

INCORPORAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Vibrio cholerae* O1 NÃO TOXIGÊNICO EM
OSTRAS (*Crassostrea brasiliana*), VIVAS¹

Dilma Scala GELLI²
Miyoko JAKABI²
Ivany Rodrigues de MORAES³
Nélida del MASTRO⁴

RIALA 06/862

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; de MORAES, I. R. & MASTRO, N. del - INCORPORAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Vibrio cholerae* O1 NÃO TOXIGÊNICO EM OSTRAS (*Crassostrea brasiliana*), VIVAS. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 33-37, 1999.

RESUMO: As ostras são moluscos bivalves que, com frequência, são consumidas cruas. Podem ser objeto de processos de depuração (descontaminações físicas e químicas), pois este hábito de consumo está associado a eventos de doenças transmitidas por alimentos em vários países. No presente trabalho, foram realizados testes para verificar a possibilidade de contaminação de ostras em laboratório, com o objetivo de estabelecer modelo para avaliações de processos de depuração. As ostras foram mantidas vivas em água do mar previamente ozonizada. Foi procedida a contaminação da água com *Vibrio cholerae* El Tor O1 não toxigênico. Foram realizadas determinações analíticas da água e das ostras imediatamente após e depois de 2, 4, 12, 18 e 24 horas da contaminação. Após 2 horas, as ostras apresentaram positividade para o *V. cholerae* usado no experimento, em até a diluição 10^7 , igual ao número inicial de células viáveis imediatamente após a contaminação. Os níveis de presença da cepa testada manteve-se elevada, tanto na água como nas ostras, durante todo o período de observação (até a diluição 10^9 na água e 10^8 nas ostras). Os resultados obtidos indicam que este método é útil, pois permite a manutenção da viabilidade das ostras. A avaliação da eficácia e eficiência de processos tecnológicos de depuração (descontaminação), como o uso de ozônio e de radiação ionizante, pode ser conduzida, mantendo os parâmetros reais, inclusive com a presença da microbiota autóctone destes moluscos. A comparação das diluições positivas no decorrer do experimento, demonstram que a cepa adaptou-se às condições do experimento, apresentando inclusive multiplicação. Foram realizados três testes independentes (triplícata), para observar possíveis variações na incorporação da cepa.

DESCRITORES: Ostras, contaminação laboratorial. Incorporação de *V. cholerae* em ostras.

1. Trabalho realizado na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, projeto no. 8029/RB, IAEA (International Atomic Energy Agency). Parte da Dissertação de Mestrado de Moraes, I.R. "Estudo da Sensibilidade do *Vibrio cholerae* O1 à Radiação Gama de ^{60}Co in vitro e in vivo em ostras (*Crassostrea brasiliana*) artificialmente contaminadas". São Paulo, 1996. Tese (Mestrado) — IPEN-USP.

2. Da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz

3. Pós graduanda do IPEN/CNEN — SP

4. Pesquisadora Titular do IPEN/CNEN — SP

INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves¹ são organismos marinhos que, na fase adulta, tem hábitos e características particulares: são encontrados em áreas da costa marítima, fixos sobre e/ou ao redor de rochas ou de outras superfícies sólidas; apresentam duas valvas (conchas) que podem ser movimentadas por um músculo adutor e possuem uma estrutura biológica, na superfície da sua estrutura interna, denominada de manto. O manto é a estrutura que promove a captação de alimento: a água é dirigida, através do movimento de cílios laterais, para a parte inalante da cavidade do manto que, ao filtrá-la, retém as partículas em suspensão na água circundante. As partículas retidas pelo manto são dirigidas para o sistema digestivo. As partículas maiores são eliminadas através de contrações musculares. Os moluscos bivalves se alimentam do plancton (zôo e fitoplâncton) presentes na água do mar da área onde está fixado. Quando em atividade alimentar, as ostras podem filtrar até 6L de água por hora¹³. São considerados “animais sentinelas” da possível presença de microrganismos patogênicos no ambiente em que vivem, em função do seu processo de captura de alimentos que permite que microrganismos e substâncias químicas em suspensão na água do mar sejam concentrados em seus corpos². Toxinas elaboradas por algas do ambiente marinho são veiculadas ao homem pelo consumo de moluscos bivalves, notadamente ostras. Estas toxinas são denominadas genericamente de toxinas marinhas¹¹. No que se refere aos microrganismos, os moluscos bivalves podem ser veículos de bactérias, vírus e parasitos patogênicos ao homem^{1,5,7,11,12}.

