diversas espécies de vibrios no zooplâncton e nos moluscos bivalves, levando a crer que a região pode estar funcionando como um reservatório destas bactérias. Isto põe em risco a recreação nas praias, as atividades pesqueiras e mariscagem, mas principalmente, o consumo dos moluscos bivalves pela população possibilitando um retorno das bactérias ligadas a infecções gastrointestinais à cadeia alimentar. Isto impulsiona a disseminação bacteriológica, causando doenças, fazendo novos reservatórios ambientais ocasionado pelo não tratamento dos dejetos contaminados, uma vez que a região não possui em toda sua extensão saneamento básico. Devido a sua preferência natural por ambientes salobros, fica favorecida a instalação microbiana em determinados locais próximos a rios, fato este comprovado através das amostras de moluscos bivalves analisados, coletados em regiões próximas à desembocadura de rios na BTS, segundo os vendedores, que continham *V. cholerae*. O mesmo ocorreu com amostras de zooplâncton.

Casos de diarreia humanas na Bahia, após consumo de alimentos marinhos, são comuns e a epidemiologia não é clara, assim como infecção de pele, conjuntivites, otites, após exposição ao ambiente marinho. Apesar destas patologias atingirem todas as classes sociais, os casos não são notificados ao serviço de saúde, não recebendo atenção devida nem da população (graças à crença que “diarreia não é doença” e pode ser curada com chás caseiros) nem dos serviços de saúde, para investigar a etiologia.

Com isso, a epidemiologia de doenças causadas por vibrios na Bahia, à semelhança do que acontece em outras regiões, permanece obscura e sem a devida atenção, e as doenças causadas por estas bactérias tendem a endemização pela presença de toda uma estrutura ambiental facilitadora de sua transmissão, como a falta de saneamento básico no Estado.

### **5.10 Condições de Saneamento Básico no Estado da Bahia e Políticas Públicas locais:**

A maioria das cidades do interior não possui ampla cobertura de água encanada, coleta de lixo nem sistema e tratamento de esgotos (FIGURA 23). A inexistência de sistema de esgoto e tratamento contribui com lançamentos contínuos de efluentes domésticos e hospitalares na correnteza de rios e córregos, arrastando conseqüentemente estes dejetos para áreas remotas da BTS.

O Programa Bahia Azul, do Governo Estadual, propiciou uma significativa melhoria no quadro de saneamento da Bahia, porém não atendeu totalmente às necessidades da região, especialmente pela manutenção de sistemas independentes de esgotos associados a um grande percentual da população que dispõe seus esgotos de forma variada (diretamente no solo, fossas, lançamento em corpos d'água).

Este fato contribui para que peixes e crustáceos, de toda região estudada, possam também estar contaminados com *V. cholerae*, além de outros produtos fartamente coletados e comercializados nestas localidades, devendo ser futuramente objeto de investigação sobre a ocorrência de vibrios.

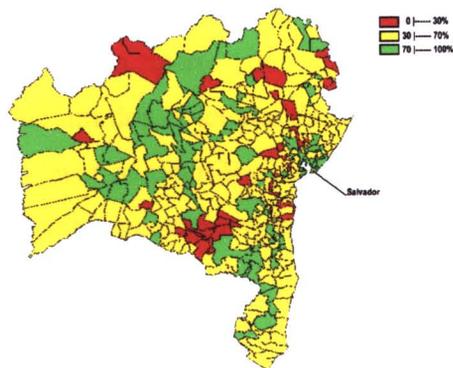
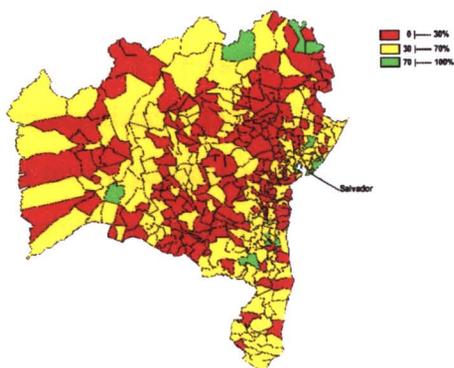
Além das condições de saneamento, oferta de água potável e coleta de lixo no Estado da Bahia serem precárias, as questões relacionadas ao meio ambiente e sua

salubridade, muitas vezes, não são percebidos pela população residente, a qual demonstra apatia e carência de consciência política na luta por seus direitos.

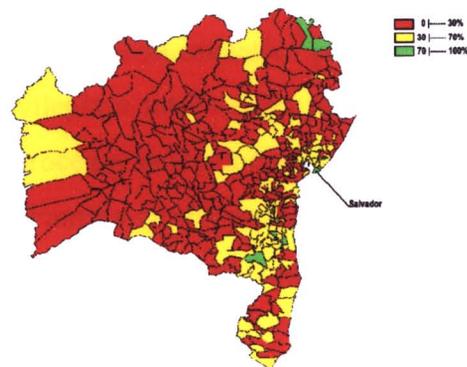
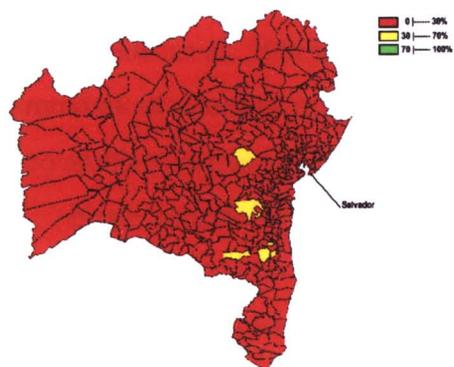
1991

2000

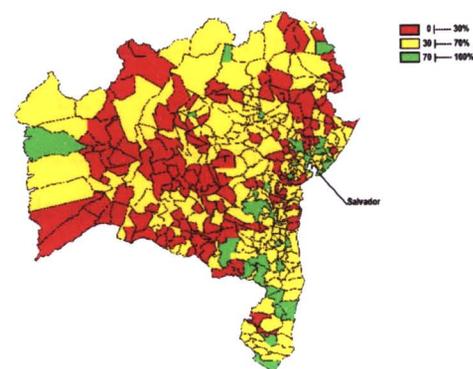
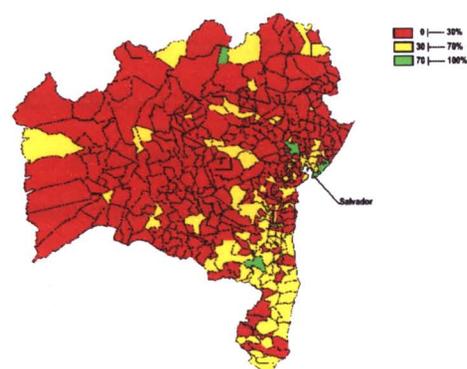
## Abastecimento de Água



## Rede de Esgoto



## Coleta de Lixo



\* Residência ligada à rede pública de água, esgoto e lixo coletado.

FIGURA 23 – Proporção de população atendida por “condições mínimas de água, esgoto e lixo”\*, respectivamente, no Estado da Bahia de acordo com dados dos Censos Populacionais do IBGE de 1991 e 2000.

Políticas públicas no enfrentamento dos problemas de saúde pedem participação popular e podem ser exercidas por vários instrumentos, entre eles a produção e a difusão de idéias e valores, recuperação do conhecimento das sociedades tradicionais, manutenção de um meio ambiente saudável.

Para tanto, exige-se uma reforma no poder de decisão tendo como eixo principal a questão da descentralização, como parte de um processo de democratização (MENDES 1999). Isto porque um dos objetivos da descentralização e a municipalização dos serviços de saúde é levar as decisões para o mais próximo possível dos cidadãos e da sociedade, que participam com os mecanismos de controle social (SILVA FILHO 2000).

Desde 1998 que a Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB) vem promovendo a descentralização das ações de Vigilância à Saúde, objetivando a municipalização das ações de Vigilância e Controle de Doenças no Estado (ANDRADE et al. 2000). Porém, paralelamente a esta iniciativa persiste o modelo curativista de atenção à saúde que não privilegia a intervenção junto a fatores de risco ambientais que venham a interferir no processo saúde-doença.

Neste aspecto, o Programa Saúde da Família (PSF) pode vir a ser um forte aliado na formulação de indicadores de vigilância ambiental para controle e prevenção das gastroenterites e cólera, a partir de programas de educação em saúde e intervenções intradomiciliares para maior proteção da população. Atividades desenvolvidas pelo PSF na região, tais como formação de agentes multiplicadores, educação dos consumidores, dos vendedores e marisqueiras, podem minimizar os riscos tanto ocupacionais como de gastroenterites.

De acordo com a Epidemiologia Clássica, SNOW foi um pioneiro no campo de estudo entre a saúde e as condições de vida de grupos e classes sociais distintas, em Londres, 1849, já realizando naquela época estudos baseados na lógica do espaço. Ainda que estes estudos tivessem seus precursores na antigüidade (com Hipócrates, “Das águas, dos ares, dos lugares”) e fossem sustentados durante os séculos XVII a XIX, com o estabelecimento da Medicina Social, até hoje suas bases teórico-metodológicas na apreensão dos fenômenos de saúde, articulado às questões de cunho ecológico-social-econômico, permanecem válidas.

Mesmo com os avanços das Ciências, para muitos estudiosos, estas áreas são estanques, matérias diferentes e não as consideram como dimensões diferentes de uma mesma totalidade, causando a fragmentação e a descontinuidade de políticas públicas em saúde.

A partir desta premissa, observa-se que a atenção em saúde, no Brasil, perdeu seu compromisso com a prevenção, que é uma das maiores contribuições positivas ao setor saúde, tanto pela preservação da saúde como pela economia de recursos. As ações de prevenção podem ser materializadas através de práticas articuladas e integradas entre o Governo e a sociedade (mobilização e controle social). Por exemplo, as recentes experiências com mobilizações populares requeridas para combate a doenças como o dengue, pela extinção dos criadouros e remoção do lixo, possuíram um imenso valor político, demonstrando que no aspecto da prevenção de doenças e promoção da saúde tem que haver o envolvimento dos diversos segmentos da sociedade, e não apenas o setor saúde e a administração pública.

Dessa forma, com a cólera e as gastroenterites, este mesmo modelo pode ser utilizado, aproveitando-se a experiência de outros programas socialmente construídos de combate a doenças associado a progressos alcançados com o Programa Saúde da Família. As lutas para implementação dos princípios “Saúde para todos” e “Saúde direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução dos riscos de doenças e outros agravos” (BRASIL 1988) permanece e não se esgotará tão cedo. Isto porque uma das maiores frentes de batalha não estão apenas no combate as bactérias, aos vírus ou aos mosquitos, mas sim, às fraudes, ao desvio de recursos destinados à saúde e à privatização do sistema de saúde e previdenciário.

Se para atender às necessidades do povo desta região são destinadas verbas e não há aplicação adequada dos recursos financeiros direcionado às políticas públicas que apontem para a geração de empregos, ao saneamento básico, à prevenção de gastroenterites, à proteção ao meio ambiente, sempre será notificado por outros estudos futuros a ocorrência de vibrios em moluscos bivalves comestíveis, e o cenário epidemiológico para ocorrência de epidemia de cólera e gastroenterite será sempre denunciado e estará sempre presente, condenando já no presente as gerações futuras a doenças ocasionadas por vibrios.

Conseqüentemente, a possibilidade de reversão deste cenário passa obrigatoriamente pela mudança qualitativa e estrutural do sistema público de saúde, não apenas investindo recursos financeiros, mas mudando a lógica.

No caso, o Programa Bahia Azul exemplifica a questão da aplicação do dinheiro público. Orçado em 600 milhões de dólares americanos, este Programa que previa melhoria das condições de saneamento básico de Salvador e região, não solucionou o totalmente o problema. Um dos critérios adotados para priorizar a implantação das bacias coletoras de esgoto, em Salvador, foi o retorno financeiro do investimento (regiões com população residente com maior capacidade de pagamento de tarifas), contrariando o quadro sanitário e de saúde da cidade como um todo, principalmente dos bairros periféricos, onde reside a maior parte da população da cidade e a mais carente. Além disso, as ações do Programa ficaram muito concentradas em Salvador, ocasionando o não atendimento a maior parte das cidades do Recôncavo (<http://www.bahiazul.hpg.ig.com.br/relatorio.html>, acessado em 11/04/03).

Assim, os resultados desta pesquisa mostram o risco a que a população está exposta em contrair doenças provocadas por vîbrios e são apontadas alternativas para prevenção, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida da região. No entanto, a solução para o problema social, que dá suporte a este achado biológico ou estratégias que visem a mudança do perfil sócio-econômico da população, deve ser trabalhada por uma equipe multiprofissional, envolvendo, democraticamente, vários segmentos sociais (intersetorialidade), inclusive a Administração Pública e a participação social.

### **5.11 Análise molecular do genótipo dos vîbrios isolados**

Da coleção de células do gênero *Vibrio* formada foram incluídas nos estudos moleculares apenas as cepas potencialmente patogênicas. Pesquisou-se fatores de virulência para as dezessete cepas *V. cholerae* e polimorfismos genéticos utilizando a técnica ERIC-PCR, para: 17 cepas de *V. cholerae*, 18 de *V. alginolyticus*, 18 de *V. fluvialis*, 42 de *V. parahaemolyticus* e 12 de *V. vulnificus*.

Em função das perdas ocorridas ao longo do processo, houve uma redução do número de amostras, uma vez que só foram utilizados nos testes moleculares amostras de DNA com concentração igual ou superior a 50 ng.

É importante ressaltar que o propósito principal desta etapa de estudo foi de realizar análise intra-específica de bactérias do gênero *Vibrio* com ERIC-PCR, excluindo-se a possibilidade de estudos filogenéticos, os quais requerem maior número de material e exemplares coletados de outras regiões geográficas, além do emprego de outras técnicas moleculares.

### 5.12 Pesquisa dos fatores de virulência em *V. cholerae*:

O DNA das dezessete cepas de *V. cholerae* foi testado para a presença de genes de virulência (FIGURAS 24 a 28). Os resultados quanto à presença/ausência dos fatores de virulência estão expostos na TABELA 4.

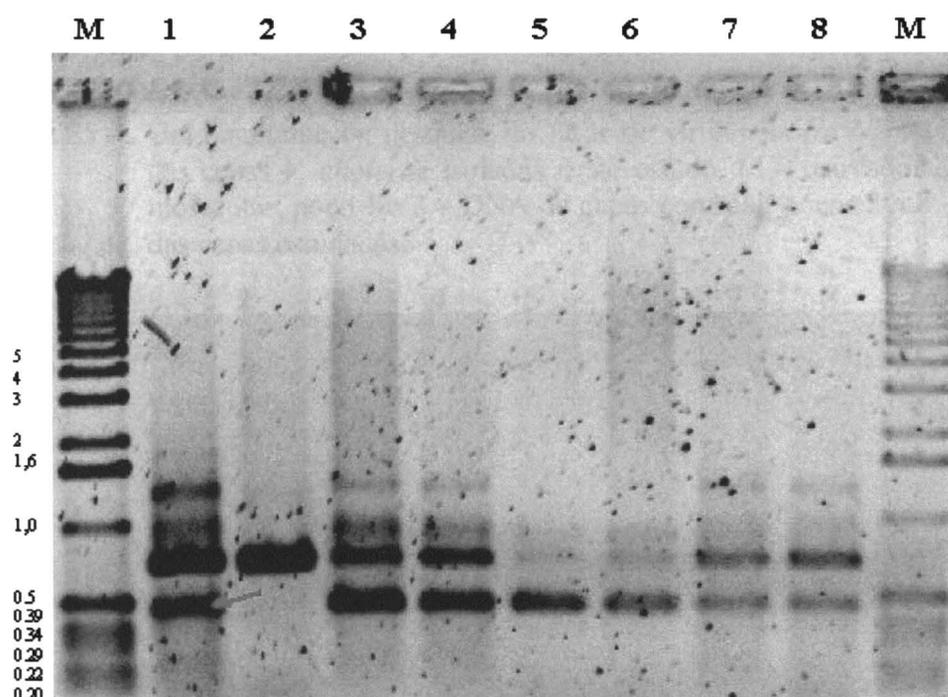


FIGURA 24 – Gel resultante da pesquisa do fator de virulência *hlyA* via PCR das cepas *V. cholerae* isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 – DNA de cepa controle; poços 2 a 8 – DNA das cepas estudadas.

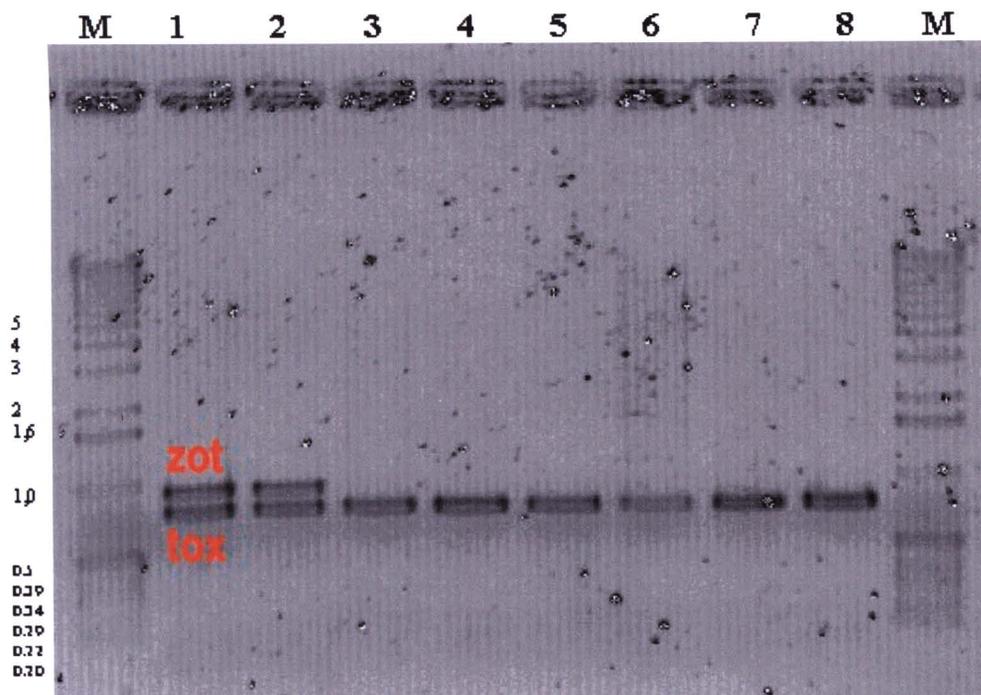


FIGURA 25 – Gel resultante da pesquisa do fator de virulência *toxR/zot* via PCR das cepas *V. cholerae* isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas.

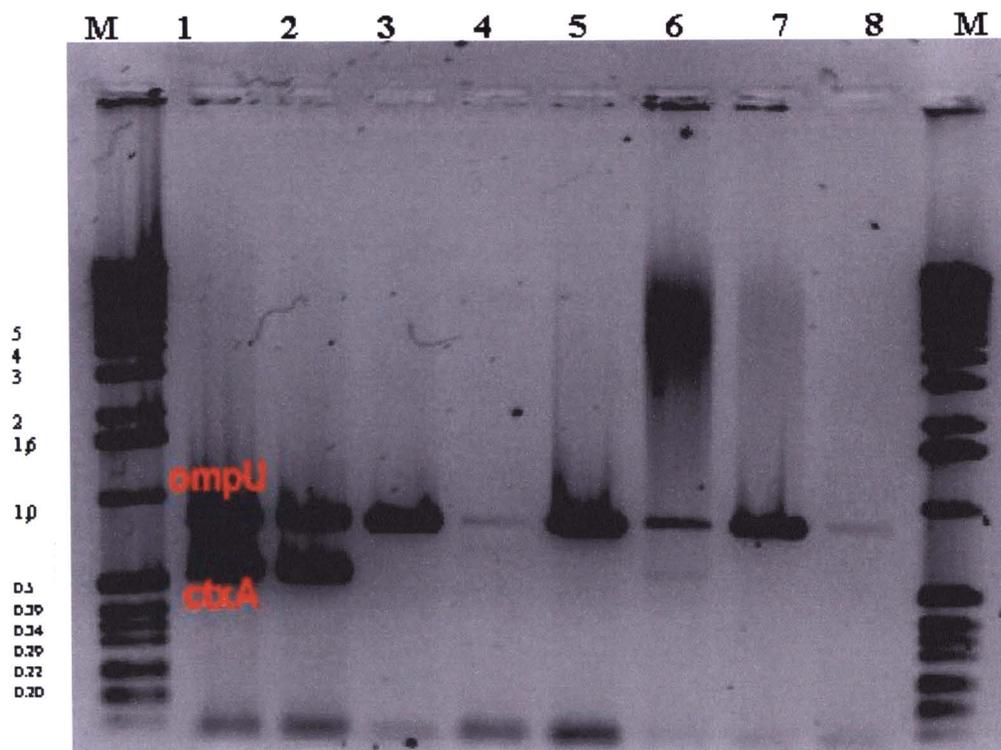


FIGURA 26 – Gel resultante da pesquisa do fator de virulência *ompU/ctxA* via PCR das cepas *V. cholerae* isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas.

