

Ministério da Saúde.

Fundação Oswaldo Cruz.

Escola Nacional de Saúde Pública.

Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública.

**“A Cultura de Mexilhões na Baía de Guanabara e suas Implicações
para a Saúde Pública – Contexto Político-Social e Microbiológico”**

Christiane Soares Pereira

2003

Ministério da Saúde.
Fundação Oswaldo Cruz.
Escola Nacional de Saúde Pública.
Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública.

**“A Cultura de Mexilhões na Baía de Guanabara e suas Implicações
para a Saúde Pública – Contexto Político-Social e Microbiológico”**

por

Christiane Soares Pereira

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências
na área de Saúde Pública

Orientadores:

Dra. Cristina de Albuquerque Possas (MS)

Dra. Dalia dos Prazeres Rodrigues (IOC)

Dr. Celio Mauro Viana (UFF)

Junho

2003

Pereira, Christiane Soares

“A Cultura de Mexilhões na Baía de Guanabara e suas Implicações para a Saúde Pública – Contexto Político-Social e Microbiológico”./ Christiane Soares Pereira. Rio de Janeiro: ENSP, 2003.

Curso de Doutorado em Saúde Pública - Escola Nacional de Saúde Pública- ENSP - Fiocruz.

1. Patógenos Emergentes. 2. Resistência Antimicrobiana. 3. Mexilhões. 4. Ambiente. 5. Baía de Guanabara.

Ministério da Saúde.
Fundação Oswaldo Cruz.
Escola Nacional de Saúde Pública.
Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública.

Esta Tese intitulada:

**“A Cultura de Mexilhões na Baía de Guanabara e suas Implicações
para a Saúde Pública – Contexto Político-Social e Microbiológico”**

apresentada por

Christiane Soares Pereira

Foi avaliada e aprovada pela banca examinadora composta pelos seguintes
membros:

1. Dra. Cristina de Albuquerque Possas (MS)
2. Dra Keyla Belízia Feldman Marzochi (ENSP)
3. Dra. Norma dos Santos Lazaro (UFRRJ)
4. Dra Marise Dutra Asensi (IOC)
5. Dra. Regine Helena dos Fernandes Vieira (UFC)

Tese defendida e aprovada em 27 de junho de 2003.

Dedico este trabalho:

A minha amada avó Raimunda Maria de Santana.
Aos meus queridos padrinhos Ricardo, Amália e família Berbara.
E com profundo amor a Celso Murilo Madeira

AGRADECIMENTOS:

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente, tornando possível a realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

Aos meus orientadores, Cristina de Albuquerque Possas pelo incentivo durante todas as fases do doutorado, Dalia dos Prazeres Rodrigues pelo carinho e atenção dedicados nesse longo período de trabalho laboratorial e gentileza em proporcionar-me todos os recursos técnico-científicos imprescindíveis para a elaboração da pesquisa e Celio Mauro Viana pelo estímulo e amizade sólida que estabelecemos nesta jornada.

Aos pescadores da Associação Livre de Maricultores de Jurujuba representados pela pessoa do Sr. Misael de Lima e sua secretária Conceição pela contribuição valiosa em ceder as amostras utilizadas nesta pesquisa

Aos colegas do Departamento de Bacteriologia, do Instituto Oswaldo Cruz, que participaram ativamente no processo do meu amadurecimento profissional, em especial as amigas Gisele Peirano, Grace Theophilo, Érica Louro, Eliane Moura, Cristhiane Falavina dos Reis, Renata Costa, Márcia Festivo, Junair Ribeiro e Evaldo Soares pelas contribuições e esclarecimentos técnicos prestados, sempre, com carinho.

Aos funcionários do Departamento de Bacteriologia pelo apoio em todas as ocasiões necessárias, bem como aos motoristas do Departamento de Transportes-Fiocruz pela colaboração durante as coletas em Niterói.

Aos meus familiares e amigos que confiaram na minha capacidade e me incentivaram nos momentos mais difíceis ao longo desses quatro anos.