Por serem usados como alimentos, os moluscos bivalves são uma preocupação constante em termos de saúde pública. Levantamentos epidemiológicos identificam este organismo como veiculador de Enfermidades Transmitidas por Alimentos, seja de origem biológica (toxinas marinhas como a Toxina Paralisante dos Moluscos (TPM/PSP -Paralytic Shellfish Poison), a Toxina Diarréica dos Moluscos (TDM/DSP — Diarrhetic Shellfish Poison), as bactérias patogênicas (*Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*), determinados vírus (como da hepatite infecciosa), determinados parasitos, contaminantes químicos (contaminantes inorgânicos), e outros^{1,5,7,11,12}. Acrescente-se a isto o fato de que, dentre os moluscos bivalves, as ostras são consumidas também e principalmente sem cocção prévia⁵. Os apreciadores deste alimento o preferem ainda vivo, o que representa uma segurança de que o produto não está deteriorado e que seu valor nutritivo e sabor característicos estão preservados. Considerando a situação de risco que o consumo deste produto pode gerar, algumas medidas são indicadas para diminuir/controlar a carga de contaminação

que possam apresentar: autorização de extração dos moluscos bivalves somente de áreas marinhas controladas e aprovadas, depuração (pelo uso de água de qualidade controlada, tratada por luz ultra violeta e/ou adicionada ou não de cloro e/ou através de tratamento por ozônio) e radiação ionizante (1,5 a 3,0 kGy), entre outras^{4,6,8,9,10}.

Os ensaios realizados em laboratório para verificar a eficácia dos tratamentos (processos de depuração) assinalados, para o controle de patógenos possivelmente presente nos moluscos bivalves são, no geral, realizados através da contaminação dos moluscos não mais vivos, seja por abertura forçada de suas conchas ou após esterilização por calor ou radiação ionizante. No que se refere às ostras existentes no Brasil, o processo de morte é iniciado com a abertura forçada das valvas do organismo para acesso às partes comestíveis, pois quando retirada da água a mesma mantém as valvas hermeticamente fechadas. Os dados bibliográficos disponíveis relatam avaliações laboratoriais da eficiência destes tratamentos, porém considerando a diminuição da carga bacteriana autóctone, ou então por contaminações *post mortem*, por processo esterilizante prévio.

O presente ensaio foi realizado para delinear experimentalmente a contaminação de ostras (*Crassostrea brasiliiana*) mantidas vivas, com *Vibrio cholerae*, tendo por base sua forma de captação natural de alimentos.

MATERIAL E MÉTODO

Material:

Foram usadas 180 ostras (*Crassostrea brasiliiana*), procedentes de Cananéia, de planta de depuração de ostras por ozônio, em 3 lotes diferentes (60 por lote). As amostras de ostras foram transportadas sob refrigeração, acondicionadas em caixas de madeira, em camadas separadas por folhas de samambaia para manter a umidade necessária à sobrevivência das mesmas. As ostras foram recebidas pelo laboratório previamente limpas, por processo de remoção de cracas e organismos marinhos de hábitos fixos e de outras possíveis sujidades aderidas sobre a superfície externa de suas conchas e já tratadas pelo processo de ozonização (depuração em tanques, com borbulhamento de ozônio).

Foram usados 150L de água do mar da região de Cananéia, recebidas em 3 porções separadas, acondicionadas em galões de plástico atóxicos previamente higienizados e transportadas sob refrigeração.