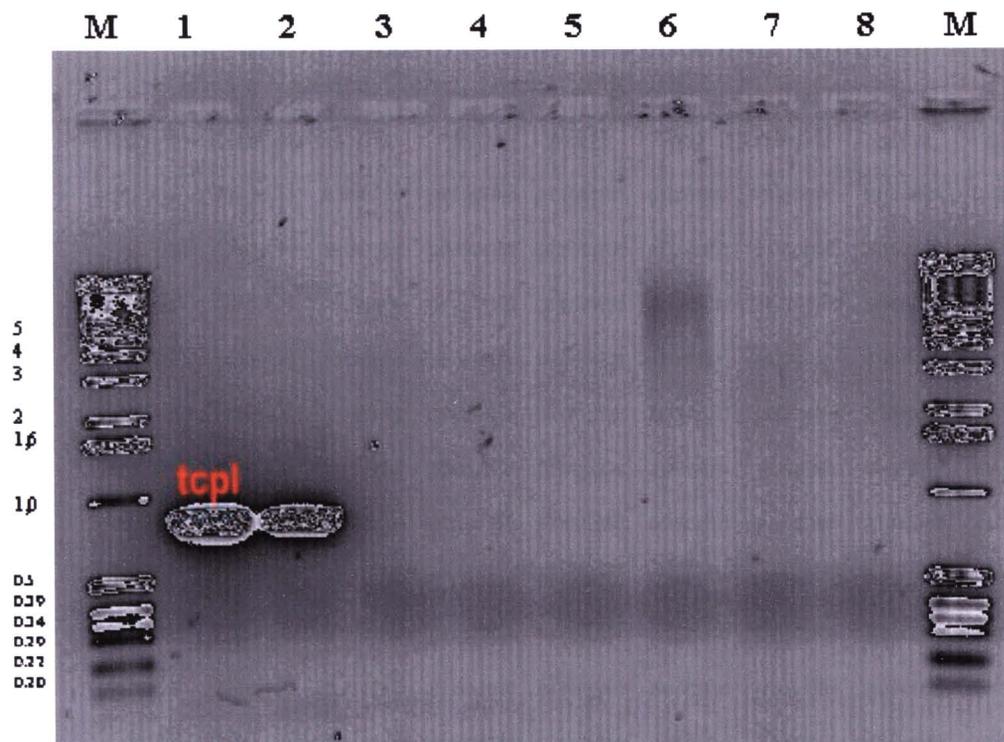


FIGURA 27 – Gel resultante da pesquisa do fator de virulência *tcpI* via PCR das cepas *V. cholerae* isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas.

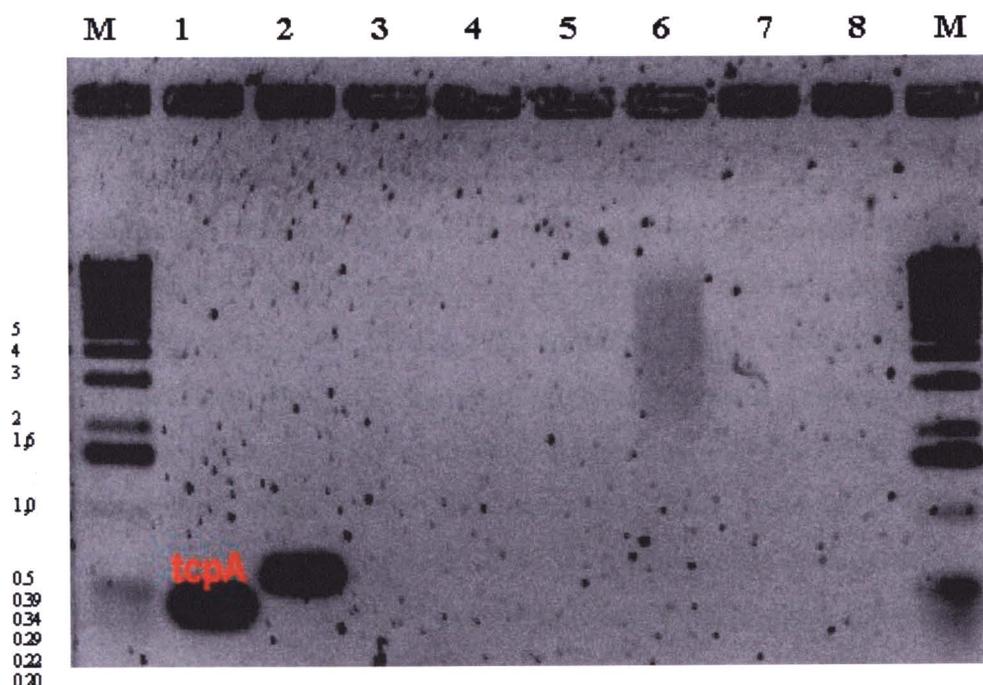


FIGURA 28 – Gel resultante da pesquisa do fator de virulência *tcpA* via PCR das cepas *V. cholerae* isoladas neste estudo. M – marcador de peso molecular; poço 1 e 2 – DNA de cepas controle; poços 3 a 8 – DNA das cepas estudadas.

TABELA 4 – Pesquisa dos fatores de virulência em *Vibrio cholerae* isolados em zooplâncton e moluscos bivalves coletados na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

Cepa	Origem	Biotipo	<i>tcpA</i>	<i>hly</i>	<i>toxR</i>	<i>zot</i>	<i>ompU</i>	<i>ctxA</i>	<i>tcpI</i>
1719	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1720	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1721	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	presente	ausente	ausente
1722	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1723	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	presente	ausente	ausente
1724	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1725	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1726	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	presente	ausente	ausente
1727	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1728	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1729	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
1730	Am. 08	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
2214	Am. 37	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	presente	ausente	ausente
1989	Am. 37	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	presente	ausente	ausente
2179	Am. 37	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	presente	ausente	ausente
112-4	Am. 112	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
112-20	Am. 112	Não-O1	ausente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente

As cepas de *V. cholerae* não-O1 analisadas apresentam perfil semelhante quanto aos fatores de virulência (presença de amplicons *hlyA* e *toxR*, ausência dos demais), exceção apenas para 1721 e 1723 (provenientes de ostra congelada), 2179 (isolada a partir de zooplâncton), que também possuem presença de *ompU*, aparecendo nas linhagens 1726 (de ostra congelada), 2214 e 1989 (isoladas de zooplâncton), sendo todas elas *V. cholerae* não-O1. A linhagem 1719 também provém da mesma amostra que 1722 e 1723, e não possui o fator de virulência *ompU*. Parece que este fenótipo (presença/ausência de *OmpU*) garantiu alguma discriminação entre as três linhagens.

Este quadro demonstra que os genes *ctxA* e *tcpA* estão ausentes em todas as amostras indicando que estas cepas podem ser avirulentas, em termos de capacidade de produção da doença cólera.

Também estão ausentes os genes relacionados à virulência: *zot* e *tcpI*. O gene *ompU* foi encontrado em algumas cepas de uma amostra de ostra congelada, e em outra de zooplâncton. Já os fatores de virulência da hemolisina (*hly*) e *toxR* estão presentes em todas as amostras, confirmando os achados de MATTÉ et al. (1998), RIVERA et al. (2001) e SINGH et al. (2001), sobre a existência destes genes relacionados à virulência em amostras ambientais.

A ocorrência de *V. cholerae* não-O1 ambiental, associado ou não a invertebrados marinhos neste estudo, reforça os achados de MATTÉ et al. (1994), BARROS (2000) e SINGH et al. (2001). Estes autores ainda postulam que *V. cholerae* não-O1 ambiental tem potencial enterotóxico, podendo causar surtos de diarreia.

Nas últimas décadas, estudos envolvendo genética molecular de *V. cholerae* têm sido desenvolvidos objetivando conhecer e distinguir fatores de virulência tanto em amostras clínicas quanto ambientais, dentro dos vários biotipos conhecidos.

Até 1992 acreditava-se que os casos epidêmicos de cólera estavam relacionados apenas ao *V. cholerae* O1, e que as demais eram avirulentas ou causadoras de casos esporádicos de diarreia. Entretanto, o sorotipo O139 foi identificado e relacionado a epidemias em Bangladesh, em 1992, e outros estudos mostraram que haviam casos graves da doença causados por linhagens não-O1 não-O139, mesmo sem causarem epidemia. Por isso, estudos com as cepas em análise que não tiveram biotipo identificado ficam recomendados (EVINS et al. 1995).

Devido à heterogeneidade genética da espécie *V. cholerae* e pela facilidade de mutações do genoma de microrganismos, é possível o surgimento de uma nova linhagem epidêmica, caracterizando a região estudada na Bahia como reservatório de potenciais patógenos.

Estudos epidemiológicos da cólera têm sido limitados em função da semelhança de caracteres fenotípicos das bactérias (IWANAGA et al. 1997). Estas semelhanças também são identificadas em estudos moleculares, como aqueles envolvendo enzimas bacterianas.

Sabe-se que as cepas epidêmicas secretam a toxina colérica (CT) que é codificada pelos genes *ctxAB* carregados num fago filamentoso (CTXphi) (vide Introdução). Nas cepas estudadas, o gene *ctxA* estava ausente, ou seja, não possuem o cassete de virulência completo. Na eventualidade da ocorrência de casos de cólera na região estes provavelmente serão de origem importada.

Mesmo sem o cassete de virulência completo, estas cepas estão circulando no ambiente e entrando na cadeia alimentar humana via moluscos bivalves. Aliado a falta de esgotos e tratamento dos que existem, fortalecida por acontecimentos climáticos como *El Niño*, são condições ideais para multiplicação do *V. cholerae*. Para que seja reduzido o risco de ocorrência de uma nova epidemia na região, será necessário adoção de medidas relativas a segurança alimentar e ao saneamento.

Além dos fenômenos climáticos que podem favorecer a eclosão de um surto e/ou epidemia de gastroenterite, um fator colaborativo para aumento da diversidade de bactérias, não só do gênero *Vibrio* na região litorânea estudada, pode ser o despejo de águas de lastro de navios, uma vez que se trata de região portuária, para onde fluem diversos navios cargueiros de várias partes do mundo, introduzindo bactérias alóctones no ambiente.

Apesar das cepas de *Vibrio cholerae* não-O1 não-O139 isoladas não estarem relacionadas a epidemias até o momento, o reconhecimento da possibilidade de transferência horizontal de genes remete a possibilidade de conversão de cepas não-patogênicas em cepas patogênicas responsáveis por diversas doenças em humanos, caracterizando a possibilidade constante da emergência de patógenos.

Outro aspecto importante a ser enfatizado é quanto a importância da ferramenta molecular utilizada. A técnica PCR mostrou-se sensível e eficaz para distinção de sorotipos de *V. cholerae*. Paralelamente, esta mesma técnica permitiu detectar genes de virulência em *V. cholerae*, partindo de amostras de alimentos e ambientais, semelhante as conclusões de HERVIO-HEATH et al. (2002).

Diante do exposto até então, fica claro que o consumo não só de moluscos bivalves, mas de todos os seres vivos comestíveis componentes das cadeias alimentares aquáticas da região (preparados em condições de higiene precária, mal cozidos ou crus) expõe a população ao risco de contrair diarreia possibilitando surtos contínuos de gastroenterite na região.

### 5.13 Caracterização genotípica de *Vibrio spp* por ERIC-PCR:

A caracterização molecular intraespecífica foi feita utilizando-se a técnica ERIC-PCR, anteriormente descrita, a qual amplificou um conjunto de fragmentos de DNA tendo como molde o DNA genômico das bactérias aqui analisadas. Esta amplificação visa observar a variação na organização do genoma. Estas variações intraespecíficas levam a modificações no conjunto de fragmentos amplificados, podendo-se, desta forma, estudar a diversidade genética na coleção de víbrios.

Cento e sete cepas, sendo, 17 cepas de *V. cholerae*, 18 de *V. alginolyticus*, 18 de *V. fluvialis*, 42 de *V. parahaemolyticus* e 12 de *V. vulnificus* foram investigadas para análise da presença das seqüências ERIC (FIGURAS 29 a 33).

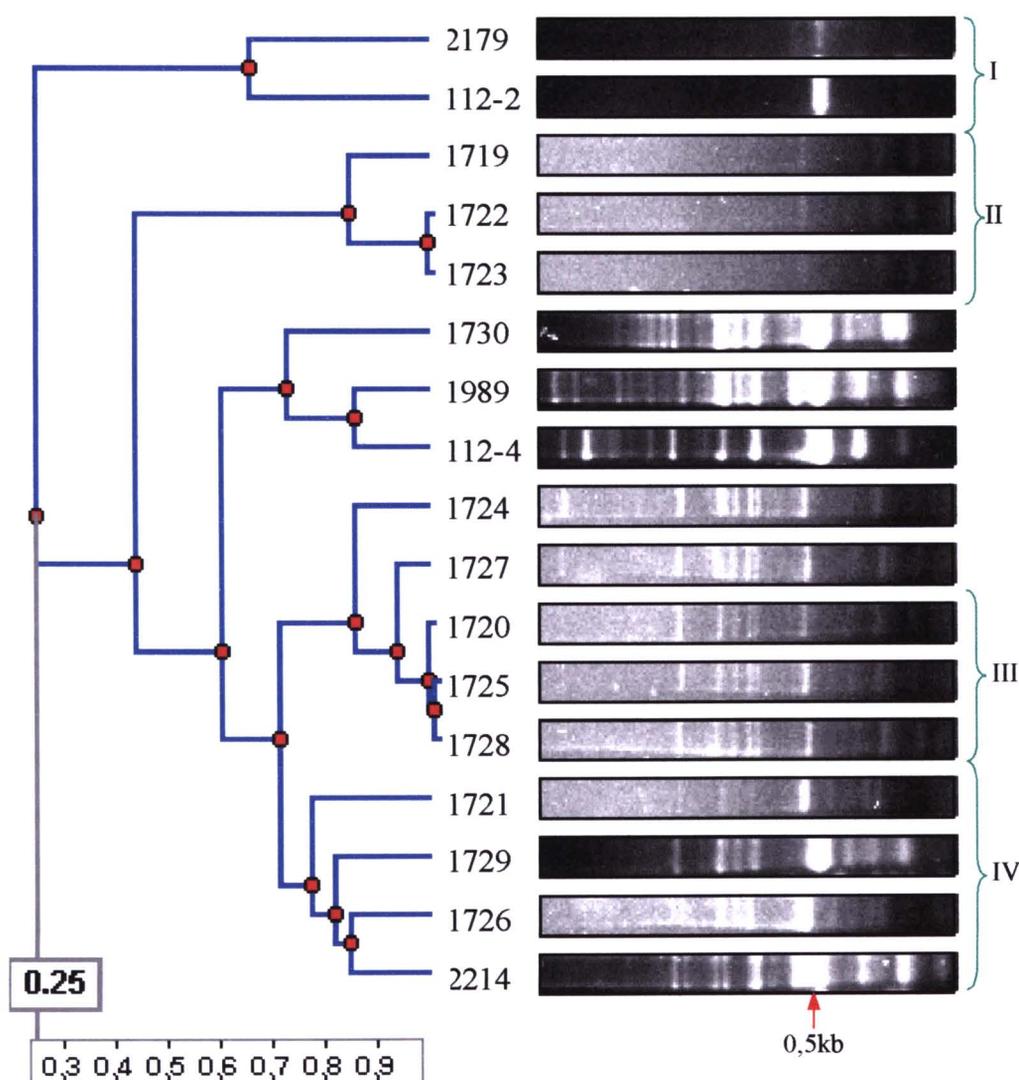


FIGURA 29 – Dendrograma de similaridade entre cepas de *V. cholerae*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002.

Os dendrogramas foram produzidos baseados nas análises de seqüências ERIC. As distâncias e os agrupamentos foram determinados utilizando o coeficiente de DICE e o algoritmo UPGMA.

O “fingerprinting” do DNA das cepas de *V. cholerae* isolados gerados por amplificação via ERIC-PCR. O dendrograma revela grupos formados a partir de coeficiente de similaridade pouco maior do que 0,4, sendo um deles mais numeroso e contendo três grupos de cepas mais semelhantes (grupos II, III e IV).

Quatro bandas foram mais freqüentes nas 17 amostras, dentro da faixa de tamanho entre 1,6 a 0,29 kb, conforme pode ser verificado na FIGURA 29.

A banda próxima a 0,5 kb foi encontrada em todas as amostras, confirmando os achados de RIVERA (1995) e SINGH et al. (2001), ratificando assim estes microrganismos como *V. cholerae*, seguida pela banda 0,29 kb, a segunda mais freqüente entre todas, independente do local de origem dos moluscos bivalves. Esta última banda só esteve ausente nas cepas 2179 (amostra de zooplâncton) e 112-20 (amostra de sururu temperatura ambiente). Outra banda bem representada foi aquela próxima a 1,0 kb, com ausências nas cepas 2179, 112-20, 1719, 1722 e 1723, estas três últimas provenientes da mesma amostra de ostra congelada.

É possível deduzir que as amostras 1722 e 1723 (grupo II) são altamente similares e a distância entre estas parece ser pouco significativa (similaridade >0,9). Observando o dendrograma, constata-se que as cepas do grupo III apresentam perfil semelhante (similaridade >0,9), e, no grupo IV, o perfil também é bastante similar especialmente entre as bandas de 5 e 0,5kb.

Por todo o dendrograma, as demais linhagens não se agrupam mais próximas uma da outra, sendo exceção apenas entre e as cepas 1725 e 1728 que parecem ser similares. Fato semelhante ocorre entre as cepas 2179 e 112-20, que são similares, diferenciando-se apenas pela presença de *ompU* em 2179.

Os achados de RIVERA et al. (2001) reforçam estas informações aqui prestadas, mostrando que realmente tanto o *V. cholerae* O139 como o *V. cholerae* não-O1 têm seu genoma mais diversificado e, por isso, maior diversidade de representantes. Entretanto, estudos moleculares realizados com cepas obtidas em períodos epidêmicos, comprovaram que estas são todas idênticas, ou seja, provenientes de um mesmo clone (SINGH et al. 2001).

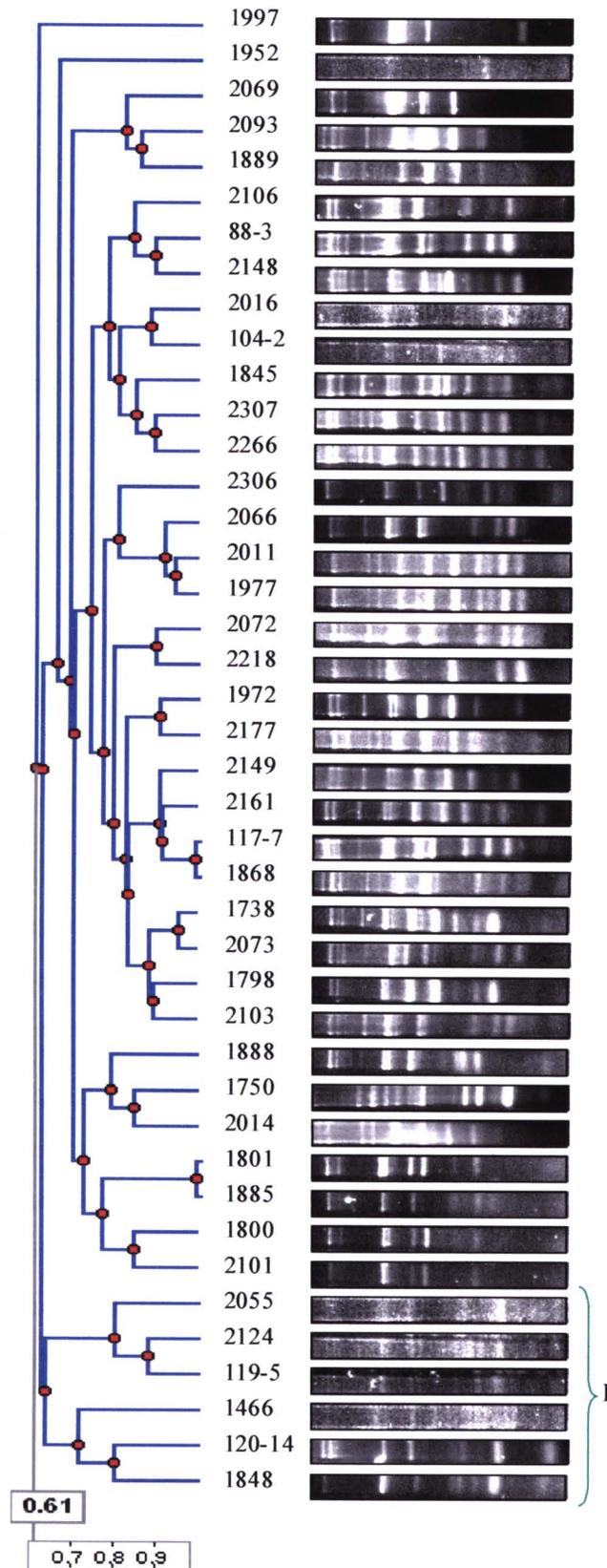


FIGURA 30 – Dendrograma de similaridade entre cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002.