Agradeço a minha grande amiga Maria da Conceição Ramos Rocha por estar sempre ao meu lado nos momentos pessoais mais críticos pelos quais passei nesses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro sem o qual esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Lista de Gráficos e Tabelas:

- Gráfico 1- Cepas de *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de 86 amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 96
- Gráfico 2- Cepas de *Aeromonas* sp. isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 97
- Gráfico 3- Cepas de *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 98
- Gráfico 4- Cepas de *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 99
- Tabela 1 a.- Distribuição mensal (janeiro-junho) dos microrganismos isolados a partir de amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 100
- Tabela 1 b.- Distribuição mensal (julho-dezembro) dos microrganismos isolados a partir de amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 101
- Tabela 2- Frequência das espécies de *Vibrio* spp. isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 102
- Tabela 3- Frequência das espécies de *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 103
- Tabela 4- Reação de Kanagawa e sorologia das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de amostras de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 104
- Tabela 5- Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 26 cepas de *Aeromonas hydrophila* isoladas a partir de amostras de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões). 105

Tabela 6- Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 25 cepas de <i>Vibrio cholerae</i> não O1 isoladas a partir de amostras de mexilhões (<i>in natura</i> e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).	106
Tabela 7- Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 10 cepas de <i>Vibrio vulnificus</i> isoladas a partir de amostras de mexilhões (<i>in natura</i> e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).	107
Tabela 8- Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 09 cepas de <i>Vibrio fluvialis</i> isoladas a partir de amostras de mexilhões (<i>in natura</i> e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).	108
Tabela 9- Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 11 cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isoladas a partir de mexilhões <i>in natura</i> e pré-cozidos comercializados EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).	109
Tabela 10- Distribuição das espécies de <i>Vibrio</i> spp. isoladas de mexilhões <i>in natura</i> e pré-cozidos, de acordo com o local de coleta	110
Tabela 11- Distribuição das espécies de <i>Aeromonas</i> spp. e <i>Plesiomonas shigelloides</i> isoladas de mexilhões <i>in natura</i> e pré-cozidos, de acordo com o local de coleta	111

Lista de Abreviaturas:

AK – Amicacina

ALMARJ – Associação Livre de Maricultores de Jurujuba

AMP – Ampicilina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APA – Água Peptonada Alcalina

APA – Área de Proteção Ambiental

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BFP – Boas Práticas de Fabricação

C – Cloranfenicol

CDC – Center of Disease Control

CFIA – Canadian Food Inspection Agency

CIP – Ciprofloxacina

CLIN – Companhia de Limpeza de Niterói

CN – Gentamicina

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

mCPC – Ágar Colistin Polimixina Celobiose modificado

CPI – Comissão de Inquérito Parlamentar

CREA – Conselho Regional de Engenharia e Arquitetura

CRO – Ceftriaxona

CSSP – Canadian Shellfish Sanitation Programme

CV – Costa Vernin

DIPES – Departamento de Inspeção de Pescado

DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

DPO – Department of Fisheries and Oceans

DTA – Doenças de Transmissão Alimentar

EC – Environmental Canada

EECM – Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões

EIA – Estudo de Impacto Ambiental

ENSP- Escola Nacional de Saúde Pública

EPA – Environmental Protection Agency

F – Nitrofurantoína

FANIT – Federação dos Moradores de Niterói
FAO – Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas
FAPESCA – Federação das Associações de Pescadores do Estado do Rio de Janeiro
FDA – Food and Drug Administration
FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente
FIPERJ – Fundação Instituto de Pesca do Rio de Janeiro
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
GSP – Ágar Seletivo para *Pseudomonas-Aeromonas*
HE – Ágar Entérico Hektoen
IAB – Instituto de Arquitetos do Brasil
IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IBB – Ágar Inositol Bile Verde Brilhante
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMSF – Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos
IMP – Imipenem
INEU – Instituto Niteroiense de Estudos Urbanos
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos
KIA – Ágar Kligler-Ferro
LABENT – Laboratório de Enterobactérias
LARA – Laboratório de Alimentos e Rações
LIA – Ágar Lisina-Ferro
MA – Ministério da Agricultura
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MMA – Ministério de Meio Ambiente
MS – Ministério da Saúde
NaCl – Cloreto de sódio
NASA – National Aeronautics and Space Administration
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standard
NPD – Núcleo de Processamento de Dados
O/129 - fosfato de 2,4 diamino-6, diisopropil-pteridina
OMS – Organização Mundial de Saúde
ONPG - σ nitrofenil- β -D galactopiranosídeo