Microrganismo empregado: *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa, não toxigênico, procedente da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

Cultura para contaminação da água: em 20mL de Água Peptonada Alcalina (APA), foi semeado o microrganismo selecionado. Incubação a 35°C por 18-24h.

Aquário em vidro atóxico, capacidade para 60L de água.

Método:

Cerca de 40L de água foi vertida no aquário, no qual foram distribuídas 30-35 ostras. Foi procedido ao borbulhamento do ozônio por cerca de 30 minutos, usando aparelho tipo doméstico, com a finalidade de agitar e assim oxigenar a água, para estimular a abertura das valvas. Após esta agitação com conseqüente oxigenação, foi retirada uma amostra de água (aproximadamente 20mL) e 5 ostras para análise (controle inicial). Foi então adicionada à água 10mL da cultura do *V.cholerae* selecionado. Imediatamente após a contaminação e após períodos de 2, 4, 12, 18 e 24h, foram retiradas amostras de água e de ostras para fins de análise: 20mL de água, coletada após mistura da mesma e 5 unidades de ostras.

Análise das amostras de água: procedeu-se à diluição seriada da amostra, por transferência de 1mL da diluição precedente em 9 mL de APA estéril, até a diluição 10⁻¹⁰. Após incubação a 35°C/18-20h, o material de cada diluição foi semeado em superfície de agar TCBS (Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose). Após incubação a 35°C por 18-24h, 3 a 5 colônias características e suspeitas de cada diluição positiva foram isoladas em meio IAL e em superfície de agar T₁N₀ e T₁N₁ (meio sólido, com 1% de triptona, não adicionado e adicionado de 1% de cloreto de sódio, respectivamente). Após incubação, as colônias isoladas que apresentaram reações compatíveis com as de *V. cholerae*, foram testadas frente a oxidase e por sorologia polivalente. Foram caracterizadas como positivas as que apresentaram: colônias amarelas em TCBS; indol positivo; fermentação da glicose e da sacarose; oxidase e sorologia positivas; desenvolvi-

mento em meios com 0 e 1% de NaCl; L-triptofano desaminase, H₂S, urease e produção de gás a partir da glicose, negativos^{1,3,4}.

Análise das amostras de ostras: as mesmas foram abertas com assepsia, com auxílio de abridor de ostras em aço inox, previamente desinfetado. A parte comestível (toda a estrutura interna) foi retirada da concha e recolhida em copo de homogeneizador previamente esterilizado. A homogeneização foi realizada em aparelho tipo líquidificador. Do homogeneizado, foram retiradas 25g, diluídas e cuidadosamente misturadas em 225mL de APA (diluição 10⁻¹). A partir desta, foram preparadas diluições seriadas como já descrito para as amostras de água. As demais etapas analíticas foram realizadas conforme descrito para a água.

Cada etapa analítica acima descrita foi realizada com controle de meios de cultura semeados com a cepa teste (controle positivo) e não semeados (controle de esterilidade).

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados da relação do número de *V. cholerae* O1 em água e em ostras, estão expressos na Tabela abaixo.

A análise da água e das ostras, antes da contaminação com a cepa selecionada, revelaram ausência de *V. cholerae*. As diluições maiores do que as constantes na Tabela, foram negativas.

Os resultados expressos na Tabela são indicativos de que o ensaio proposto permite a contaminação de ostras vivas em nível laboratorial, permitindo avaliações de eficiência e eficácia de processos de depuração (descontaminação) destes moluscos, em condições mais próximas das reais.