Nos perfis de *V. parahaemolyticus* analisados (FIGURA 30), a similaridade marcante esteve presente em seis bandas exibidas pelos 42 perfis analisados, sendo elas: a próxima de 0,39 kb; 0,5 kb; outra entre 0,5 e 1,0 kb; 1,0 kb; 1,6 kb e, 3,0 kb. Nas demais cepas era verificada a similaridade dos perfis ou a presença/ausência das bandas acima citadas. A partir do coeficiente de similaridade  $>0,6$  foram estudadas as cepas do grupo I, em função deste padrão ERIC, pela presença das seis bandas analisadas.

A relativa diversidade observada talvez se dê pelo maior número de linhagens utilizadas entre os outros vibrios estudados, e pela ampla distribuição na região da costa baiana, onde estas bactérias podem estar sujeitas a diversos processos de recombinação, variando o genoma. Isto é corroborado pelo fato de que várias linhagens de *V. parahaemolyticus* identificados por provas bioquímicas, exibiram padrão de amplificação diferentes, possivelmente em função da diversidade de locais origem das amostras e diferentes substratos, reforçando a tese da ampla distribuição destes vibrios. Para maiores esclarecimentos, estes vibrios deverão ser estudados mais detalhadamente no futuro.

No dendrograma associado ao gel ERIC-PCR de *V. vulnificus* (FIGURA 31), obteve-se uma menor diversidade de arranjos genéticos com padrão de bandas similares nas cepas estudadas. Apenas a amostra 1824, de lambreta, isolada na concha originária de Valença, distanciou-se das demais.

Existem duas hipóteses relacionadas a infecções humanas por *V. vulnificus*: as infecções são causadas por uma população diversificada de *V. vulnificus* ou apenas algumas cepas são patogênicas (BUCHRIESER et al. 1995). Como há muito interesse em Saúde Pública com relação a estes patógenos e poucos estudos moleculares com estes, a construção do dendrograma se deu a título de provocar o debate em torno do tema e contribuir com alguma informação para subsidiar estudos vindouros.

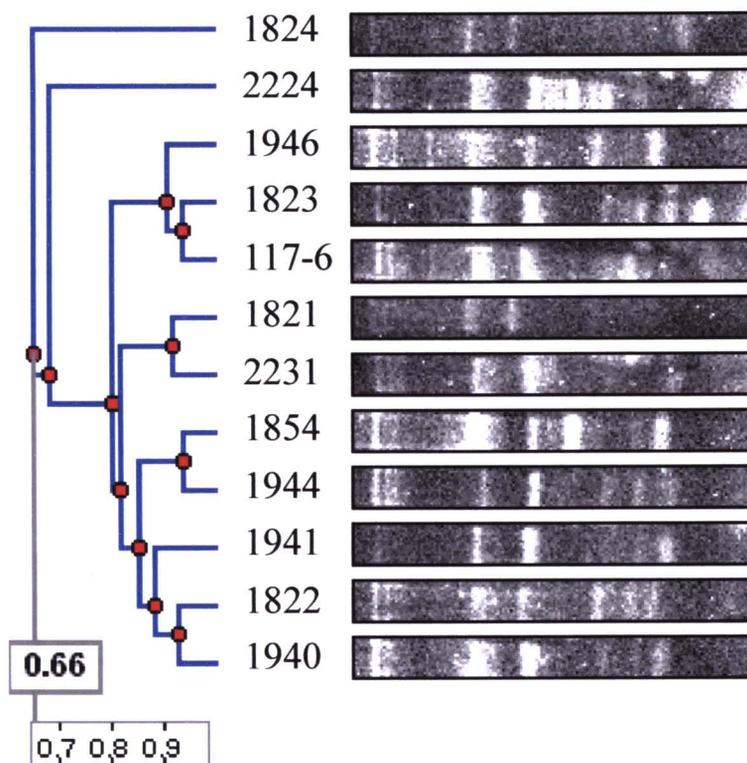


FIGURA 31 - Dendrograma de similaridade entre cepas de *V. vulnificus*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença - Bahia, Brasil - 2000-2002.

A similaridade entre as linhagens de *V. alginolyticus*, exibida no dendrograma (FIGURA 32), mostra dois agrupamentos diferentes, sendo o grupo I formado por cepas de perfil muito similar.

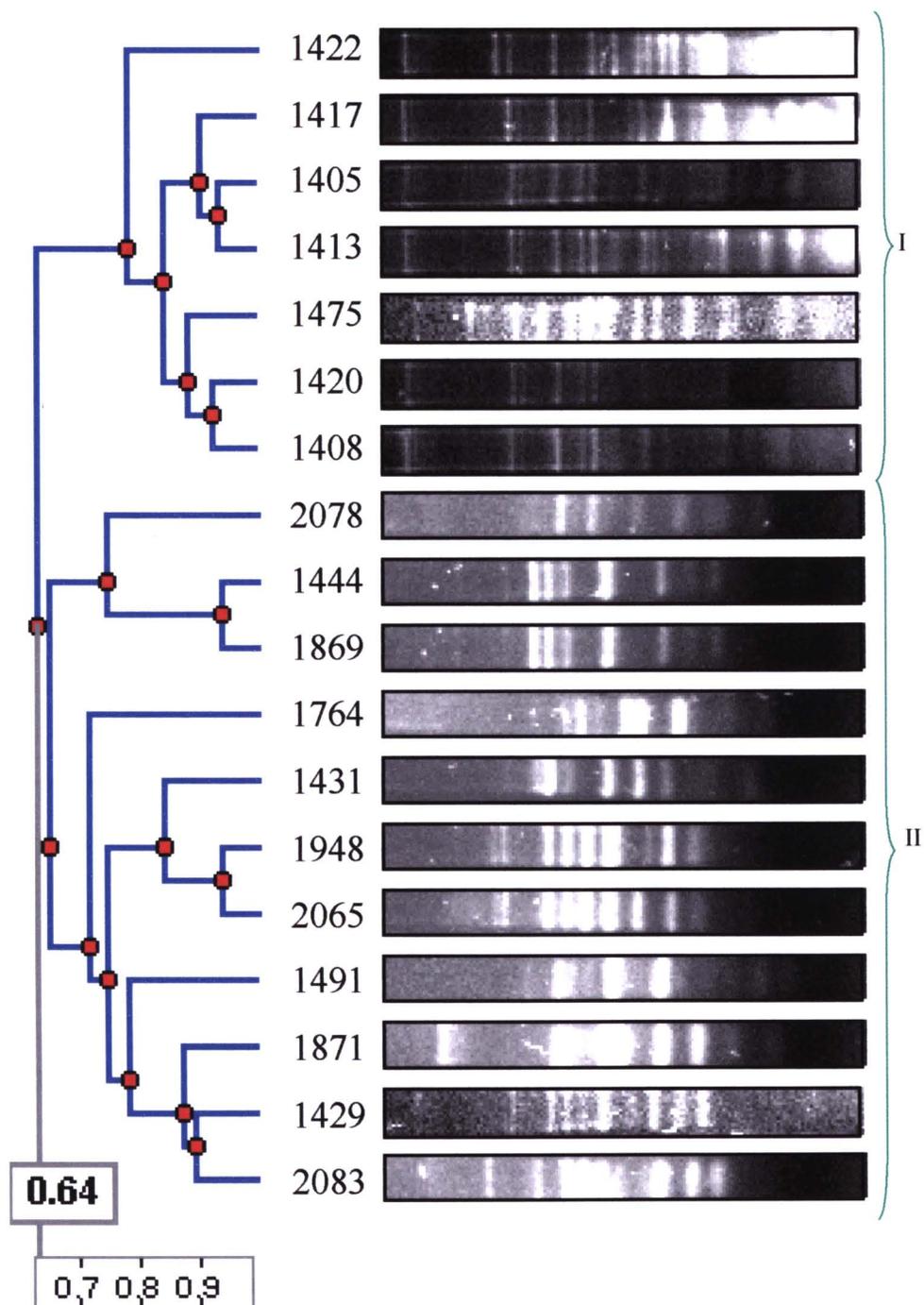


FIGURA 32 – Dendrograma de similaridade entre cepas de *V. alginolyticus*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002.

Com o *V. fluviatilis* (FIGURA 33), a semelhança genética parece ser maior (0,6 de similaridade) em função de toda chave partir de um único ponto e se ramificar em dois grupos com número relativamente igual de elementos, apresentando, assim, menor variabilidade ( $\sim 0,7$ ) genética em relação às outras espécies estudadas.

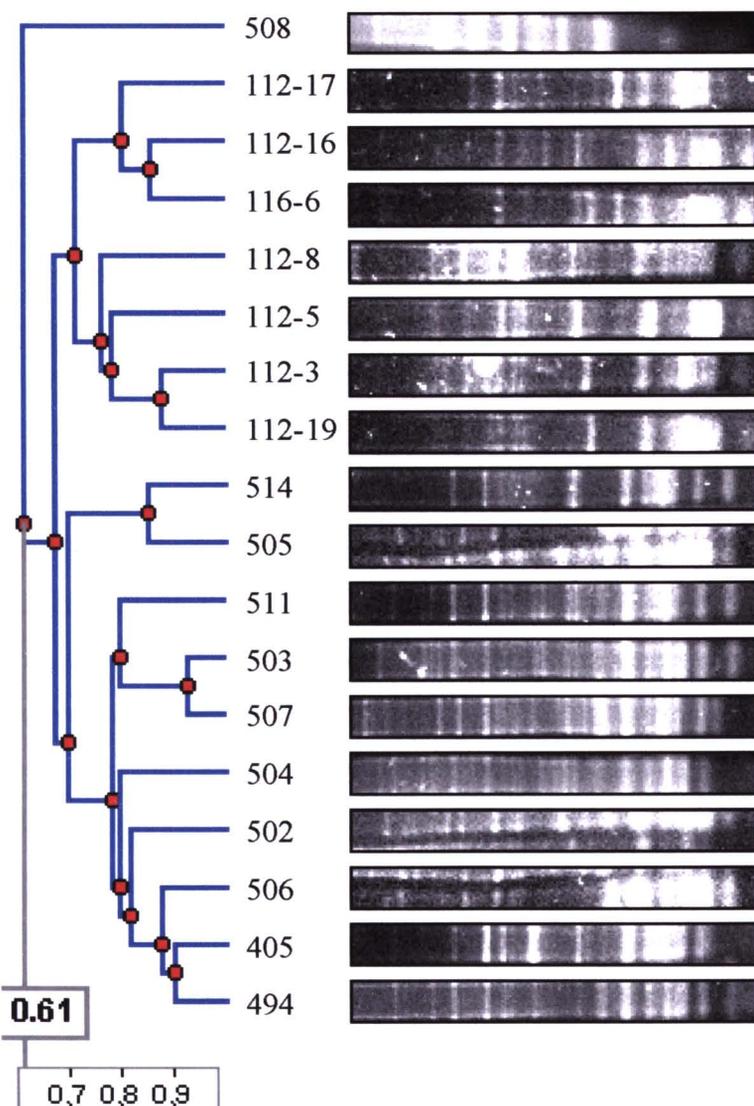


FIGURA 33 – Dendrograma de similaridade entre cepas de *V. fluvialis*, isoladas na Baía de Todos os Santos e Valença – Bahia, Brasil – 2000-2002.

A análise dos dendrogramas (FIGURAS 31, 32 e 33), de uma forma geral, indica que os isolados apresentam uma substancial heterogeneidade genética mesmo entre cepas da mesma espécie isoladas de substratos diferentes ainda que originários da mesma localidade, assim como entre cepas da mesma espécie isoladas do mesmo substrato originários de diferentes localidades.

É provável que esta diversidade de vibrios seja decorrente de coevolução, e, partindo-se desta hipótese, estes resultados podem auxiliar estudos futuros no tocante aos aspectos da história evolutiva, distribuição geográfica e epidemiologia molecular do gênero *Vibrio*, em nível global.

Diante da quase inexistência de trabalhos envolvendo Biologia Molecular de *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* e *V. fluvialis*, não foi possível a utilização de parâmetros para a validação dos resultados ficando estes como uma contribuição inicial para estudos futuros.

Verifica-se também, através dos dendrogramas, a existência de seqüências ERIC revelando a possibilidade de sua utilização nos estudos ecológicos e epidemiológicos, para análise de diversidade, baseado no poder discriminativo desta técnica e a partir daí criado um banco de dados que complementa a coleção.

Pode-se, portanto, considerá-la como ferramenta auxiliar para estudos de epidemiologia molecular, principalmente em épocas de surtos e epidemias, uma vez que torna possível análise da dinâmica de populações microbianas e sua distribuição geográfica através da pesquisa molecular, via análise do perfil genético permitindo esclarecer quanto a diversidade em função das diferentes arranjos do genoma.

No entanto, para as cepas de *V. cholerae*, dada a existência de casos por todo mundo e o interesse em saúde pública, especialmente em épocas de epidemias, outras técnicas moleculares mais esclarecedoras, como a eletroforese em campo pulsado (PFGE), podem ser utilizadas a exemplo dos trabalhos de CAMERON et al. (1994), DALSGAARD et al. (1997 e 1998) e ARAKAWA et al. (2000).

Assim, este estudo pretendeu contribuir na demonstração da viabilidade e confiabilidade advindas dos métodos genotípicos, que incorporados às práticas de Vigilância podem ser aplicadas para identificação de patógenos, especialmente de vibrios, não pressupondo, com isso, que as técnicas moleculares poderão substituir as metodologias clássicas da Microbiologia. Porém, as análises possíveis de serem feitas, utilizando Biologia Molecular, representam uma alternativa segura, rápida e eficaz para estudos de identificação e similaridade genética de microrganismos (SILVEIRA 2000).

A partir destes resultados, outros estudos envolvendo Epidemiologia Molecular de vibrios poderão e deverão ser feitos, uma vez que já se dispõem de dados de perfis genotípicos das bactérias. Congregando conhecimentos da Epidemiologia Clássica e Biologia Molecular, ante a notificação de alguns casos de gastroenterite, será possível o cruzamento destes dados antecipando a ocorrência de surtos.

## 5.14 Considerações Finais

Os moluscos bivalves, utilizados nesta pesquisa, foram em sua maior parte adquiridos em feiras-livres onde o maior volume comercial no varejo ocorre. O produto é exposto sem refrigeração adequada facilitando a proliferação bacteriana, uma vez que a temperatura é o principal fator que influi no crescimento de microrganismos em alimentos. Por isto, estas amostras estavam mais comprometidas quanto à presença de vibrio potencialmente patogênicos em relação àquelas congeladas.

No Brasil, há predominância do clima tropical (as temperaturas médias anuais, na região estudada, variam entre 24°C e 35°C), com umidade relativa do ar alta, propiciando as condições ideais para decomposição dos alimentos armazenados de forma inadequada (CHESCA et al. 2001). No caso dos moluscos bivalves, têm-se este fator aliado ao fato de que são processados sem controle higiênico e sem obedecer ao tempo de fervura e resfriamento necessários para eliminação dos microrganismos.

As convenções internacionais para estabelecimento das condições higiênico-sanitárias dos moluscos bivalves têm, como parâmetro, microbiológico a contagem total de bactérias mesófilas (contagem padrão), os coliformes totais e fecais e/ou *Escherichia coli* e as bactérias patogênicas, em especial as do gênero *Salmonella*.

No Canadá, Alemanha, Japão, Coréia e alguns estados dos Estados Unidos da América, o serviço de Vigilância Sanitária tolera uma contagem padrão em placas de até 500.000 bactérias mesófilas/g de molusco. No Brasil, a Resolução RDC n.º 12 de 02 de Janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), limita, para moluscos bivalves in natura, resfriados ou congelados, em  $5 \times 10^3$  para estafilococos coagulase positiva/g (BRASIL – ANVISA RDC 12/2001). Para WOOD (1979), os índices estabelecidos pela APHA são mais rigorosos, limitando os valores em 230 NMP de coliformes fecais/100g do produto.

Entretanto para a APHA (1992), este tipo de análise deve ser utilizada apenas como auxiliar sendo considerada empírica para determinação da densidade da população bacteriana, pois não produz resultados confiáveis, uma vez que esta pode se distribuir de forma variável: em indivíduos isolados, em cachos, em cadeias, e conseqüentemente, o número de colônias que se desenvolve, por ml da amostra, pode ser inferior ao real número de células.

O rebaixamento da temperatura dos alimentos perecíveis ao nível compatível com sua natureza, pode inibir ou destruir a atividade enzimática própria, aumentando o prazo de vida comercial. A temperatura baixa também contribui para controle das infecções ou toxi-infecções veiculadas por alimentos. Isto porque há inibição do crescimento de agentes microbianos a 4°C ou menos.

Porém, para cada microrganismo, existe uma temperatura mínima, ótima e máxima, em relação ao seu crescimento (CHESCA et al. 2001).

Se os cuidados na manipulação da matéria-prima e processamento devem ser obedecidos no sentido de se evitar que o produto se exponha à temperatura ambiente alta, maior cuidado deve se tomado nas fases de transporte, distribuição e comercialização, pois nestas etapas os alimentos estão expostos e vulneráveis às alterações provocadas por bactérias, enzimas e transformações bioquímicas, especialmente, em se tratando de pescados (PANETTA 1998).

As maiores alterações são verificadas na distribuição e comercialização no varejo, ainda que estas estejam sob temperatura baixa, pois a sobrecarga da temperatura ambiente atua sobre a eficiência das máquinas de refrigeração. Assim, a comercialização de alimentos nas feiras-livres, por ambulantes, deve merecer especial atenção das autoridades sanitárias, uma vez que se convertem em pontos críticos de dispersão de bactérias patogênicas ao homem.

Segundo BOURGEOIS et al. (1994), o congelamento não produz um efeito bactericida, ainda que reduza um pouco a população microbiana inicial. Corroborando com esta afirmação, para HAYES (1993), o congelamento mais próximo a 0°C é mais letal às bactérias que temperaturas mais baixas de congelamento, como -15°C e -20°C. As bactérias Gram negativas são sensíveis ao armazenamento à temperatura de -18°C por pelo menos seis semanas.

Durante a coleta de moluscos bivalves em feiras-livres, ficou constatado que o uso da caixa de isopor, ainda que contendo gelo seja em escamas ou blocos, é ineficiente para conservação da temperatura de congelamento dos produtos, pelo aparecimento de pacotes parcialmente congelados ou apenas resfriados o que contraria a regulamentação federal (BRASIL – ANVISA RDC 12/2001) que prevê que estes produtos devem permanecer a temperaturas iguais ou inferiores a -20°C, por todo tempo de estocagem até o momento do preparo.

Com o clima tropical, as altas temperaturas registradas durante o verão baiano mais o percurso entre o local de mariscagem e o ponto de venda, a vulnerabilidade do produto à multiplicação bacteriana é evidente, sejam estas bactérias envolvidas com a deterioração do produto ou doenças humanas; ou ainda, a presença de outros patógenos oportunistas, como vírus da hepatite A.

Ainda com a ineficácia da caixa de isopor como mecanismo que garanta refrigeração e conservação do produto, soma-se o fato que a título de atrair o comprador, a maioria dos vendedores observados expõe sua mercadoria fora destas caixas, por horas, permitindo que eles atinjam temperaturas próximas a ambiente.

Por outro lado, a simples interdição pela fiscalização sanitária de moluscos bivalves na concha ou processados comercializados de forma inadequada, sem uma ação educativa não resolve o problema e atinge apenas a população coletora.

Além da desinformação sobre normas técnicas referentes à coleta, processamento e armazenamento dos moluscos bivalves, a atividade de mariscagem expõem esta população à riscos. A coleta, principalmente de moluscos bivalves em praias e regiões de manguezal, pode se constituir em atividade insalubre, os quais vão desde as próprias condições do local de coleta (próximo a esgotos, presença de cacos de vidro escondidos no lamaçal, etc.) como ao tempo de atividade laboral. Além disso, há alguns relatos na literatura sobre acidentes com instrumental de trabalho e cortes com conchas de moluscos, durante a coleta e o processamento destes, envolvendo vibrios. FRANCO e LANDGRAF (1999) relatam infecções com necrose em humanos provocadas por ferimentos com utensílios ou conchas durante a limpeza de mariscos, estando evolvido, provavelmente, o *V. vulnificus*.

As mulheres marisqueiras observadas possuem cicatrizes superficiais e profundas nos membros inferiores e superiores, em função da atividade de coleta e processamento. Algumas exibem pequenas mutilações nas mãos (ausência de falanges, por exemplo) oriundas, segundo elas, de infecções decorrentes dos cortes com conchas e/ou instrumentos de trabalho, tanto na coleta como no processamento.

As populações humanas que desde a época colonial, foram se assentando desordenadamente nas margens dos rios que desembocam na BTS, nas suas praias e manguezais, causaram desequilíbrios de toda ordem, desde a deposição de resíduos

sólidos e líquidos poluição por lixo e esgotos domésticos, respectivamente, até devastação da fauna e flora nativas.

Esta devastação tem vínculos com o intenso e ininterrupto extrativismo de seus recursos naturais, ao longo dos anos, os quais propiciavam vantagens econômicas aos coletores, seja pela venda direta dos recursos (madeira, por exemplo) como pela retirada de vegetação nativa para pasto do gado bovino ou monocultura da cana-de-açúcar, que são atividades mantidas há mais de 450 anos. Por outro lado, com a intensa industrialização química e petroquímica, na região, não houve preservação de suas águas, e essa coleção foi depositária de esgotos domésticos, dejetos industriais sem prévio tratamento. Esse conjunto de fatores coloca em risco direta ou indiretamente a saúde de milhares de pessoas pelo consumo de peixes, crustáceos e moluscos bivalves oriundos destes locais.

Os locais de mariscagem na BTS e Valença são as praias, os estuários e os manguezais. Os moluscos bivalves são encontrados enterrados na lama ou areia, aderido a raízes ou rochas, a depender da espécie. Como as larvas são trazidas e levadas pelo fluxo das marés, este hidrodinamismo propicia aos moluscos, além de grande dispersão nas regiões litorâneas, uma renovação constante do “pool” gênico das espécies. Isto garante processos de adaptação dessas espécies a diversos ambientes, inclusive os mais impactados e com isso, garantia da perenidade dos bancos naturais (PESO-AGUIAR 1993).

A colonização/sobrevivência dos moluscos bivalves, nestes ambientes eutrofizados, está em função da presença de matéria orgânica, sendo até, algumas espécies, adaptadas à digestão de petróleo. Logo, em locais de abundância de matéria orgânica, como os manguezais ou próximos a locais de lançamentos de esgotos, há favorecimento do crescimento e engorda destes animais aumentando sua densidade, abalando a hipótese de sua provável extinção ou esgotamento de bancos naturais. Por outro lado, estes locais tornam-se preferenciais para coleta pelas marisqueiras pela larga endemicidade das suas populações, mas seu consumo por humanos é revestido de um grande risco, em função do acúmulo de bactérias patogênicas, vírus ou poluentes químicos.

Como observado, o extrativismo de moluscos bivalves na região é ininterrupta. Os catadores de moluscos bivalves ao encontrarem conchas muito pequenas, estas são abandonadas para que “cresçam”, devido ao baixo valor econômico.

Observou-se que, pela quantidade de mercadoria oferecida para a venda, em feiras-livres, a melhor época para mariscagem, em função do número de indivíduos por espécie encontrados vai de janeiro a março (verão) e a pior, talvez pela escassez dos animais ou pelas condições climáticas adversas (chuvas constantes e temperaturas mais frias), é durante maio a agosto (inverno). Entretanto, estudos realizados com vendedores de mariscos de feiras-livres de Salvador sobre o período de maior abundância na oferta dos moluscos à população, a maioria dos entrevistados (68,75%) afirmaram que não existe flutuação na oferta (CARROZZO 1994).

O extrativismo de moluscos bivalves inclui problemas ecológicos, sociais e de saúde pública, cuja solução pode estar, em um de seus aspectos, no mercado. A economia informal encontra-se em plena expansão, no Brasil, de maneira desordenada, representando os efeitos perversos do modelo econômico neoliberal. Esses efeitos são efetivados nos grupos menos favorecidos, especialmente entre coletores de moluscos bivalves, pois, mesmo com a escassez dos produtos em seus bancos naturais, em algumas épocas do ano, a mariscagem continua, em locais inadequados e poluídos, diminuindo porém a oferta em termos de quantidade e variedade de espécies nos mercados públicos e feiras-livres. A constante oferta só acontece porque há comprador para os produtos, que desconhece, principalmente os riscos oferecidos pelo consumo destes alimentos.

Assim, ainda que este estudo não tenha sido feito em função da sazonalidade, ressalta-se, pelos resultados, que o risco de infecções por exposição a moluscos bivalves contaminados por vibrios potencialmente patogênicos independe da época do ano.

Continuando a busca de informações sobre volume de oferta de produtos, observou-se, nas localidades visitadas ao longo de toda BTS, que as marisqueiras atribuíram “à maré” a abundância dos moluscos, especialmente ao que elas chamam “maré grande” (sizígia), quando ocorre maior amplitude da baixa mar, aumentando o tempo de exposição da área de captura. Logo, outra forma de buscar soluções para o

problema seria a gestão ecológica, através do manejo sustentado dos bancos naturais de moluscos bivalves, através da coleta controlada e mais humanizada.

A mariscagem pode ser considerada uma atividade socialmente injusta, pois, além da interferência dos intermediários ou atravessadores no preço da mercadoria, submete suas praticantes a horas de trabalho sem descanso e exposição a riscos ocupacionais, muito embora seja uma atividade economicamente viável.

O comércio de ostras no Brasil movimentava US\$ 3,2 milhões/ano (GAZETA MERCANTIL 2001). A produção em larga escala ganhou impulso no sul do país, especialmente em Santa Catarina, onde a produção de cultivo passou de 100 mil dúzias de ostras em 1989 para quase 1 milhão de dúzias em 2000. Neste Estado brasileiro, o cultivo e o processamento deixaram de ser artesanais.

A feira-livre é uma prática antiga de comercialização de alimentos que sobrevive na população devido à crença de que os alimentos ali comercializados são mais baratos, têm mais qualidade, menos ou nenhum produto químico ou agrotóxico e são frescos. Esta ilusão permanece no tocante aos moluscos comercializados, especialmente pela imagem de “produto natural e fresco” que é passada para o consumidor em função do modo rústico de produção.

A quase inexistência de trabalho formal na região que atenda às populações de baixa renda tem levado a população a buscar alternativas econômicas de subsistência, entre as quais o comércio informal de venda de gêneros alimentícios semiprontos ou prontos para consumo em feiras-livres, vias públicas, mercados públicos e em casa. Neste tipo de comércio, as deficiências nas condições higiênico-sanitárias são evidentes. Por isso, a contribuição destes alimentos, quando consumidos, para eclosão de surtos de infecções e toxi-infecções alimentares, é grande.

Os resultados laboratoriais devem ser entendidos dentro de um contexto que é o de prevenção de riscos, os quais podem auxiliar a nortear políticas públicas. Estas devem ser trabalhadas de forma multisetorial e transdisciplinar, uma vez que há todo um contexto sócio-político-ambiental a ser considerado. Assim, a discussão das estratégias, para redução de riscos e agravos na população exposta, envolve a questão social associada aos resultados deste estudo, os quais podem nortear políticas públicas regionais, que devem como compromisso primordial melhorar a qualidade

de vida do povo, e não gerar exclusão, desemprego, agudizando a situação de pobreza e acirramento das desigualdades sociais, uma marca na região desde a época colonial.

Lançamentos de esgotos e diversos acidentes, com derramamento de petróleo e solventes químicos, já ocorreram na área da BTS, causando desequilíbrios ecológicos, mortalidade de peixes e contaminação de moluscos bivalves.

Para minimizar o problema, especialmente na questão dos lançamentos de esgotos, a execução de um plano de gerenciamento da região costeira no Estado com a delimitação de áreas promissoras a maricultura, bem como direcionamento da produção e utilização dos recursos naturais animais, facilitaria a legalização da atividade de mariscagem, oportunizando a criação de cooperativas de marisqueiras e realização de oficinas para esclarecimento quanto as condições de higiene para processamento e armazenamento dos moluscos bivalves.

No Brasil, há alguns estudos sobre a distribuição de microrganismos em moluscos bivalves comestíveis. Estes têm convergido, em especial, para pesquisa de microbiologia de águas costeiras e a ocorrência de *V. cholerae*, devido a sua importância clínica e em saúde pública (RUBIN 2000).

Outros estudos têm permitido uma avaliação microbiológica mais completa de moluscos bivalves. LIRA et al. (2001) estudaram a ocorrência não só de vibrio em moluscos bivalves, mas associou ao estudo a pesquisa de coliformes. Segundo HAGLER e HAGLER (1991), os coliformes têm pouca tolerância à toxidez da água do mar e, portanto, sua ocorrência, nos ambientes marinhos, indicam uma descarga de material fecal e esgotos sanitários constantes.

Mesmo sabendo-se que os vórios são autóctones do ambiente marinho, convém ressaltar que sua presença em águas de praias ou produtos comestíveis de origem marinha é um grave problema de saúde pública. O âmago desta discussão é que não se pode descartar a existência de uma estrutura epidemiológica onipresente em toda área estudada – BTS e Valença – como lançamento de esgotos, falta de condições de higiene em todo o processo de mariscagem e venda da mercadoria, favorável à disseminação dos vórios entre os humanos provocando doenças. Assim, a circulação de bactérias patogênicas via consumo de animais marinhos e exposição ao ambiente marinho deve ser muito mais ampla.

No tocante ao lançamento de esgotos na BTS, é importante salientar que estes efluentes, ainda que tratados, devem ser monitorados para acompanhamento da dispersão e os efeitos sobre as comunidades biológicas. Apesar da notória capacidade de renovação de suas águas na BTS e da diluição é necessário ressaltar que tanto este estudo como outros anteriores (CARROZZO 1994) identificaram a presença de bactérias patogênicas em moluscos bivalves apanhados em seus manguezais e praias.

O artigo 215, do capítulo VIII da Constituição do Estado da Bahia, prevê como áreas de preservação permanente, os manguezais, os estuários, os recifes de corais, as dunas e restingas, as lagoas, lagos e nascentes. O artigo 216 constitui, como patrimônio estadual, entre outros, a Zona Costeira, em especial, a orla marítima, incluindo a BTS e o Morro de São Paulo (próximo a Valença). O artigo 226 proíbe, em todo o Estado, o lançamento de resíduos hospitalares e industriais e esgotos residenciais, diretamente em praias, rios, lagos e demais cursos d'água, devendo estes expurgos e dejetos, após tratamento, passar por controle de teores poluentes (disponível em <http://www.bahia.ba.gov.br>).

Estes artigos sugerem em suas redações a importância da BTS e dos recursos marinhos para o Estado, mostrando uma faceta do direito mais voltado para o público. Passa, assim, para a ordem constitucional, o entendimento da necessidade de preservação ambiental, controlando a emissão de poluentes e esgotos sem tratamento.

As citações, especialmente o artigo 226, ainda remetem a idéia de que qualquer atividade ou conduta desenvolvidas, na área costeira, devem observar princípios legais de defesa e preservação do meio ambiente e seus recursos naturais. Em razão das flagrantes incompatibilidades entre a lei e o observado na BTS e Valença, marcadas principalmente pela destruição dos manguezais, emissão de efluentes sem tratamento, urbanização descontrolada, é oportuno lembrar a obrigação do poder público em adotar providencias quanto à garantia das condições sanitárias ideais dos locais de produção de pescados.

As marisqueiras desenvolvem uma atividade informal não possuindo licença para a prática, realizando-a em todas as épocas do ano e em todos os locais onde haja ocorrência do molusco, independente das condições ambientais.

Observou-se que na região há cooperativas de pescadores, mas não de marisqueiros, em Jaguaripe e Valença, apenas. Segundo informações obtidas com os pescadores de Jaguaripe, a atividade de mariscagem na Bahia está sendo fiscalizada pelo Centro de Recursos Ambientais, do Governo da Bahia (CRA).

O controle de qualidade de alimentos ao nível mundial preconiza que na aquisição de alimentos pelo consumidor este deve estar livre de contaminantes químicos (pesticidas, aditivos), físicos (pêlos de animais, insetos, areia, partículas), biológicos (organismos patogênicos). Para tal, agências locais de vigilância deveriam cuidar da observância destes critérios. Entretanto, não há consenso mesmo entre os países desenvolvidos quanto aos procedimentos para evitar danos à Saúde Pública representado pelo consumo de bivalves. Enquanto na Europa a legislação está mais voltada para as boas práticas de manuseio pós-coleta, nos países americanos ênfase maior foi dada à qualidade da água nas áreas de obtenção dos animais, suplementada por um sistema de monitoramento de todas as etapas desde a coleta até o consumidor (JOSÉ 1996).

Esta região oferece condições ideais para o processo de disseminação de doenças de origem alimentar, proveniente do consumo dos moluscos, não só pelas condições climáticas, de falta de saneamento básico, ausência da ação da Vigilância Sanitária sobre a qualidade dos alimentos e água utilizados, como também por aspectos ligados ao comércio de alimentos, em condições inadequadas (BISPO 1993).

O modelo criado para regular as relações produção-consumo no Brasil, ao longo de nossa História, tem sido estruturado no “poder de polícia” e em atos de fiscalização emanados pela Vigilância Sanitária (COSTA e ROZENFELD 2000). No comércio de pescados em feiras-livres, principalmente, estes atos de fiscalização, além de insatisfatórios e não resolutivos, são descontínuos e pontuais, sendo visíveis apenas em algumas épocas do ano devido a questões culturais locais, como na Páscoa, quando aumenta o volume de pescado ofertado para comercialização.

Estudos conduzidos por CARROZZO (1994), com comerciantes de moluscos bivalves das feiras-livres de Salvador, demonstraram que estes quando questionados sobre a atuação da Vigilância Sanitária quanto ao comércio de mariscos, 50% responderam nunca terem sido visitados por fiscais da Vigilância Sanitária.

Naqueles que afirmaram a presença da fiscalização informaram que a atuação deste órgão restringiu-se à inspeção visual do produto e apenas um único vendedor mencionou o recebimento de folhetos informativos sobre cuidados sanitários.

Reconhece-se que a atividade fiscalizadora é indispensável para alcance da efetividade das ações de vigilância sanitária, que não deve se restringir apenas a uma prática verificadora de normas, mas, acima disso, uma oportunidade de realização de ações educativas, as quais devem orientar todo o trabalho de vigilância (JULIANO 2001).

São, assim, recomendadas algumas medidas para estabelecimento ou melhoria dos serviços de higiene dos mariscos, segundo WOOD (1979):

- **Adoção de medidas legislativas** como a criação de um serviço de higiene que se ocuparia dos aspectos sanitários da indústria marisqueira, visitando locais de pesca e mariscagem e instalações de locais de transformação e manipulação. Poder para ordenar o fechamento de zonas contaminadas e proibir a coleta de mariscos para o consumo humano, exceto após depuração em águas limpas.
- **Criação de um serviço de inspeção**, através de laboratórios de bacteriologia, objetivando a vigilância da ocorrência de patógenos e da qualidade dos moluscos.
- **Tratamento e manipulação dos mariscos contaminados**, via instalação de tanques de depuração e fazendas de tratamento, que pode ser feito com água do mar limpa ou água esterilizada por cloração, ozônio ou radiação UV. Esta etapa é exigida em países desenvolvidos como um processo auxiliar na melhoria da qualidade do marisco. O método de depuração para eliminação de víbrios, no entanto, parece não ser eficaz. Dados publicados sobre ostras submetidas a processo de depuração mostram que os víbrios persistem na hemolinfa e tecidos moles das mesmas, apresentando porém redução significativa do número de bactérias do grupo coliforme fecal (MURPHREE e TAMPLIM 1991). Para víbrio a depuração torna-se eficaz quando acrescido de cloração na água (5ppm) por 24 horas (LIRA et al. 2001). O Ministério da Agricultura garante a obtenção do SIF apenas para os moluscos bivalves submetidos à depuração.
- **Melhoria das condições sanitárias nas zonas de produção**, que, em muitos locais pode ser feita tratando-se os efluentes, de forma a reduzir ou eliminar a poluição em zonas produtoras de mariscos.

Estudos conduzidos no mundo inteiro comprovam haver uma associação positiva entre o consumo de moluscos bivalves e o aparecimento de doenças ou surtos de origem infecciosa ou tóxica. Por exemplo, febre tifóide e hepatite A são doenças historicamente relacionadas ao consumo destes animais, especialmente se consumidos crus ou mal cozidos, e que não foram submetidos a algum processo de depuração (JOSÉ 1996).

Apesar de alguns danos à saúde humana provocados pelo consumo de moluscos bivalves contaminados serem reparáveis, estes acarretam custos ao sistema de saúde. Só nos EUA, segundo a Associação Médica Americana, as doenças transmitidas por alimentos atingem cerca de 76 milhões de americanos, e destes 300 mil são hospitalizados e 5 mil morrem (GERMANO e GERMANO 2001).

A população exposta ao risco é grande e varia a classe social do consumidor, quanto ao consumo de pescados, especialmente pelo hábito de consumir os moluscos bivalves crus. Isto porque se encontram consumidores entre os próprios marisqueiros que coletam para o comércio ou subsistência, e os consumidores de alta renda, que vêm no pescado e nos mariscos um alimento nutritivo, saboroso e ao mesmo tempo considerado “light” (baixo teor calórico).

Além disso, não há fiscalização tanto nas áreas de coleta, como nos locais de processamento ou feiras-livres. Assim, associações epidemiológicas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados e a eclosão de distúrbios gastrointestinais raramente são investigados, seja por autoridades sanitárias, seja pelo acometido. Isso se deve ao fato de que, no Brasil, as diarreias serem consideradas pela população como doenças comuns, de fácil cura e tratamento caseiro, não havendo necessidade de procura pela causa ou consulta médica.

Entre as medidas necessárias para a interrupção da cadeia do processo infeccioso dessas doenças está a maior rapidez das ações de vigilância. Ou seja, a incidência das doenças pode ser reduzida por meio de medidas sanitárias voltadas para controle de áreas de mariscagem e comercialização, o que pede uma reorientação nos serviços de saúde, já que o modelo atual de atenção à saúde não privilegia a intervenção junto a fatores de riscos ambientais que venham a interferir no processo saúde-doença.

Neste aspecto, o Programa Saúde da Família (PSF), que se estrutura na lógica do espaço, pode vir a ser um aliado na formulação de indicadores de vigilância ambiental, reforçado pelo geoprocessamento (GONÇALVES et al., 2000), uma vez que este Programa atua diretamente nas comunidades, nas casas, nos locais onde vivem as pessoas, com boa cobertura populacional, o que garante acesso e distribuição das ações de saúde trabalhando prioritariamente com educação e prevenção (SILVA FILHO 2000).

Paralelamente, programas de educação em saúde para vendedores e marisqueiros e intervenções intradomiciliares junto aos consumidores devem ser implementadas para obter proteção aos riscos de doenças por vibrios.

Outro recurso do SUS, além do SINAM (Sistema de Notificação de Morbidade), é o Sistema de Informação Hospitalar (SIH) que tem se constituído em importante fonte de informação, tanto na produção de serviços como para análise de morbidade. Estudos realizados demonstraram que no tocante às doenças de notificação compulsória – a cólera, por exemplo – a base de dados do SIH mostrou-se uma destacada fonte de informação complementar para a Vigilância Epidemiológica, uma vez que a análise dos dados permitiu obter as mesmas informações que aqueles provenientes do SINAM (MEDEIROS et al. 2000).

No mesmo estudo, a análise dos dados do SIH sobre as doenças de veiculação hídrica, no período de 1984 a 1998, revelaram a presença de uma política governamental desigual de saneamento entre os Estados, os quais, com suas características ambientais peculiares, encontram-se como cenários favoráveis ao surgimento de surtos ou endemização destas.