O número de cinco unidades de ostras, é satisfatório e contribuiu para a representatividade das mesmas, pois tanto a abertura das valvas como o processo de filtração da

Tabela. Maiores diluições positivas de *Vibrio cholerae* O1 não toxigênico, em log de base 10 (log₁₀) nos experimentos de contaminação de água e incorporação de *V.cholerae* O1 El Tor Ogawa não toxigênico em ostras *Crassostrea brasiliiana*, por períodos de exposição (imediatamente após a contaminação da água e de 2, 4, 12, 18 e 24 horas)

Tempo/substrato	0h		2h		4h		12h		18h		24h	
	A	Os	A	Os	A	Os	A	Os	A	Os	A	Os
Experimento 1	-7	Aus	-7	-7	-6	-7	-7	-7	-6	-7	-7	-7
Experimento 2	-7	Aus	-5	-6	-8	-8	-7	-8	-7	-8	-7	-7
Experimento 3	-7	Aus	-7	-7	-7	-7	-9	-7	-7	-7	-6	-7

h= horas A=Água Os=Ostra aus=ausência em 25g

água pode ser heterogênea entre as unidades vivas. Após contato de 2 horas em água artificialmente contaminada, a análise das 5 unidades de ostras apresentaram níveis de *V.cholerae* de mesma grandeza do que na água imediatamente após sua contaminação; nos períodos posteriores de observação, as diluições positivas de células viáveis presentes na água e nas ostras, mantiveram-se correspondentes. A positividade das diluições, nas amostras de água, foi maior após 12h do que a inicial (respectivamente em até 10^{-7} no tempo 0 e em até 10^{-9} após 12h), o que indica que ocorreu a multiplicação da cepa usada no experimento.

Os resultados obtidos em períodos superiores a 2 horas também permitem concluir que a cepa se adaptou

adequadamente no sistema e nas condições do experimento: manutenção, por até 24 horas, de números equivalentes de células viáveis tanto na água como nas ostras, com variações possíveis de ocorrerem em amostras de um mesmo lote de produto e por observações dos resultados das diluições. Observação anterior indica a possibilidade de multiplicação de Vibrionaceae em ostras após a sua captura².

Conclui-se que o processo de captura de alimentos das ostras permite a sua contaminação em nível de laboratório, sem a necessidade de danificar sua estrutura biológica ou inativar sua microbiota natural.

RIALA 06/862

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; de MORAES, I. R. & MASTRO, N. del - EXPERIMENTAL INCORPORATION OF *Vibrio cholerae* O1 NON TOXIGENIC IN LIVE OYSTERS (*Crassostrea brasiliiana*)1. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 58(2): 1999

ABSTRACTS: Oyster are frequently eaten raw and alive. Because of this, are often object of depuration process (physical and chemical decontamination), since its consumption habit has important epidemiological implications. It was performed essays to verify the possibility of live oyster contamination at laboratorial level: oysters was maintained alive in sea water previously ozonized and then contaminated with *Vibrio cholerae* El Tor, O1, Ogawa, non toxigenic. Quantitative analytical determination was realized in sea water and oysters, immediately and 2,4,12,18 and 24h after the contamination. After 2h, oysters presented high numbers of *V. cholerae*, namely positivity in 10^{-7} dilution, compatible with the initial sea water contamination. The levels of the strain used in this experiment was constantly high during the period of observation (positivity till 10^{-9} dilution in water and 10^{-8} in oysters). The results obtained indicate that this contamination may be useful for laboratorial observation of efficacy and efficiency of technological depuration (decontamination) process of oysters, since allow measurements at real conditions. Number of viable cells obtained at different periods of time shows that the strain was capable of adaptation, including multiplication, in this experiment. It was realized three independent experiments.

KEY WORDS — Oysters, laboratorial contamination. *V. cholerae* incorporation in oysters.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA — American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3th. ed. Carl Vanderzant & Don F. Splittstoesser, editores. p. 791.1992.
2. COOK, D.W. and RUPLE, A.D. Indicator bacteria and Vibrionaceae multiplication in postharvest shellstock oysters. *J. Food Protect.* 52:343-349. 1986.
3. ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and others *Vibrio spp.* In *Bacteriological Analytical Manual*, F.D.A. 7th.Ed. 1992. Publicado e distribuído por AOAC International, Arlington, V.A.
4. ICMSF — International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbial Ecology of Foods, vol. 1. *Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. Academic Press. London and N.York. 1980.
5. INSTITUTE OF MEDICINE. Committee on Evaluation of the Safety of Fishery Products. Sea Food Safety. Farid E. Ahmed, editor. National Academic Press. Washington, D.C. Cap. 2,3,4 e 6. 1991.