Em países de industrialização tardia e economia semi-periférica, como o Brasil, a temática “saúde e meio ambiente” tem que ser articulada com as características de inequidade do modelo de desenvolvimento (PORTO et al. 2000). A idéia de progresso hoje é baseada no modelo do desenvolvimento sustentado, que é antropocêntrico, desconsiderando o aspecto biocêntrico. Assim, a defesa do meio ambiente é uma luta contra valores sociais e econômicos que provocam a miséria e a desigualdade. Na conhecida contraposição dos dois brasis: um globalizado e moderno, e outro, tradicional e marginalizado, pode ser explicado do ponto de vista econômico e ecológico, devido ao fato histórico da economia brasileira ter sido

pautada, por mais de 450 anos, por forte depleção de recursos naturais e sistemas industriais poluentes (VIOLA 2002).

Nossa história mostra que a formulação de políticas e da administração em saúde sempre teve tendência a focar apenas a doença e não a saúde, centrando as ações no indivíduo, com prestação de serviços definidos pela prática clínica. Com isso, muitas tentativas de orientar os serviços de saúde exclusivamente em função dos fatores causais apoiados em probabilidades, incorreram em equívocos, por não se considerar que o risco individual não é predizível a partir do risco medido na população, uma vez que o risco de adoecer é variável entre pessoas, entre agrupamentos humanos, e até, entre países.

As endemias estão relacionadas com as questões sociais e com o modelo de desenvolvimento econômico. No Brasil, o controle de doenças é feito com intuito de garantir o desenvolvimento do país e a inserção no mercado internacional. Essa visão despreza as determinações históricas, sociais, políticas econômicas, culturais e ambientais, favorecendo apenas a visão biologicista (GURGEL e AUGUSTO 2000).

A saúde e o bem-estar humanos são também influenciados por perturbações naturais e pelas atividades humanas. Por isso, fala-se hoje do campo de estudos relacionados à “Saúde dos Ecossistemas”, o qual engloba de forma integrativa, as relações entre atividades humanas, sistemas naturais e saúde humana (NAJAR et al. 2000).

O comércio é uma atividade humana por excelência, e dentre todas as formas praticadas, talvez o comércio de alimentos seja o mais popular, universal e um dos mais antigos.

O comércio/consumo de moluscos bivalves na área de influência da BTS e município Valença, bem como sua salubridade, mostrou estar submetida a fatores históricos, geográficos, culturais, sócio-econômicos e organização político-administrativa, condicionados aos riscos microbiológicos, que são, em verdade, consequência de todos os fatores acima listados. Logo, a análise microbiológica aparece como um componente para estudar a realidade da região permitindo maior visibilidade quanto a seus problemas e possíveis soluções.

Mesmo havendo divulgação pela imprensa sobre os riscos potenciais do uso de moluscos bivalves na alimentação humana, estes são muito populares entre os

consumidores baianos, estando sua culinária fortemente vinculada a festividades, religiosidade e ao imaginário coletivo no tocante às suas propriedades revigorantes, nutritivas e afrodisíacas.

De par disso, o fluxo turístico, principalmente nos meses de verão, aumenta a população destes consumidores. Porém, as medidas de higiene e controle de qualidade destes produtos alimentares não acompanham a crescente demanda, só o preço. Com isso, nestes meses cresce, visivelmente, o número de marisqueiros coletores e processadores, cada vez menos qualificados, apenas objetivando o comércio com o preço mais alto do produto, sem preocupação com a qualidade.

Vale salientar ainda, que, os parâmetros que norteiam a proteção à saúde humana no que concerne ao consumo de pescado, em seu aspecto microbiológico como a concentração de substâncias químicas, são bem distintos daqueles recomendados para proteção da fauna marinha. Por exemplo, para a exposição ao benzeno, os critérios visando a proteção do consumidor de pescado são muito mais restritivos que as concentrações em que as espécies marinhas apresentam efeitos adversos por exposição crônica ou aguda (LEDERER 1985; JOSÉ 1996).

As formas e maneiras pelas quais os alimentos se contaminam com agentes microbiológicos, químicos ou físicos são muito complexas, e, assim, a conexão “produção de alimentos/Saúde Pública” é estreita, não só no sentido de se implementar uma vigilância eficaz mas também para garantir o desenvolvimento no aspecto econômico, pela aceitação do produto.

Em todo caso, qualidade e segurança são componentes indispensáveis para produtos alimentares, em especial aqueles de beneficiamento artesanal como no presente caso, os moluscos bivalves. Além da importância comercial para a região, há visível deficiência das condições de higiene tanto na manipulação quanto na comercialização. Por isso a necessidade de uma avaliação completa de todos os possíveis riscos relacionados com o alimento e de se estabelecer normas aceitáveis de higiene para os mesmos, paralelamente ao fato de fazer crescer sua produção (DIAS 1995).

O Brasil é um país que ainda possui milhões de pessoas vivendo abaixo da linha da pobreza, vivendo em condições desfavoráveis, catando alimento em lixões dos grandes centros urbanos, o que tem motivado governos a criarem programas que

atenuem a situação, sendo mais recentemente implantado o Programa Fome Zero. Os moluscos bivalves se constituem numa fonte importante de proteínas para a população, especialmente, aquela que vive próxima a manguezais e estuários, e que habitualmente consomem estes produtos. Seu consumo deve ser incentivado, porém deve-se garantir: o acesso a este alimento, qualidade e isenção de riscos de adoecimento pelo seu consumo.

Por reunir vários fatores de risco, como: ser área portuária, possuir intensa mariscagem, população consumidora de pescados, precário saneamento básico, hábitos de higiene alimentar precários, alta densidade populacional serviços de saúde com carência de estrutura e pessoal treinado, a região estudada reúne condições favoráveis a ocorrência de surtos de gastroenterite, ou até mesmo, uma epidemia de cólera, especialmente em épocas de ocorrência do fenômeno *El Niño*.

A população local e os turistas devem ser informados sobre estes riscos e os prováveis danos à saúde por doenças causadas por vibrios (por exemplo, contrair gastroenterites por consumir moluscos bivalves crus), sendo este um direito do ser humano e um dos trunfos da sociedade civil organizada como reconhecimento da cidadania, conforme o Código de Defesa do Consumidor (Lei 8.078/90, Artigo 6, Inc. II e III, e Artigo 8).

Assim, os comerciantes são obrigados a informar ao consumidor os eventuais perigos à saúde e restrições de consumo de moluscos bivalves, e, na ocorrência de danos, o comerciante, o produtor e o importador respondem pela reparação destes, independentemente da existência de culpa (Lei 8.078/90, Artigo 12).

Para tanto, é fundamental convocar a comunidade local, autoridades governamentais, líderes comunitários, vendedores de pescados, pescadores e marisqueiras, para o debate sobre o tema e buscar saídas conjuntas, sem conflitos ou conturbações.

A possibilidade de apreensão das mercadorias, suspensão da mariscagem ou difusão de campanha, que crie aversão da população em relação aos alimentos marinhos, são de cunho repressivo e não educativo. Além disso, geram um grande viés: a pesquisa científica direcionada ao conhecimento da biologia e ecologia dos vibrios não é enfrentada e os recursos que a subsidiam (financiamentos, laboratórios, formação de pesquisadores, entre outros) não são conquistados pela sociedade.

Conseqüentemente, os avanços no desenvolvimento das ações de vigilância e a melhoria da qualidade de vida que o conhecimento científico permite jamais são alcançados, e a sociedade fica condenada a repetir os mesmos erros do passado.

Outro prejuízo decorrente está na sujeição das políticas de enfrentamento da cólera, por exemplo, apenas pela ótica da teoria monocausal da doença. Ou seja, aguarda-se o surgimento da doença para que haja implementação de ações de cunho hospitalocêntrico, utilização de recursos farmacêuticos, sobrecarregando o sistema público de saúde.

Este lado clínico das infecções por vibrios, aqui destacado, é pouco valorizado e sofre muita discriminação nos meios acadêmico e médico: mesmo sabendo-se que as doenças infecciosas são um problema mundial, algumas delas são consideradas “doenças da pobreza”, típico de países de terceiro mundo. A cólera e as gastroenterites, apesar da distribuição mundial dos vibrios, em função da sua ecologia, são um exemplo clássico destas doenças assim qualificadas.

Isto porque a cólera está diretamente relacionada às más condições de higiene alimentar, baixo nível de educação, baixa remuneração, falta de saneamento básico e moradia, caracterizando, assim, o estado de pobreza de uma população, e, por trás da pobreza, está a inequidade social.

Logo, a complexa trama ecológica-social-sanitária que envolve a questão da ocorrência de *V. cholerae*, seja no zooplâncton seja em moluscos bivalves comestíveis da BTS e Valença, não pode, num estudo como este, acabar reduzida apenas a discussão/recomendações no âmbito da Microbiologia e da Biologia Molecular.

Assim, faz-se necessário aqui a indicação de dois pontos centrais para os quais converge a discussão final deste trabalho. São eles: primeiro, o consumidor e o marisqueiro/vendedor, que formam o povo, e, segundo, interligando estes atores, está a presença, destacadamente, do *V. cholerae*, a bactéria.

A falta de decisão política na região favorece e mantém a inequidade social, especialmente no tocante ao acesso a bens e serviços considerados essenciais, como água potável e esgotos. Apesar do Estado da Bahia possuir estudos econômicos e sociais enfocando diversos aspectos, o planejamento governamental parece não observar considerações importantes advindas destes estudos, que poderiam redundar

em efetivas políticas sociais na melhoria da qualidade de vida da população (SILVA FILHO 2000).

Assim, o motivo deste presente estudo foi cobrir uma lacuna no conhecimento científico sobre a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos na região da BTS e Valença, Estado da Bahia, pelas condições precárias de higiene e saneamento. Ainda que se constitua numa pesquisa preliminar, seus achados podem servir de base para outros estudos que venham a complementá-lo, e a partir do conhecimento gerado, orientar políticas públicas que venham a impedir que hajam surtos de gastroenterites e repetições de epidemias de cólera na região.

Além disso, somam-se outras conquistas advindas deste estudo como a incorporação de tecnologia molecular para detecção de patógenos e, especialmente, a formação de recursos humanos – principais agentes de transformação do sistema de saúde (JULIANO 2001) – fortalecendo o quadro de profissionais atuantes na Universidade local (UEFS) para formação de pessoal técnico-científico nos cursos de graduação e pós-graduação das áreas de Saúde e Biomédicas.

Assim, um novo desafio que se propõe para o nível local será a articulação entre o saber científico da Academia, o Poder Público e a sociedade, através da adesão conjunta ao propósito de redução da morbi-mortalidade por gastroenterites.

Através desta idéia de prevenção de morbidade e mortalidade, as ações e os gastos podem ser previamente planejados e, com isso, não haverá necessidade de se diminuir o orçamento público com Educação, Segurança Pública ou de programas de combate a outras doenças para cuidar das doenças diarréicas, em especial, a cólera.

As ações planejadas por vários parceiros (intersetorialidade), além de evitar estes “desvios” no orçamento, tendem a ser mais eficazes, mais resolutivas e duradouras, indo direto à raiz do problema, poupando vidas.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos são apontadas as seguintes conclusões:

1. Dentre os vibrios patogênicos foram isolados: 17 (1,6%) cepas de *Vibrio cholerae*, 216 (20%) cepas de *Vibrio parahaemolyticus*; 64 (6%) cepas de *Vibrio alginolyticus*; 24 (2,2%) cepas de *Vibrio fluvialis* e 14 (1,3) cepas de *Vibrio vulnificus*, as quais podem ser potencialmente patogênicas;
2. 50% das 16 amostras de moluscos bivalves adquiridas em pacotes embalados com filme plástico, em bandejas, etiquetadas com nome comum do produto, data de validade e conservadas em temperaturas de congelamento iguais ou inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$  não apresentaram vibrios;
3. A maior ocorrência de vibrios por moluscos bivalves foi da espécie *V. parahaemolyticus* – 35 amostras (32,7%), e destas 15 (42,9%) eram de moluscos bivalves vivos (na concha) e 20 (57,1%) processados;
4. Em 29 (27,1%) das 107 amostras de moluscos bivalves estudadas o resultado foi negativo para a presença de vibrios e nas 15 amostras de zooplâncton, positivo;
5. Das 17 cepas de *Vibrio cholerae* testadas para presença de antígeno O1 e O139 via PCR, nenhuma possuía os antígenos, sendo, portanto, todas elas caracterizadas como *Vibrio cholerae* não-O1 não-O139;
6. A pesquisa para genes de virulência *hlyA*, *toxR* em todos os isolados de *Vibrio cholerae* não-O1, não-O139, via PCR, demonstraram que as cepas não têm potencial para causar a doença cólera, mas podem estar relacionadas a gastroenterites em humanos;
7. A pesquisa da ocorrência de *Vibrio*, potencialmente patogênicos, pode se constituir num indicador de controle de qualidade para moluscos bivalves;
8. Os perfis genômicos, obtidos por ERIC-PCR, demonstraram menor diversidade em *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus* e *V. fluvialis* e grande diversidade genética de *V. parahaemolyticus*, sugerindo que a diversidade encontrada tenha sido originária de divergências adaptativas durante a evolução ou, possivelmente, pela entrada de indivíduos novos na população por água de lastro de navios.
9. Moluscos bivalves, adquiridos nos municípios da área de influência da BTS e em Valença, mostraram risco ao consumidor quanto à presença de vibrios potencialmente patogênicos.

## 7. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES:

Diante das conclusões, apresentadas neste estudo, que mostram a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos em moluscos bivalves amplamente consumidos pela população baiana, diante do compromisso ético de proteger a vida humana, especialmente na escala social menos favorecida, uma vez que estes sujeitos se constituem no grupo mais vulnerável à acometimentos de gastroenterites e até mesmo cólera e diante do fato que o risco de adoecer e possivelmente o óbito por doenças diarréicas causadas por vibrios é passível de prevenção são apresentadas algumas proposições, baseadas na literatura e nos resultados deste estudo, dirigidas aos diferentes segmentos sociais, as quais devem ser inscritas numa agenda de prioridades para o Estado da Bahia, e trabalhadas de forma intersetorial.

### **Para os consumidores:**

- ✓ Evitar o consumo de moluscos bivalves crus, mal cozidos ou preparados em locais de higiene precária;
- ✓ Só consumir moluscos bivalves capturados em manguezais de bancos naturais da BTS e Valença, de origem comprovada informando as condições sanitárias do local e as formas adequadas de consumo, ou aqueles submetidos a algum processo de depuração (em água clorada 5ppm/24h, por exemplo) ou tratamento com radiação ionizante.

### **Para o Governo Estadual/Prefeituras Municipais/Secretarias de Saúde:**

- ✓ Garantir que os moluscos bivalves comercializados que foram capturados em manguezais (bancos naturais) da BTS e Valença, para utilização como alimento tenham a origem comprovada informando as condições sanitárias do local e as formas adequadas de consumo, bem como, passem por processo de depuração eficiente para redução de vibrio;
- ✓ Adotar providências quanto a garantia do cumprimento das normas técnicas concernentes à produção e ao comércio de moluscos bivalves;
- ✓ Divulgar nas televisões, rádios, jornais e outra mídia, riscos de contaminação humana pelo consumo de moluscos bivalves crus, mal cozidos ou preparados em condições precárias de higiene;
- ✓ Realizar mapeamento da região costeira baiana para identificação de áreas qualificadas para criação intensiva de moluscos bivalves, ou outras espécies

- marinhas para consumo humano, sem risco de contaminação por patógenos ou produtos químicos;
- ✓ Reestruturação dos serviços de saúde e laboratórios clínicos locais para possibilitar atenção com diagnóstico microbiológico e tratamento de gastroenterites, lesões ou ferimentos cutâneos infeccionados em indivíduos expostos ao ambiente e/ou alimentos marinhos, de forma a prevenir ou diminuir os danos a saúde, bem como estimar a morbi-mortalidade por infecções causadas por vbrios;
  - ✓ Abertura de linhas de crédito especiais para marisqueiros e vendedores de moluscos bivalves para aquisição de congeladores, condioes de beneficiamento, instalação de processo de depuração e embalagens adequadas para o produto;
  - ✓ Promover a produção auto-sustentada de moluscos bivalves nativos em fazendas cooperativadas de marisqueiros, onde o próprio ambiente forneceria as sementes e sem por em risco a ecologia pela introdução de espécies exóticas, com publicação permanente de relatórios de impacto ambiental;
  - ✓ Capacitação de profissionais de saúde da equipe PSF e professores de rede oficial de ensino para aoes educativas da população quanto a prevenção dos riscos oferecidos quanto as doenças veiculadas por vbrios na região;
  - ✓ Definição de um projeto político que garanta investimentos contínuos e com planilha de gastos transparentes na expansão da rede de esgotos, água potável e coleta de lixo em todo Estado da Bahia, informando periodicamente a sociedade sobre o atendimento das suas necessidades de saneamento.

**Para o Setor Saúde/Vigilância Sanitária:**

- ✓ Promover a educação sanitária e capacitação dos manipuladores de alimentos, da população coletora de moluscos bivalves e pescadores, bem como dos consumidores e banhistas, quanto aos riscos de adoecer por infecoes causadas por vbrios, seja por risco ocupacional ao desconchar os moluscos bivalves, seja por acidentes em praias por mordedura de peixes; escoriaoes e feridas provocadas acidentalmente, seja por contrair gastroenterites (inclusive cólera) associadas ao consumo de moluscos bivalves crus ou mal cozidos ou preparados em condioes de higiene precária;

- ✓ Por ter sido identificada toda uma estrutura epidemiológica favorável a eclosão de surtos de gastroenterites, a região estudada deve passar por um monitoramento constante para a ocorrência de *V. cholerae*, segundo os protocolos recomendados pela OMS;
- ✓ Recomenda-se também o monitoramento nas áreas de mariscagem e bancos naturais de moluscos bivalves da região quanto a qualidade da água por contaminação fecal humana;
- ✓ Por ser área portuária, fica também recomendado atenção especial das autoridades sanitárias quanto a possível ocorrência de surtos de cólera, pela descarga de água de lastro de navios.

#### **Para os coletores de moluscos bivalves:**

- ✓ Buscar o serviço de saúde quando acometidos por infecções causadas por vibrios, seja por risco ocupacional ao desconchar os moluscos bivalves, seja por acidentes em praias ou manguezais, por mordedura de peixes ou escoriações, por exemplo;
- ✓ Exercer cidadania e direitos políticos reivindicando, junto aos seus representantes (vereadores e prefeitos), segurança e melhores condições de trabalho na mariscagem e venda de seus produtos, bem como qualificação para preparo da matéria prima.

#### **Para os Centros de Pesquisa/Universidades locais:**

- ✓ Instituir, nos cursos de graduação da área de Saúde e Biomédicas, das Universidades locais, conteúdos relacionados à atenção de doenças e agravos provocados por vibrios, bem como disciplinas envolvendo a temática “Saúde e Meio Ambiente”;
- ✓ Como os moluscos bivalves têm características filtradoras e, neste estudo, eles se mostraram eficientes como indicadores da presença de *Vibrio*, esta pesquisa deve ser repetida periodicamente, utilizando moluscos bivalves de bancos naturais e zooplâncton com fins de controle de patógenos veiculados por alimentos de origem marinha e de monitoramento ambiental;
- ✓ Pesquisar estratégias culinárias das populações locais (uso de limão, pimenta, panela de barro, aquecimento do óleo de dendê e leite de côco) que estejam favorecendo a eliminação dos vibrios, durante o preparo dos alimentos.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>:

1. Adkins HJ, Escamilla J, Santiago LT, Rañoa C, Echeverria P, Cross JH. Two-year survey of etiologic agents of diarrheal disease at San Lazaro Hospital, Manila, Republic of the Philippines. **J. Clin. Microbiol.** 1987; 25:1143-1147.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Biologia Molecular da Célula.** p.98-102, Porto Alegre,RS, 1997.
3. Alvarado DE. **Detecção de seqüências genéticas associadas à virulência em cepas de *Vibrio cholerae* não-O1 e não-O139 isoladas de ambientes marinhos do Estado de São Paulo.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas/USP, São Paulo, 1997.
4. APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Downes FP & Ito K (eds.), 4<sup>a</sup> ed. Washington, DC, 2001.
5. Andrade AM, Carmo EH, Silva GAP, Pinto LL, Carvalho MB. A municipalização das ações de epidemiologia e controle de doenças no Estado da Bahia: uma avaliação preliminar. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva**, Vol. 5, p.457, ABRASCO, 2000.
6. Andreoni O. Microbiologia experimental e microbiologia clinica. **GIMMOC**, vol III, 2: 99-103, 1999.
7. Andreu B. El cultivo del mejillon en Europa. II Aspectos biológicos y ecológicos: enemigos y parasitos. **Anais Acad. Bras. Ciências**, 47: 23-36 (suplemento), 1976.
8. Anonymus. Ameaça Biológica. **Rev. Época**, 2001, 179: 52-53.
9. Anonymus. Um mergulho no mar. **Rev. Época**, 2002, 213: 66-67.
10. Arakawa E, Murase T, Matsushita S, Shimada T, Yamai S, Ito T, Watanabe, H. Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates from domestic and imported cases of cholera in Japan. **J. Clin. Microbiol.** 2000; 3891:424-426.

---

<sup>1</sup> As referências bibliográficas seguem as normas sugeridas pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

11. Araújo MSVB. **Morfologia, composição, sedimentologia e história evolutiva do recife de coral na Ilha de Itaparica, Bahia.** Bahia; 1984. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia].
12. A TARDE. **Epidemia de cólera ameaça Iraque.** Pág. 19, 08 de maio de 2003. Ano 90 n.º 30.710. Salvador – Bahia.
13. Azevedo T. **Povoamento da Cidade do Salvador.** 1.ª ed. Bahia: Ed. Itapuã; 1969.
14. Barboni AR. **O impacto de algumas causas básicas de morte na esperança de vida de residentes em Salvador e São Paulo – 1996.** São Paulo; 2002. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].
15. Bahia IS, Peso-Aguiar MC. **Relação peso – comprimento e flutuação do fator de condição de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia-Veneridae) da Ilha de Madre de Deus, BA.** In: VIII Seminário Regional de Ecologia, 1998, São Carlos – SP. Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1998. v. III. p. 1477-1484.
16. Barradas RCB. O desafio das doenças emergentes e a revalorização da Epidemiologia descritiva. **IESUS.** 1999; 8(1):7-15.
17. Barros CB. **Isolamento e análise intra-específica de *Vibrio cholerae* por ERIC-PCR e RAPD.** Dissertação de Mestrado – Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2000.
18. Bastide R. 1974. **Brasil Terra de Contrastes.** 2.ª edição, Julho, 1974. Difusão Européia do Livro, São Paulo, SP.
19. Baumann P, Schubert RH. Family II. *Vibrionaceae* Veron In: Murray RGE, Brenner DS, Bryant MP, Holt JG, Krieg NR, Moulder JW, Pfenning N, Sneath PHA, Staley JT. **Bergey's manual of systematic bacteriology,** Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984, 10.a. edição, vol.1, p. 516-550.
20. Bertullo VH. **Tecnologia de los productos e subproductos de pescados, moluscos e crustaceos.** Ed. Hemisfero Sur, Buenos Aires, 1.ª ed., 1975.

21. Bina, JC. **Bioterrorismo: patógenos envolvidos, mecanismos de transmissão e controle.** Anais do IV ENCOBIO, UEFS, p.34, 2002.
22. Bispo E. **Avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos servidos nas barracas de praia de Salvador-BA, 1992.** VIII Congresso Brasileiro de Analistas de Alimentos. Porto Alegre, RS, Outubro 1993.
23. Bittencourt ACSP, Ferreira YA, Di Napoli E. 1976. Alguns aspectos de sedimentação da Baía de Todos os Santos. **Rev. Bras. Geoc.**, 6(4):245-263.
24. Boffi AV. 1979. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico.** Ed. HUCITEC, São Paulo, SP, 1.<sup>a</sup> edição, p. 41-72.
25. Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J. **Microbiologia Alimentaria.** Vol. 1, 2.<sup>a</sup> ed., Ed. Acribia, Zaragoza, 1994.
26. Brasil. 1988. **Constituição da República Federativa**, promulgada em 05 de outubro de 1988. Brasília/DF. Título VIII, cap. II, seção II, p. 36-37.
27. Brasil. 2001. **Resolução RDC n.º 12**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 02 de Janeiro de 2001. Dispõe sobre a aprovação do regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01\\_rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rdc.htm). Acesso em 10/05/2001.
28. Brayton PR, Bode RB, Colwell RR, Macdonell MT, Hall HL, Grimes DJ, West PA, Bryant TN. *Vibrio cincinnatiensis* sp. a new human pathogen. **J. Clin. Microbiol.**, 23:104-8,1986.
29. Bruno ES. 1. Equipamentos, usos e costumes da casa brasileira – Alimentação. Ed. EDUSP/Imprensa Oficial/SP, p.31, 2000.
30. Buchrieser C, Gangar VV, Murphree RL, Tamplin ML, Kaspar CW. Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oysters as demonstrated by clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. **App. Envir. Microbiol.**, 61(3): 1163-1168, 1995.
31. Cameron DN, Khambaty FM, Wachsmuth IK, Tauxe RV, Barret TJ. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Cli. Microbiol.**, 32(7):1685-1690, 1994.

32. Carozzo G. **Contaminação bacteriana em bivalves comestíveis da Enseada dos Tainheiros e comercializados em feiras livres de Salvador.** Monografia apresentada ao Instituto de Biologia da UFBA, Salvador/BA, 1994.
33. Castro D, Romalde JL, Vila J, Magarinos B, Luque A, Borrego JJ. Intraespecific characterization of *Vibrio tapetis* strains by use of pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and plasmid profiling. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1997, 63 (4): 1449-1452.
34. Cherkasskii BL. The system of the epidemic process. **J. Hyg. Epidemiol. Praha**, 32:321-328, 1988.
35. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: 2202-2208, 1999.
36. Coelho A, Andrade JRC, Vicente ACP, Salles CA. New variant of *Vibrio cholerae* O1 from clinical isolates in Amazonia. **J. Clin. Microbiol.**, Jan 33(1):114-118, 1995.
37. Coffey JA, Harris RL, Bradshaw MW, Williams TW. *Vibrio damsela*: another potentially virulent marine vibrio. **J. Infect. Dis.**, 153:800-802, 1986.
38. Colaço W, Silva Filho SV, Rodrigues P, Hofer E. Isolation of *Vibrio cholerae* O1 from aquatic environments and foods in Pernambuco State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, 14(3):465-471, 1998.
39. Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholerae paradigm. **Science**, 274: 2025-2031, 1996.
40. Colwell RR. ***Vibrios in the environment***, Ed. John Wiley & Sons, New York, USA, 1984.
41. Colwell RR, Kaper J, Joseph SW. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. **Science**, 198: 394-396, 1977.
42. Colavitti F e Girardi G. Doenças do aquecimento global. **Rev. Galileu**, out/2002, p. 92-94.
43. Cooter PA e Miller JF. *In vivo* and *ex vivo* regulation of bacterial virulence gene expression. **Curr. Opinion Microbiol.**, 1998, 1:17-26.

44. Corson WH. **Manual Global de Ecologia**, Ed. Augustus, págs. 156-164, 2.<sup>a</sup> edição, 1996.
45. Costa EA e Rozenfeld S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rozenfeld S. (Org.). **Fundamentos de Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 15-40, 2000.
46. Coyne VE e Al-Harhi L. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. **Appl. Env. Microbiol.**, 58:2861-2865, 1992.
47. Currilin EN. **Ecologia e Química Marinha**, Ed. Resenha Universitária, págs. 508-510, 1.<sup>a</sup> edição, 1975.
48. Dalsgaard A, Skov MN, Serichantalergs O, Echeverria P. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping for subtyping of *Vibrio cholerae* O139 isolated in Thailand. **Epidemiol. Infect.**, 1996;117(1):51-58.
49. Dalsgaard A, Skov MN, Serichantalergs O, Echeverria P, Meza R, Taylor DN. Molecular evolution of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Lima, Peru, from 1991 to 1995. **J. Clin. Microbiol.**, 35(5):1151-1156, 1997.
50. Davis BM, Moyer KE, Boyd EF, Waldor MK. CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. **J. Bacteriol.**, 2000; 182(24):6992-6998.
51. Davis BR, Fanning GR, Madden JM, Steigerwalt AG, Bradford Júnior HB, Smith HL, Brenner DJ. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **J. Clin. Microbiol.**, 14: 631-639, 1981.
52. De Catillo MC, De Allori CG, De Gutierrez RC, De Saab AO, De Fernández NP, De Ruiz CS, Holgado AP, De Nader OM. Bactericidal activity of lemon juice and lemon derivatives against *Vibrio cholerae*. **Biol. Pharm. Bull.**;23(10);1235-1238, 2000.
53. Delattre JM e Delesmont R. L'analyse de coquillages peut-elle servir au controle microbiologique du littoral? **Rev. Int. Oceanogr. Med.** Tomes LXIII, p.11-16, 1981.
54. Deshayes GP. Descriptions of new shells from the collection of Hugh Cuming. **Proc. Zool. Soc. Lond.** 22:317-371, 1854.
55. Dias HP. Alimentos e o direito à saúde. **Bol. SBCTA**, 29 (1): 33-39,1995.

56. Diniz MF e Ferreira LT. Bancos genéticos de plantas, animais e microrganismos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 2000. 34-38.
57. Drew D. **Processos interativos homem-meio ambiente**. 5.<sup>a</sup> edição, ed. Rio de Janeiro, Bertrand Brasil S.A., 2002.
58. Earampamoorthy S, Koff RS. Health hazards of bivalve-mollusk ingestion. **Ann. Intern. Med.**, Jul; 83(1):107-110, 1975.
59. Elliot E, Kaysner CA, Jackson L, Tamplin ML. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and others *Vibrio spp*. **Bacteriological Analytical Manual**, FDA, 8<sup>th</sup>. Edition, 1998.
60. Ellis M. **A baleia no Brasil colonial**. Ed. Melhoramentos, São Paulo, 1969.
61. Ellison RK, Malnati E, Depaola A, Bowers J, Rodrick GE. Populations of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters from Florida using two methods. **J. Food Prot.**, 2001, May; 64(5):682-686.
62. English VL e Lindberg RB. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from wounds and blood of a bum patient. **Am. J. Med. Technol.** 43:989-993.1997.
63. Evins GM, Cameron DN, Wells JG, Greene KD, Popovic T, Giono-Cerezo S, Wachsmuth IK, Tauxe RV. The emerging diversity of the electrophoretic types of *Vibrio cholerae* in the Western Hemisphere. **J. Infect. Dis.**,172(1):173-179, 1995.
64. FAPESP. Muito antes da chegada de Cabral, **Pesquisa FAPESP**, março 2000: 46-49.
65. Farmer III JJ, Hickman-Brenner FW, Kelly MT. Vibrios In Lennette EH, Balows A, Hausler Júnior WJ, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology, Washington, **American Society for Microbiology**, 1985, p. 282-301.
66. Faruque SM e Nair GB. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiol. Immunol.**, 2002, 46(2): 59-66.
67. Fasano A, Baudry B, Pumplun DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, Kapler JB. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:5242-5246, 1991.
68. Feachem M. 1981. Environmental aspects of cholerae epidemiology. **Trop. Disease Bull.**, 78:675-698.

69. Ferreira ME e Grattapaglia D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, EMBRAPA, 220p. 1996.
70. Franca SMC, Gibbs DL, Samuels P, Johnson Júnior WD. *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. **J. Amer. Med. Ass.**, 244: 587-588, 1980.
71. Franco BDGM. Métodos alternativos de análise microbiológica de alimentos: uma revisão. **Bol. SBCTA**, 33(2):229-234, 1999.
72. Franco BDGM, Landgraf M. 1999. **Microbiologia de Alimentos**, Ed. Atheneu, Sp/RJ/BH. P. 65-72.
73. Forattini OP. **Epidemiologia Geral**, Ed. Artes Médicas, 1980, pág. 57.
74. Garcia Cortes V, Antillon F. Isolation of enteropathogenic *Vibrio* in bivalves and mud from the Nicoya Gulf, Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.** 1990, 38(2B):437-440.
75. Gazeta Mercantil. O mar está para ostras. **Jornal Gazeta Mercantil**, Ano VII – 353, 8 a 14 agosto de 2001, p. 5.
76. Germano PML e Germano MIS. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. Ed. Livraria Varela, São Paulo/SP, 2001.
77. Gerolamo M, Penna MLF. Os primeiros cinco anos da sétima pandemia de cólera no Brasil, **IESUS**, 8(3): 49-58, 1999.
78. Gilmore, RM. **Fauna e etnozologia da América do Sul tropical in Suma etnológica brasileira**, Ribeiro BG (org.), 3.<sup>a</sup> edição, Ed. Universitária UFPA, Belém, Pará, 1997.
79. Gmelin, JF. Caroli a Linné, *Systema naturae per regna tria naturae*, Ed. 13. Vol.I: **Regnum Animale**, Pt.6:3061-3910, 1791.
80. Gonçalves FR, Augusto LGS, Costa AM. **Formulação de indicadores de vigilância ambiental: uma construção a partir do Programa Saúde da Família**. Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Vol. 5, p.405, ABRASCO, 2000.
81. Grimes DJ. Ecology of estuarine bacteria capable of causing human disease: a review. **Estuaries**, 4 (14): 345-360, 1991.
82. Guilding L. Observations on the zoology of the Caribbean islands. **Zool. J.** 3(13):527-544, 1828.

83. Gurgel IGD e Augusto LGS. **O controle das endemias, o descontrole ambiental.** Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Vol. 5, p.458, ABRASCO, 2000.
84. Hagler LCM e Hagler AN. Taxonomia de microrganismos. In Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL. **Tratado de Microbiologia**, São Paulo, Ed. Manole, vol.2, 1991.
85. Hansen W, Crokaert F, Yourassowsky E. Two strains of *Vibrio* species with unusual biochemical features isolated from ear tracts. **J. Clin. Microbiol.**, 9: 152-153, 1979.
86. Hansen W, Freney J, Benyagoub H, Letouzey M-N, Gigi'j J, Wauters G. Severe human infections caused by *Vibrio metschnikovii*. **J. Clin. Microbiol.**, 31:2529-2530, 1993.
87. Hara-Kudo Y, Nishina T, Nakagawa H, Konuma H, Hasegawa J, Kumagai S. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 5819-5823, 2001.
88. Hayes PR. **Microbiologia e higiene de los alimentos.** Ed. Zaragoza:Acribia, 1993.
89. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishman RD, Nierman WC, White O, Salsberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature** 406: 477-484.
90. Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68(11): 5488-5497, 2002.
91. Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pilot A, Fournier JM, Pommepuy M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. **J. Appl. Microbiol.**, 92(6): 1123-1135, 2002.
92. Holt, JG. **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**, 9. Ed. Baltimore, Williams&Wilkins, 1994.

93. Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, Chakraborty S, Basu A, Bhattacharya SK, Nair GB, Shimada T, Takeda Y. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. **FEEMS Immunol. Med. Microbiol.** 20: 201-201, 1998.
94. Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol. Microbiol.**, 5:825-834, 1991.
95. Huq A e Colwell RR. Vibrios in the marine and estuarine environments. **J. Mar. Biotechnol** 3:60-63, 1995.
96. Iunes RF. **Mudanças no cenário político-econômico. In: Monteiro CA (org.). Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças.** São Paulo: Hucitec-Nupens/USP, SP, 1995.
97. Iwanaga M, Honma Y, Enami M. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 isolated from sporadic cholerae cases in Okinawa, Japan. **Microbiol. Immunol.**, 41(11):861-864, 1997.
98. Jean-Jacques W, Rajashekaraiyah KR, Farmer III JJ, Hickman FW, Morris JG, Kallick CA. *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. **J. Clin. Microbiol.**, 14:711-712, 1981.
99. José VF. **Bivalves e a segurança do consumidor.** Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciência Ambiental, USP, 1996.
100. Juliano IA. **A vigilância sanitária de Feira de Santana-BA no processo de municipalização da saúde: antigos dilemas, novos desafios.** Dissertação de Mestrado. Depto. de Saúde, UEFS/BA, 2001.
101. Kapley A, Puhorit HJ. Detection of etiological agent for cholera by PCR protocol. **Med. Sci. Monit.**, 2001, 7(2):242-245.
102. Kaper JB, Morris Jr JG, Levine MM. Cholerae. **Clin. Microbiol. Rev.**, 8: 48-86, 1995.
103. Klappenbach, MA. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños com claves para determinación y notas sobre su distribución. **Anais Acad. Bras. Cienc.** 37(supl.): 327-352, p. 13, 1965.

104. Kaysner CA, Tamplin ML, Wekell MM, Stott RF, Colburn K. Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effect of isolation medium on recovery. **Appl. Environ. Microbiol.**, 55(12): 3072-3079, 1989.
105. Kelly MT, Stroh EMD. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. **J. Clin. Microbiol.**, 26 (9):1754-1756, 1988.
106. Khan MV, Shahidullah M. Epidemiologic patterns of diarrhoea caused by non agglutinating vibrios (NAG) and EF-6 organisms in Dacca. **Trop. Geogr. Med.**, 34:19-27, 1982.
107. Kneip, LM. **Artefatos de osso e de concha do sambaqui Zé Espinho in Coletores e Pescadores Pré-Históricos de Guaratiba Rio de Janeiro**, Kneip, LM (org.), p.153-163, ed. UFRJ & EDUFF, Rio de Janeiro, 1987.
108. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. **Diagnóstico Microbiológico**. Ed. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires, 1.<sup>a</sup> ed., 1983.
109. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schereckenberger PC, Jr. Washington CW. **Diagnóstico Microbiológico**. Ed. Medsi, RJ, 5.<sup>a</sup> ed., 2001.
110. Kueh CS, Chan KY. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. **J. Appl. Bacteriol.**, 1985, 59(1):41-47.
111. Kurasono H, Okuda J, Takeda Y, Nair GB, Albert MJ, Sack RB, Chongsanguan M, Chaicumpa W. *Vibrio cholerae* O139 Bengal isolated from India, Bangladesh and Thailand are clonal as determined by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Infect**, Jul;29(1):109-110, 1994.
112. Lamarck, JBPAM de. Animaux sans vertèbres. Ed.?, p.612, Paris, 1818.
113. Lamarck, JBPAM de. Animaux sans vertèbres. Ed.?, p.232, Paris, 1819.
114. Lamparelli. CC. **O bivalve *Perna perna* (Lináceos, 1758), como amestrador biológico das condições ecológico sanitárias de águas costeiras**. 1987, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, USP/SP.
115. Lederberg, JRE, Shope R, Oaks JR. (1992) **Emerging Infections. Microbial Threats to health in the United States**. Washington, D.C. National Academy Press.

116. Lederer WH. **Regulatory chemicals of health and environmental concern.** Ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York, USA, 1985.
117. Leser W. Crescimento da população da cidade de São Paulo, entre 1950 e 1970, e seu reflexo nas condições de saúde pública. **Ciênc. Cult.** 27: 244-256, 1975.
118. Lesmana M, Subekti DS, Tjaniadi P, Simanyuntak CH, Punjabi NH, Campbel JR, Oyojo BA. Spectrum of vibrio species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 43(2): 91-97, 2002.
119. Levins R, Lopez C. 1999. Toward an eco-social view of health. **International Journal of Health Services**, 29:261-293.
120. Li M, Shimada T, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Sozhamannan S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. **Infect. Immun.** 2002, 70(5):2441-2453.
121. Linnaeus C. **Systema naturae per regna tria naturae.** (1758) Ed. 10.<sup>a</sup> Vol. 1, p. 824, Holmiae (Estocolmo).
122. Lira AA, Barros GC, Mota RA. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, vol. 15, n.º90/91, p. 50-59, 2001.
123. Lu PL, Chang SC, Pan HJ, Chen ML, Luh KT. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the investigation of a nosocomial outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Microbiol. Immunol. Infect**, 33(1):29-33, 2000.
124. Machado, DMC e Kotzian, CB. **Moluscos**, in Paleontologia, Carvalho, IS (org.), p.387-414, ed. Interciência, Rio de Janeiro, RJ, 2000.
125. Maciel Filho AA, Góes Junior CD, Cancio JÁ, Oliveira ML, Costa SS. Indicadores de Vigilância Ambiental em Saúde, **IESUS**, 8(3):59-66, 1999.
126. Mahalingam S, Cheong YM, Kan S, Yassin RM, Vadivelu J, Pang T. Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Dec;32(12):2975-2979,1994.
127. Makule DE. Pollution of water sources due to poor waste management – the case of Dar-es-Salaam. **Schriften Rev Wasser Boden Lufthyg**, 105:117-121, 2000.