6. JAY, J.M. Modern Food Microbiology. 4th. Ed. Chapman & Hall. N.York and London. p.297-300 e 342. 1992.
7. KLONTZ, K.C.; TAUXE, R.V.; COOK, W.L.; RILLEY, W.H.; WACHMUTH, K. Cholera after the consumption of raw oysters. *Annals of International Medicine*, v.107, p. 846, 1987.
8. OPS-OMS/IAEA-FAO-ONU. Informe final. Consulta técnica conjunta FAO/IAEA/OPS-OMS sobre el uso de irradiacion como medida de intervencion de salud publica para el control de enfermedades transmitidas por alimentos en Latino America y El Caribe. HPV/FOS/126/92. 1992.
9. RICHARDS, G.P. Microbial purification of shellfish: A review of depuration and relaying. *J. Food Protect.* 51:218-251. 1988.
10. RUBIO, T.C. Uso de la irradiacion como medida de intervencion para controlar enfermedades transmitidas por alimentos en Latino America y El Caribe. 2o. Informe del Contrato de Investigacion 7781/RB, IAEA (International Atomic Energy Agency)/Chile. Abril, 1997.
11. UNIVERSITY OF ADELAIDE, Australia. Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Ian R. Falconer, editor. Academic Press. 1993.
12. VARNAM, A.H. & EVANS, M.G. Foodborne Pathogens — an Illustrated Text. Wolfe Publishing. p.176-177. 1991.
13. WOOD, P.C. The principles and methods employed for the sanitary control of molluscan shellfish. Technical Conference on Marine Pollution and its Effect on Living Resources and Fishing. MP/70/R-12. WHO/FAO. 1970.

Recebido para publicação em 25/06/1998

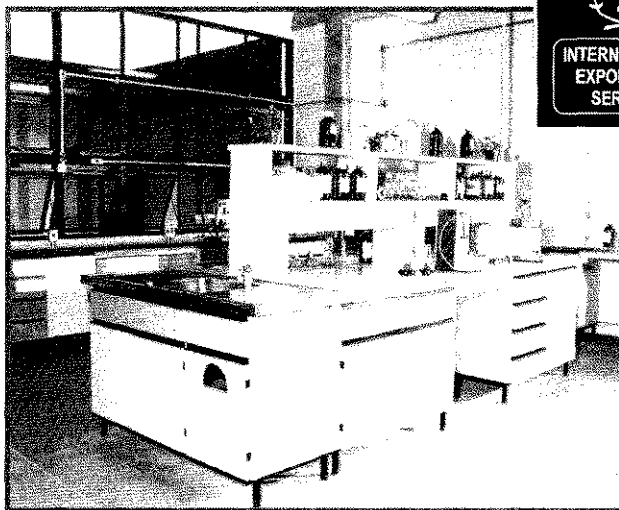
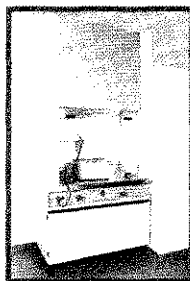
IBRAM. A MELHOR SOLUÇÃO EM MÓVEIS PARA LABORATÓRIOS.

Projetos e Execuções

Arquitetura
Elétrica
Hidráulica
Gases em Geral
Ar-condicionado e Exaustão
Civil

Mobiliário

Bancadas Laterais e Centrais
Cabines Sensoriais
Mesas Anti-vibratórias / Microscópio
Capelas / Coifas
Válvulas e Tomadas
Armários para reagentes e superiores
Chuveiro e Lava-olhos



GRUPO
IBRAM
DO PROJETO À INSTALAÇÃO
SOLUÇÃO EM LABORATÓRIOS

Rua Vergueiro, 8.250 - São Paulo - SP - Cep 04272-300
Fones: (011) 274-0166 - Fax: (011) 272-7468
<http://www.ibram.com.br> (home page)
ibram@ibram.com.br (e-mail)