128. Marshall S, Clark CG, Wang G, Mulvey M, Kelly MT, Johnson WM. Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Clin. Microbiol.**, 1999, 37(8):2473-2478.
129. Martins MT. **Ecologia de *Vibrio cholerae* no ecossistema aquático**. São Paulo; 1988. [Tese de Livre Docência – Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
130. Martins MT, Sanchez PS, Sato MIZ, Brayton P, Colwell RR. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment in Brazil employing direct immunofluorescence microscopy. **World J. Microbiol. Biotech.** 1993; 9:390-2.
131. Martins MT, Pessoa GVA, Sanchez PS, Sato MIZ, Cimbrao CA, Monteiro CK, Marques E. Occurrence of *Vibrio cholerae* O1 non-toxigenic on wastewater's from S. Paulo, Brazil. **Wat. Sci. Technol.** 1991; 24:363-6.
132. Mattoso KMQ. **Bahia Século XIX – uma província do Império**. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1992.
133. Matté GR. **Isolamento de víbrios potencialmente patogênicos em moluscos bivalves**. Tese de Doutorado, Departamento de Saúde Ambiental, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1996.
134. McGibbon JB. An unusual vibrio infection. **Maryland Medical Journal**, 389 735-737, 1989.
135. Medeiros K, Farias R, Feitoza S, Lessa F, Maciel R, Silva Jr JB, Carvalho, CN. **Uso do Sistema de Informações Hospitalares na Vigilância Epidemiológica de doenças de notificação compulsória de veiculação hídrica**. Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Vol. 5, p.458, ABRASCO, 2000.
136. Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GD, Harford N, Groyne F, deWilde M. (1983). Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. **Nature**, 306: 551-557.

137. Mello, BEM. **Moluscos do sambaqui Zé Espinho: dados ecológicos e utilização como alimento in Coletores e Pescadores Pré-Históricos de Guaratiba Rio de Janeiro**, Kneip, LM (org.), p.205-216, ed. UFRJ & EDUFF, Rio de Janeiro, 1987.
138. Mendes EV. O processo social de distritalização da saúde. In: Mendes EV (org.). **Distrito Sanitário. O processo social de mudança das práticas sanitárias do Sistema Único de Saúde**. 4.<sup>a</sup> ed. Ed. Hucitec/Abrasco, p.93-158, 1999.
139. Merrell DS, Hava DL, Camilli A. Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.** 2002, 43(6): 1471-1491.
140. Miller VL e Mekalanos JJ. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by ToxR. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81:3471-3475, 1984.
141. MS (Ministério da Saúde), Comissão Nacional de Prevenção da Cólera, CNPC. **Manual de Diagnóstico Laboratorial**, 1.<sup>a</sup> edição. Brasília (DF), 1992.
142. \_\_\_\_\_. Fundação Nacional de Saúde. **Manual Integrado de Prevenção e Controle da Cólera**, Brasília (DF), 1994.
143. Mitra RK, Nandy RK, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Shimada T, Takeda Y, Nair GB. Molecular characterization of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalized patients with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, 50(3):268-276, 2001.
144. Molitoris E, Joseph SW, Krichevsky MI, Sindhauhardja W, Colwell RR. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. **Appl. Environ. Microbiol.**, 50 (6):1388-1394,1985.
145. Moreira VD. 1997. Doenças relacionadas à água em Feira de Santana – 1995. **Boletim Epidemiológico da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia**. Ano 1, n.2 – 2.º trimestre, 1997.
146. Morris Júnior JG, Black RE. Cholera and other vibrioses in the united States. **New Engl. J. Med.**, 312:343-350, 1985.

147. Moura PL. **Material em suspensão na Baía de Todos os Santos**. 1979. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia.
148. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, 1987, 155:335-350.
149. Murphree RL e Tamplin ML. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61 (10): 3656-3660, 1991.
150. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.**, 1980, 10;8(19):4321-4325.
151. Najar AL, Chame M, Chaves SM. **Saúde dos ecossistemas e vigilância ambiental – dois novos campos da qualidade de vida**. Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Vol. 5, p.476, ABRASCO, 2000.
152. Nascimento SM, Fernandes-Vieira RH, Theofilo GN, dos Prazeres-Rodrigues D, Vieira GH. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 2001, 43(5):263-266.
153. Nascimento AAV. **Dez freguesias da cidade do Salvador**. Fundação Cultural do Estado da Bahia. Salvador, Bahia, 1986.
154. Ndip RN, Akoachere JF, Mokosso DK, Ndip LM, Anyangwe IA. Carriage of *Vibrio* species by shrimps harvested from the coastal waters of South West Cameroon. **East Afr. Med. J.** 79(3): 146-149, 2002.
155. Odum EP. **Ecologia**, p. 105, Ed. Guanabara, Rio de Janeiro/RJ, 1988.
156. OPS (Organización Panamericana de la Salud). Situación del cólera en las Américas. **Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana** 1995; 119(4):370-372.
157. Panetta, JC. Calor e Alimentos: os cuidados devem ser redobrados. **Higiene Alimentar**, 12 (53): 5, 1998.
158. Pavia AT, Bryan JA, Maher KL. *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. **Ann. Intern. Med.** 111:85-86, 1989.
159. Penna SDJ, Jeffreys AJ. Breve introdução às impressões digitais de DNA. **Rev. Bras. Genética**, 16(3):857-879, 1993.

160. Penteado AR. O Atlântico Sul, In: Azevedo A. **Brasil, a terra e o homem**, v.I – as bases físicas. São Paulo, SP, Ed. Nacional, p.307-339. 1964.
161. Peterson KM. Expression of *Vibrio cholerae* virulence genes in response to environmental signal. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, 3(2): 29-38, 2002.
162. Peso MC. **Bivalves comestíveis da Baía de Todos os Santos. Estudo quantitativo com especial referência a Anomalocardia brasiliana (Gmelin, 1791)**. Curitiba; 1980. [Dissertação de Mestrado – UFPr].
163. Peso-Aguiar MC. **Ensaio diagnóstico do extrativismo marisqueiro na área de influência do Parque São Bartolomeu**. Relatório solicitado pelo SEMADE – Secretaria do Meio Ambiente do Município. Salvador, BA, 1993.
164. \_\_\_\_\_. ***Macoma constricta* (Bruguière, 1792) (Bivalvia-Tellinidae) como biomonitor da presença crônica de petróleo na Baía de Todos os Santos (BA)**. São Paulo; 1995. [Tese de Doutorado – Fundação Universidade Federal de São Carlos].
165. Peso-Aguiar MC, Verani JR, Rocha O. **Estimativa da produção anual de biomassa de *Macoma constricta* (Bivalvia-Tellinidae) na Baía de Todos os Santos**. In: VIII Seminário Regional de Ecologia, 1998, São Carlos – SP. Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1998. v. III. p. 1497-1510.
166. Peso-Aguiar MC, Verani JR. **Índices Biométricos de agressão ambiental do petróleo e seus derivados em *Macoma constricta* (Bivalvia-Tellinidae)**. In: VIII Seminário Regional de Ecologia, 1998, São Carlos – SP. Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1998. v. III. p. 1447-1492.
167. Pinto do Carmo V. **Bahia – Estudos Sociais**. Ed. FTD, Bahia, 1993.
168. Pfeiffer WC. Metais pesados no pescados da Baía de Sepetiba, Estado do Rio de Janeiro, RJ. **Ciência e Cultura**, 37(2): 297-302, 1985.
169. Porto MFS, Freitas CM, Almeida GES. Problemas ambientais, níveis de complexidade e vulnerabilidade: uma contribuição transdisciplinar para o campo da Saúde pública. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva**, Salvador/Bahia, 2000, p.479.

170. Possas CA. Social ecosystem health: confronting the complexity and emergence of infectious diseases. **Cad. Saúde Pública**, 2001, 17(1):10-28.
171. Potasman I, Paz A, Odeh M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide prespective. **Clin. Infect. Dis.** 35 (8): 921-928, 2002.
172. Pourshafie M, Grimont F, Kohestani S, Grimont PA. A molecular and phenotypic study of *Vibrio cholerae* in Iran. **J. Med. Microbiol.** 2002, 51(5):392-398.
173. Quevedo F. **Foods and Cholera**. In: Castro AFP e Almeida WF. Eds. Cholera on the American Continents. Washington, D.C., ILSI Press, 1993.
174. Puy H, Canarelli B, Denamur E, Strunsky V, Orfila J. **Otite a *Vibrio alginolyticus***. *Press. Med.* 18(19):985, 1989.
175. Prous A. **Arqueologia Brasileira**, 1991, Ed. UnB, p. 204. Brasília/DF.
176. Rafiee M, Bara M, Stephens CP, Blackall PJ. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. **Aust. Vet. J.** Dec; 78(12):846-849, 2000.
177. Ramamurthy T, Chakraborty S, Nair GB, Bhattacharya SK. Health impairments arising from drinking water resources contaminated with *Vibrio cholerae*. **Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg**, 105: 29-34, 2000.
178. Rank EL, Smith IB, Langer M. Bacteremia caused by *Vibrio hollisae*. **J. Clin. Microbiol.**, 26(2):375-376, 1988.
179. Ribeiro MCS, Bertolozzi MR. As questões ambientais e a vigilância sanitária: a incorporação da consciência ecológica para reordenar a prática. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva (ABRASCO)**, Salvador/Bahia, 2000, p. 475.
180. Rios E. **Seashells of Brazil**. Ed. FURG, Rio Grande, RS, 2.<sup>a</sup> ed., 1994, p. 234-262.
181. Rivera ING. **Aspectos moleculares de *Vibrio cholerae* O1 e não O1 e relação entre amostras isoladas na fase pré e epidêmica durante a sétima pandemia**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas/USP, São Paulo, 1995.

182. Rivera IG, Chowdhury MAR, Sanchez PS, Sato MI, Huq A, Colwell RR, Martins MT. Detection of cholera (*ctx*) and zonula occludens (*zot*) toxin genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non O1 strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 1995a, 11: 572-577.
183. Rivera IG, Chowdhury MAR, Huq A, Jacobs D, Martins MT, Colwell RR. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. **Appl. Envir. Microbiol.** 1995b, 61(8):2898-2904.
184. Rivera ING, Chun J, Huq A, Sack RB, Colwell RR. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Appl. Envir. Microbiol.** 2001, 67(6): 2421-2429.
185. Rosen G. **Uma História da Saúde Pública**. São Paulo: Hucitec/Ed. Unesp, 1994.
186. Ryang DW, Koo SB, Shin MG, Suh SP. Molecular typing of *Vibrio vulnificus* isolated from clinical specimens by pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 52 (2):38-41, 1999.
187. Rubin A. **Pesquisa de *Vibrio cholerae* na água do mar e do zooplâncton na região costeira da São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2000.
188. Ruppert EE e Barnes RD. **Zoologia dos Invertebrados**, 6.<sup>a</sup> edição, Ed. Roca, págs. 353-472, 1996.
189. Saha MK, Dutta P, De SP. Possibility of public health hazards by contamination of toxin producing *Vibrio cholerae* through fishes reared in sewage fed fishery. **Indian J. Public Health**, 1999, 43(2):71-72.
190. Salazar-Lindo E. Cholera in Peru, 1991: the extent of the epidemic, modes of transmission, and lessons learned. In: Castro AFP, Almeida WF. **Cholera on the American Continents**. Washington: ILSI Press, p. 21-26, 1993.
191. Sambrook J, Frits EF, Maniatis T. **Molecular cloning. A laboratory manual**, 2<sup>nd</sup> ed, Cold Spring Harbor. Laboratory Press, USA, 1989.
192. Santos ASR. A importância e a proteção jurídica dos manguezais. **Rev. Direito Ambiental** (2), 105-109, 1995.

193. Santos GV. **Composição e microdistribuição de uma comunidade de algas bentônicas no recife de coral da praia da Coroa (Ilha de Itaparica, Bahia, Brasil).** 1992. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pe.
194. Sato MI, Sanchez PS, Rivera IG, Martins MT. Survival of culturable *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 in seawater, freshwater and wastewater and effect of the water environment on enterotoxin production. **Rev. Microbiol.**, 26: 83-89, 1995.
195. Schaffer-Novelli Y. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. **Caribbean Ecological Research**, São Paulo, p. 64, 1995.
196. Schwartz GAD. A saúde na pós-modernidade. **Rev. Direito Sanitário**, 3(1):29-37, 2002.
197. Seas C, Miranda J, Gil AI, Leon-Barua R, Patz J, Huq A, Colwell RR, Sack RB. New insights on the emergence of cholera in Latin America during 1991: the Peruvian experience. **Am. J. Trop. Med, Hyg.**, 2000, 62(4):513-517.
198. Shandera WX, Johnston JM, Davis BR. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Clinical characteristics and epidemiology. **Ann. Intern. Med.** 99:169-171, 1983.
199. Shangkuan YH, Chang YH, Yang JF, Lin HC, Shaio MF. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. **Lett. Appl. Microbiol.**, 32(3):139-145, 2001.
200. Sharma C, Ghosh A, Dalsgaard A, Forslund A, Ghosh RK, Bhattacharya SK, Nair GB. Molecular evidence that distinct *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strain in Calcutta may have spread to the African continent. **J. Clin. Microbiol.**, 36(3):843-844, 1998a.
201. Sharma C, Thungatpathra M, Ghosh A, Mukhopadhyay AK, Basu A, Mitra R, Basu I, Bhattachacharya SK, Shimada T, Ramamurthy T, Takeda T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholerae-like disease in Calcutta, India. **J. Clin. Microbiol.**, 36(3):756-763, 1998b.

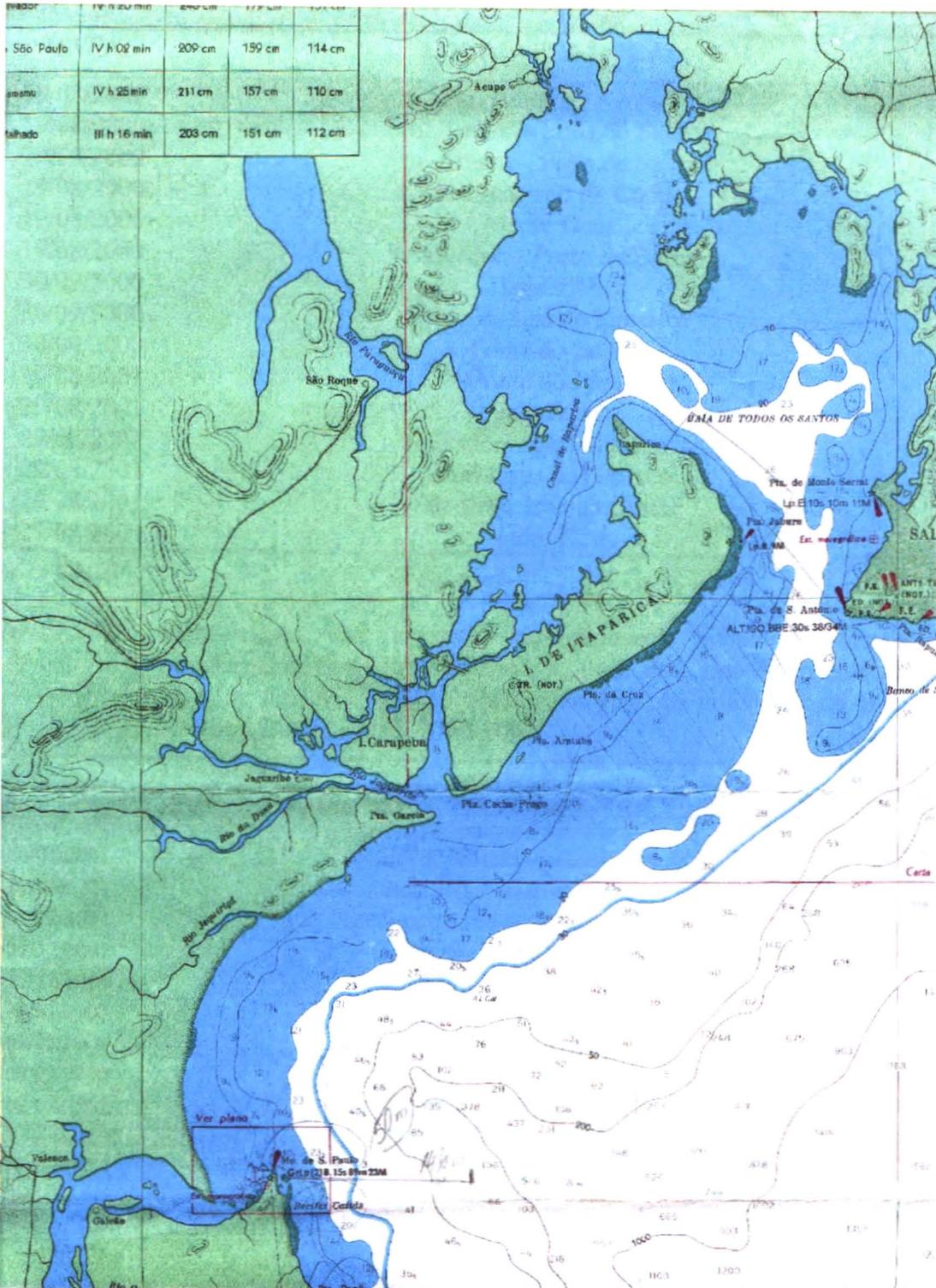
202. Singh DV, Matté MH, Matté GR, Jiang S, Sabeena F, Shukla BN, Sanyal SC, Huq A, Cowell RR. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. **Appl. Envir. Microbiol.** 2001, 67 (2): 910-921.
203. Silva EM, Accioly MC, Navarro MFT, Chastinet CBA. Baía de Todos os Santos: situação atual e perspectivas. **R. Econ. Nord.** Fortaleza, v.27, n.2, p. 207-232, 1996.
204. Silva Filho CM. Desigualdades na distribuição de serviços de atenção à saúde no Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado. Depto. de Saúde, UEFS/BA, 2000.
205. Silveira IA, Oliveira RM, Carvalho EP, Carvalho D, Pilon L. Aspectos gerais, positivos e negativos da utilização de marcadores PCR-RAPD na identificação de microrganismos. **Bol. SBCTA**, 34(2): 77-83, jul-dez. 2000.
206. Smith SK, Sutton DC, Fuerst JÁ, Reichelt JL. Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* MacDonell and Cowell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 41: 529-534, 1991.
207. Snow, J. **On the mode of communication of cholera.** 2nd. Ed., London: Churchil, 1855.
208. Sousa GS. 1587. **Tratado Descritivo do Brasil.** Ed. Brasiliana, (4.<sup>a</sup> ed., 1971), Companhia Editora Nacional/USP, São Paulo/SP.
209. Splengler L. Título desconhecido. Skr. Nat. Selsk., p.?, Copenhagen, 1794.
2010. Tagomorik K, Iida T, Honda T. Comparison of genome structures of víbrios, bactéria possessig two chromosomes. **J. Bacteriol.**, 184 (16): 4351-4358, 2002.
211. Tamplin ML, Gauzens AL, Huq A, Sack DA, Colwell RR. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, 56: 1977-1980,1990.
212. Thacker SB, Berkelman RL. (1988). Public Health Surveillance in the United States. **Epidemiological Reviews** 10:164-190.
213. Tommazi LR. **Poluição marinha no Brasil: síntese do conhecimento.** Publicação Especial, Instituto Oceanográfico USP, São Paulo, n.º5, 1987.

214. Trabulsi LR. **Microbiologia**, pág. 25-28. Ed. Atheneu, RJ/SP, 1991.
215. UFBA. 1993. **Minuta Relatório Situação do Saneamento Básico em Salvador**. Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola Politécnica UFBA, Salvador/Ba.
216. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Biblioteca/CIR. **Guia de Apresentação de Teses/Grupo de trabalho, Angela Maria Belloni Cuenca, Daisy Pires Noronha, Maria Lúcia Evangelista de Faria Ferraz, Maria Teresinha Dias de Andrade**. São Paulo: A Biblioteca; 1998.
217. Versalovic J, Koeuth T, Lupiski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acid Res.** 24: 6823-6831, 1991.
218. Viola, E. O regime internacional de mudanças climáticas e o Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Soc.** 17(50): 25-46, 2002.
219. Waldor MK, Mekalanos JJ. (1996). Lysogenic conversion by filamentous phage encoding cholerae toxin. **Science** 272:1910-1914.
220. Waldor MK, Rubin EJ, Pearson GDN, Kimsey H, Mekalanos JJ. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXO are encoded by region RS2. **Mol. Microbiol.**, (1997), 24(5), 917-926.
221. Waldman EA, Silva LJ, Monteiro CA. Trajetória das doenças infecciosas: da eliminação da poliomielite à reintrodução da cólera. In: **Velhos e novos males da saúde no Brasil**, C. A. Monteiro (org.) Ed. Hucitec (NUPENS/USP), págs. 195-244, São Paulo, SP, 1995.
222. Waldman EA. Usos da vigilância e da monitorização em Saúde Pública. **IESUS**, VII(3), 1998.
223. Wartchow D. **Aspectos de planejamento da infra-estrutura e saneamento urbano nas cidades brasileiras e o modelo ideal de saneamento urbano**. In: Palestra-Seminário “Águas”, 1993, UFBA, Salvador/Ba.
224. West PA. The human pathogenic vibrios – a public health update with environmental perspectives. **Epidem. Inf.**, 103:1-34, 1989.
225. West PA e Colwell RR. **Identification and classification of Vibrionaceae. An overview**. In Colwell RR & Hatzen MB. *Vibrios in the environment*. New York, John Willey Sons, p. 285-363. 1983.

226. Wood PC. **Manual de higiene de los mariscos**. 1.ªed. Ed. Acribia, Zaragoza, 1979.
227. World Health Organization. **Guidelines for Cholera Control**. Programme for Control of Diarrhoea Diseases, Geneva. World Health Organization/CDD/SER/80.4. Rev:3,1993.
228. Wylie JC. **Mares sujos e correntes poluídas**. In: Biologia Social, Wallace B. (org.) p.143, ed. EDUSP & LTC, Rio de Janeiro, 1978.
229. Zanetti S, Spanu T, Deriu A, Romano L, Sechi LA, Fadda G. *In vitro* susceptibility of *Vibrio spp.* isolated from the environment. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 2001;17 (5):407-409.
230. Zhu J, Miller MB, Vance RE, Dziejman M, Bassler BL, Mekalanos JJ. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 2002, 99(5): 3129-3134.
231. [www.bibvirt.futuro.usp.br](http://www.bibvirt.futuro.usp.br) 2001.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 – Carta Náutica da Baía de Todos os Santos e Valença:



ANEXO 2 – Locais de coleta das amostras de plâncton com data de coleta, na área da BTS, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	LOCAL/SUB-LOCAL
19/08/2000	Sto. Amaro – Acupe
19/08/2000	Sto. Amaro – Praia de Salinas
19/08/2000	Sto. Amaro – Praia de Salinas
19/08/2000	São Francisco do Conde
19/08/2000	Madre Deus
19/08/2000	Salvador – Porto da Barra
30/09/2000	Jaguaripe
30/09/2000	Ponta da Ilha de Itaparica
30/09/2000	Ponte do Funil
29/08/2001	Ponte do Funil
29/08/2001	Jaguaripe
29/08/2001	Salvador – Porto da Barra
29/08/2001	Bom Jesus dos Pobres
29/08/2001	São Francisco do Conde
29/08/2001	Madre Deus

ANEXO 3 – Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “chumbinho”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
10/05/2001		X			Feira de Santana – peixaria 1	Alagoas
20/05/2001		X			Feira de Santana – peixaria 2	Valença (BA)
29/08/2001	X				Bom Jesus – marisqueira	Bom Jesus (BA)
01/12/2001				X	Santo Antônio de Jesus – feira-livre	origem desconhecida
01/12/2001				X	Nazaré – feira-livre	Salinas (BA)
15/12/2001				X	Feira de Santana – feira-livre	Maragogipe (BA)
05/01/2002				X	Maragogipe – mercado de mariscos	Maragogipe (BA)
09/02/2002			X		Camaçari – C. Abastecimento	Acupe (BA)
09/02/2002				X	Lauro de Freitas – feira-livre	Jeribatuba (BA)
09/02/2002			X		Simões Filho – C. Abastecimento	Acupe (BA)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados;

C: moluscos bivalves desconchados e congelados;

R: moluscos bivalves

TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente.

ANEXO 4 – Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “lambreta”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
09/06/2001	X				Valença – mercado de mariscos	Valença (BA)
13/06/2001	X				Salvador – feira-livre 2	Valença (BA)
13/06/2001	X				Salvador – feira-livre 1	Ilha de Itaparica (BA)
13/06/2001	X				Salvador – feira-livre 2	Maceió (AL)
13/06/2001	X				Salvador – feira-livre 2	Canavieiras (BA)
13/06/2001	X				Salvador – feira-livre 1	Valença (BA)
01/09/2001				X	Cruz das Almas – mercado público	Maragogipe (BA)
07/10/2001	X				Salvador – feira-livre 1	Valença (BA)
01/12/2001	X				Santo Antônio de Jesus – feira-livre	origem desconhecida
01/12/2001	X				Estrada da Ponte do Funil	Caçães (Ilha de Itaparica)
15/12/2001				X	Feira de Santana – feira-livre	Maragogipe (BA)
15/12/2001	X				Feira de Santana – ambulante	Saubara (BA)
15/12/2001	X				Feira de Santana – ambulante	Maragogipe (BA)
05/01/2002	X				Salvador – feira-livre 1	Maceió (AL)
05/01/2002	X				Salvador – feira-livre 1	Canavieiras (BA)
05/01/2002	X				Salvador – feira-livre 1	Caçães (Ilha de Itaparica)
09/02/2002	X				Lauro de Freitas – feira-livre	Jeribatuba (BA)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados;

C: moluscos bivalves desconchados e congelados;  
TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente.

R: moluscos bivalves

ANEXO 5 – Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “mapé”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
29/08/2001			X		São Francisco do Conde - quiosque	S. Franc. do Conde (BA)
29/08/2001	X				Santo Amaro – feira-livre	Acupe (BA)
29/08/2001		X			Salvador – supermercado 2	origem desconhecida
01/09/2001				X	Conceição da Feira – feira-livre	Saubara (BA)
01/09/2001			X		Conceição do Almeida – feira-livre	Maragogipe (BA)
01/09/2001			X		Maragogipe – mercado de mariscos	Maragogipe (BA)
15/12/2001			X		Feira de Santana – feira-livre	Maragogipe (BA)
05/01/2002			X		Maragogipe – mercado de mariscos	Maragogipe (BA)
05/01/2002	X				Santo Amaro – feira-livre	Acupe (BA)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados;

C: moluscos bivalves desconchados e congelados;  
TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente.

R: moluscos bivalves

ANEXO 6 – Identificação das amostras de moluscos bivalves alóctones, referenciados como “mexilhão” (*Mytilidae*, não pertencentes ao gênero *Mytella*), segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
09/06/2001		X			Valença – mercado de mariscos	Rio de Janeiro
06/08/2001		X			Feira de Santana – supermercado 1	origem desconhecida
06/08/2001		X			Feira de Santana – supermercado 2	origem desconhecida
30/08/2001		X			Feira de Santana – supermercado 4	origem desconhecida
01/12/2001				X	Nazaré – feira-livre	Salinas (BA)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados; C: moluscos bivalves desconchados e congelados; TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente. R: moluscos bivalves

ANEXO 7 – Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “ostra”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
10/05/2001		X			Feira de Santana – peixaria 1	Iguape (BA)
09/06/2001		X			Guaibim – peixaria	Guaibim (BA)
09/06/2001			X		Valença – mercado de mariscos	Valença (BA)
09/06/2001		X			Valença – mercado de mariscos	Valença (BA)
13/06/2001			X		Salvador – feira-livre 2	Valença (BA)
13/06/2001			X		Salvador – feira-livre 1	Ilha de Itaparica (BA)
13/06/2001		X			Salvador – peixaria 1	Valença (BA)
13/06/2001	X				Salvador – feira-livre 2	Valença (BA)
06/08/2001		X			Feira de Santana – supermercado 1	origem desconhecida
06/08/2001		X			Feira de Santana – supermercado 2	origem desconhecida
06/08/2001		X			Feira de Santana – supermercado 3	origem desconhecida
29/08/2001		X			São Gonçalo dos Campos – peixaria	Acupe (BA)
29/08/2001			X		Salvador – supermercado 1	origem desconhecida
29/08/2001		X			Bom Jesus – peixaria	Bom Jesus (BA)
29/08/2001				X	Candeias – ambulante	Passé (BA)
30/08/2001		X			Feira de Santana – supermercado 4	origem desconhecida
01/09/2001				X	Conceição da Feira – feira-livre	Saubara (BA)
01/09/2001			X		Cachoeira – feira-livre	Iguape (BA)
01/09/2001				X	Muritiba – feira-livre	Maragogipe (BA)
01/09/2001				X	Cruz das Almas – mercado público	Maragogipe (BA)
01/09/2001			X		Conceição do Almeida – feira-livre	Maragogipe (BA)
1º/12/2001			X		Ilha de Itaparica – marisqueira	Jeribatuba (BA)
1º/12/2001				X	Nazaré – feira-livre	Salinas (BA)
05/01/2002		X			Salvador – feira-livre 1	Valença (BA)
05/01/2002	X				Salvador – feira-livre 2	Valença (BA)
09/02/2002			X		Camaçari – C. Abastecimento	Acupe (BA)
09/02/2002			X		Simões Filho – C. Abastecimento	Acupe (BA)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados; C: moluscos bivalves desconchados e congelados; TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente. R: moluscos bivalves

ANEXO 8 – Identificação das amostras de moluscos bivalves composta por várias espécies identificados para venda como “sarnambi”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
29/08/2001		x			Salvador – supermercado 2	Origem desconhecida
30/08/2001		x			Feira de Santana – supermercado 4	Origem desconhecida
01/09/2001				x	Muritiba – feira-livre	Maragogipe (BA)
01/09/2001				x	Cruz das Almas – mercado público	Maragogipe (BA)
09/02/2002				x	Candeias – C. Abastecimento	Passé (BA) (*)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados;

C: moluscos bivalves desconchados e congelados;

R: moluscos bivalves

TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente.

(\*) Houve dúvida proveniente do próprio vendedor quanto à denominação do molusco bivalve (sarnambi ou chumbinho).

ANEXO 9 – Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “sururu”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
10/05/2001		x			Feira de Santana – peixaria 1	Sergipe
20/05/2001		x			Feira de Santana – peixaria 2	Bom Jesus (BA)
20/05/2001		x			Feira de Santana – peixaria 2	Valença (BA)
09/06/2001		x			Valença – peixaria 1	Valença (BA)
09/06/2001			x		Valença – mercado de mariscos	Valença (BA)
13/06/2001			x		Salvador – feira-livre 1	Maceió (AL)
13/06/2001			x		Salvador – feira-livre 2	Guarajuba (BA)
13/06/2001			x		Salvador – feira-livre 1	Valença (BA)
13/06/2001		x			Salvador – peixaria 2	Valença (BA)
06/08/2001		x			Feira de Santana – supermercado 1	origem desconhecida
06/08/2001		x			Feira de Santana – supermercado 2	origem desconhecida
06/08/2001		x			Feira de Santana – supermercado 3	origem desconhecida
29/08/2001		x			São Gonçalo dos Campos – peixaria	Acupe (BA)
29/08/2001			x		Salvador – supermercado 1	origem desconhecida
29/08/2001				x	Santo Amaro – feira-livre	Acupe (BA)
29/08/2001	x				Santo Amaro – feira-livre	Acupe (BA)
30/08/2001		x			Feira de Santana – supermercado 4	origem desconhecida
01/09/2001			x		Cachoeira – feira-livre	Iguape (BA)
01/09/2001	x				Cachoeira – feira-livre	Iguape (BA)
01/09/2001				x	Muritiba – feira-livre	Maragogipe (BA)
01/09/2001				x	Cruz das Almas – mercado público	Maragogipe (BA)
01/09/2001	x				Conceição do Almeida – feira-livre	Maragogipe (BA)
01/09/2001				x	Maragogipe – mercado de mariscos	Maragogipe (BA)
1º/12/2001	x				Santo Antônio de Jesus – feira-livre	Ilha de Itaparica (BA)
01/12/2001				x	Nazaré – feira-livre	Salinas (BA)
26/01/2002				x	Feira de Santana – feira-livre 2	Maragogipe (BA)
09/02/2002				x	Candeias – Centro de Abastecimento	Ilha de Maré (BA)
09/02/2002				x	Candeias – C. Abastecimento	Passé (BA)
09/02/2002				x	Camaçari – C. Abastecimento	Acupe (BA)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados;

C: moluscos bivalves desconchados e congelados;

R: moluscos bivalves

TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente.

ANEXO 10 – Identificação das amostras de moluscos bivalves conhecidos popularmente como “talioba”, segundo data, tipo de apresentação, local de coleta e origem, obtidos na área de influência da BTS e Valença, Bahia, Brasil, 2000-2002.

DATA	Apresentação				LOCAL/SUB-LOCAL	ORIGEM
	NC	C	R	TA		
29/08/2001			X		São Francisco do Conde – quiosque	S. Franc. do Conde (BA)
01/09/2001				X	Maragogipe – mercado de mariscos	Maragogipe (BA)
05/01/2002				X	Maragogipe – mercado de mariscos	Maragogipe (BA)
05/01/2002	X				Santo Amaro – feira-livre	Acupe (BA)

NC: moluscos bivalves na concha; desconchados e resfriados;

C: moluscos bivalves desconchados e congelados;

R: moluscos bivalves

TA: moluscos bivalves desconchados e expostos à temperatura ambiente.

**ANEXO 11 – Meios de Cultura:****Água Peptonada Alcalina 1% (APA)**

Triptona .....10,0g

NaCl.....10,0g

Completar com água destilada para 1 litro

Ajustar pH para 8,6

Autoclavar por 20 minutos a 120°C

**Meio de Luria (meio L ou Caldo Luria)**

Triptona .....10 g/l

Extrato de Levedura .... 5g/l

NaCl.....10g/l

Ajustar o pH para 7,2

Esterilização por autoclavagem a 120°C/20min

**Meio L ágar (meio LA)**

meio L contendo 15g/l de ágar bacteriológico

**Meio L “soft ágar” (meio estoque para transporte)**

meio L ágar com 0,8% de ágar bacteriológico

**Ágar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Bile, Sacarose)**

Preparado conforme instruções do fabricante:

92,08 g ..... 1 litro de água destilada

Aquecer na chama até levantar fervura e espalhar em placas.

**Ágar Kliegler Ferro**

Preparado conforme instruções do fabricante:

57,5 g ..... 1 litro de água destilada

suplementado com 25 g de NaCl (para concentração final de 3%; o meio já vem com 0,5% de sal)

Dissolver o meio na chama. Distribuir em tubos próprios vedados com algodão.

Autoclavar a 120°C por 20 minutos.

Inclinar os tubos ainda quentes.

**Meio mínimo com única fonte de carbono (MBM)****Fase líquida:**

MgSO<sub>4</sub> .....0,05g

NaCl .....2,5g

NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ....2,5g

KOH .....0,5g

Ajustar o pH para 6,5

Completar para 500ml

Filtrar em condições estéreis e conservar a 4°C.

Fase sólida:

Ágar bacteriológico .....16g

H<sub>2</sub>O destilada ..... 500ml

Autoclavar

Após autoclavagem, misturar as duas fases apenas no momento do uso, adicionando também etanol filtrado a 1%.

## **ANEXO 12 – Reagentes**

Reativo de Erlich (teste de Indol)

Paradimetilamino benzaldeído ..... 1g

Ácido ortofosfórico ..... 20mL

Álcool absoluto ..... 50mL

Água destilada q.s.p..... 100mL

Dissolver o paradimetilamino benzaldeído no álcool absoluto.

Colocar um pouco de água destilada na proveta acrescentando a mistura acima mais o ácido. Completar o volume final para 100mL.

## **ANEXO 13 – Meios, soluções e reagentes para a série bioquímica:**

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico

Solução salina 0,9%

NaCl .....2,25g

Completar com água para 250mL

Vaselina líquida

Autoclavar pequenas quantidades (20mL)

Meios para análise do crescimento em diferentes concentrações de sal:

Meio com 0% NaCl

Peptona .....2,5g

Água destilada ...250ml

Acertar o pH para 8,6

Meio com 6% NaCl

Idem, acrescentando 15g de NaCl

Meio com 8% NaCl

Idem, acrescentando 20g de NaCl

Meio com 10% NaCl

Idem, acrescentando 25g de NaCl

### **ANEXO 13.1 Crescimento em presença de aminoácidos:**

Base Moeller

Base .....7,875g

NaCl.....22,5g

Completar com água destilada para 750ml

Ajustar o pH para 6,8

Teste da Lisina

Lisina ..... 2,5g

Base Moeller ... 250ml

Teste da Ornitina

Ornitina .....2,5g

Base Moeller....250ml

Arginina

Peptona .....0,25g

Fosfato de potássio....0,08g

Ágar .....0,75g

NaCl.....7,5g

Dissolver os componentes em 250ml de água destilada e ferver.

Após fervura, acrescentar 2,5g de arginina.

Acertar o pH para 6,8.

Depois adicionar 1,25ml de solução 0,2% de vermelho fenol.

**Proteinase K**

20mg de proteinase K

2ml de água miliQ

**Etanol 70%**

Etanol em água destilada para concentração final de 70%

Manter gelado

**ANEXO 13.2 Teste com carboidratos:****Base “purple broth” 3% de NaCl**

Tryptona (peptona protease) .....12,5g

Extrato de carne .....1,25g

NaCl.....37,5g

Solução púrpura BC .....1,25ml

Ajustar pH para 6,8

Completar com água destilada para 1250ml

**Arabinose**

Arabinose.....2,5g

Base.....250ml

**Sacarose**

Sacarose.....2,5g

Base.....250ml

**Manitol**

Manitol.....2,5g

Base.....250ml

**Salicina**

Salicina .....2,5g

Base.....250ml

**Manose**

Manose.....2,5g

Base.....250ml

Todos os meios para o teste de utilização de carboidratos devem ser autoclavados a 121°C por 10 min.

**ANEXO 13.3 Redução de nitratos:**

## Nitrato

Peptona .....1,25g  
Extrato de carne....0,75g  
KNO<sub>3</sub>.....0,25g  
NaCl.....7,5g  
Ajustar o pH para 6,8.  
Acrescente água para 250ml.

**Reativo para nitratos**

## Ácido acético 30%

## Solução A

Ácido sulfanílico.....0,8g  
Solução de ácido acético 30%.....100ml

## Solução B

Naftilamina .....0,5g  
Solução ácido acético 30%....100ml

**ANEXO 13.4 Hidrólise da Esculina**

Dissolver BHI, NaCl e ágar com água sob fervura.  
Acrescentar esculina e ferver.  
Adicione 0,13g de cloreto férrico e ferver.  
Completar com água destilada para 250ml.

**ANEXO 14 Reagentes para extração do DNA genômico:**

## TE I (Tampão Tris-EDTA)

Tris-HCl pH 8,0 10mM  
EDTA pH 8,0 1mM

## SDS 10%

Dodecil sulfato de sódio, solução a 10% em água destilada  
Ajustar o pH para 7,2

## Solução CTAB/NaCl

CTAB (Brometo de cetilmetilamônio) 5%

NaCl.....0,7M

Aquecer com agitação constante até dissolução completa dos grumos.

Utilizar pré-aquecido a 65°C

#### TE II (Tampão Tris-EDTA)

Tris-HCl pH 8,0      10mM

EDTA    pH 8,0      0,1mM

#### ANEXO 15 Soluções de eletroforese:

##### Agarose 1%

Agarose.....1g

TBE 1 X.....100ml

##### TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA)

Solução 50X (estoque)

Tris-base.....242g

Ácido acético glacial.....57,1ml

EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8,0.....100ml

Água destilada q.s.p.....1000ml

##### Solução de Brometo de etídio 1%

EtBr.....1,0g

Água destilada.....100ml

(esta solução deve ser guardada em frasco escuro protegido da luz)

##### Corante Vistra Greem

Uso sem diluição, conforme instruções do fabricante

##### TBE 10X

Tris-borato.....89,0mM

EDTA.....2,0mM

Ajustar o pH para 8,0.

##### Solução de azul de bromofenol

Azul de bromofenol.....0,25%

Glicerol.....60%

##### DNA ladder 1,0 µg/µl

Lote 11033-8, Gibco

**ANEXO 16 Materiais e Reagentes usados nas PCR:**

Enzima Taq DNA Polimerase

Lote 136124, Promega, WI, USA

MgCl<sub>2</sub> 10X, dNTP's e tampão de Taq, provenientes do kit Promega.

Oligonucleotídeos utilizados nas reações PCR-Multiplex para antígeno O1 e O139:

O1 F2 5' GTTTCACTGAACAGATGGG 3'

O1 R2 5' GGTCATCTGTAAGTACAAC 3'

O139 F2 5' AGCCTCTTTATTACGGGTGG 3'

O139 R2 5' GTCAAACCCGATCGTAAAGG 3'

Oligonucleotídeos utilizados nas reações ERIC-PCR:

ERIC 1R (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3')

ERIC 2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3')

Enzima Taq DNA Polimerase

Lote 136124, Promega WI, USA

Demais reagentes: MgCl<sub>2</sub> 10X, dNTP's e tampão de Taq, provenientes do kit Promega.