PCC – Ponto Crítico de Controle
PDBG – Programa de Despoluição da Baía de Guanabara
PMN – Prefeitura Municipal de Niterói
PNUD – Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PUC – Pontifícia Universidade Católica
REDUC – Refinaria de Duque de Caxias
SECPLAN – Secretaria de Estado de Planejamento e Controle
SIM – Sulfeto-Indol-Motilidade
SINDIPETRO-RJ – Sindicato dos Petroleiros do Rio de Janeiro
SISNAMA – Sistema Nacional de Meio Ambiente
SXT – Sulfametoxazol-Trimetoprim
TCBS – Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TE – Tetraciclina
TSA – Ágar Trypticase de Soja
UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFC – Universidade Federal do Ceará
UFF – Universidade Federal Fluminense
UFRJ – Universidade Federal Rio de Janeiro
UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
WHO – World Health Organization

Resumo

O ecossistema aquático é habitado por mexilhões, animais filtradores que refletem a qualidade ambiental através da sua análise microbiológica. Neste estudo pretendeu-se avaliar a presença de patógenos, clássicos (*Salmonella* sp.) e emergentes (*Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*), a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos isolados de uma Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões situada em Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro. Embora, não tenha sido identificado o patógeno *Salmonella* sp., as análises laboratoriais realizadas permitiram o isolamento de diversas espécies de microrganismos pertencentes às famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae*, algumas com relevante potencial patogênico (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *A. hydrophila*). Diversos microrganismos isolados apresentaram perfil de resistência a antimicrobianos utilizados na clínica humana (ampicilina, tetraciclina, nitrofurantoína, sulfametoxazol-trimetoprim e pefloxacina). Considerando a relevância epidemiológica dos agentes patogênicos identificados e os resultados obtidos nesta investigação, faz-se urgente alertar as autoridades sanitárias quanto à presença desses patógenos na cadeia alimentar e no ambiente. Dada sua capacidade de causar enfermidades diversas nas populações humanas após consumo de mexilhões *in natura* ou pré-cozidos, torna-se premente e de extrema importância o desenvolvimento de estratégias de vigilância epidemiológica e sanitária, assegurando, entre outras medidas, o monitoramento constante dos mexilhões oriundos da Baía de Guanabara, no sentido de prevenir ou minimizar os riscos nas diferentes etapas da sua extração e comercialização.

Palavras-chave: Patógenos Emergentes, Resistência Antimicrobiana, Mexilhões, Baía de Guanabara e Ambiente.

Abstract

The aquatic ecosystem is the *habitat* of mussels, filtrated animals that reflect the ambiental quality through microbiological analysis. In the present investigation, we evaluated the presence of classic (*Salmonella* sp.) and emergent (*Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*) pathogens from *in natura* and pre-cooked mussels isolated from an Experimental Station Mussel's Cultive situated in Jurujuba, Niteroi, Rio de Janeiro. *Salmonella* sp. was not identified, in our laboratory analysis, but *Vibrionaceae* and *Aeromonadaceae* were isolated. Several pathogenic microorganisms (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *A. hydrophila*) were identified and some of them were antimicrobial resistant for diverse antibiotics used in human therapeutic (erythromycin, ampicillin, tetracycline, nitrofurantoin, trimethoprim-sulphamethoxazole and pefloxacin). The epidemiological relevance of the identified pathogenic agents and their antimicrobial resistance indicate the urgent need to alert the Brazilian health authorities on the presence of these pathogens in the food chain and the environment. Taking into account, their potential to cause diverse diseases in exposed human populations after consumption of *in natura* and pre-cooked mussels, it is of utmost importance to develop health surveillance strategies in order to assure permanent monitoring of mussels in Guanabara Bay and prevent or minimize risks of their extraction and comercialization.

Key-words: Emergents Pathogens, Antimicrobial Resistance, Mussels, Guanabara Bay and Environment.

Sumário

Dedicatória	<i>i</i>
Agradecimentos	<i>ii</i>
Resumo	<i>vii</i>
Abstract	<i>ix</i>
Gráficos e Tabelas	96
Anexos	147
Apresentação	15
Introdução	19
A Baía de Guanabara: ecossistema e os mexilhões	19
Objetivos Gerais	28
Objetivos Específicos	29
Capítulo 1 – A Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões de Jurujuba: Aspectos Tecnológicos e a Relação com o Ambiente	30
1.1- Cultivo Experimental <i>versus</i> Pesca Predatória	31
1.2- A Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões em Jurujuba	36
1.3- Impactos Ambientais dos Derramamentos de Óleo: Agravamento dos Obstáculos Enfrentados pela EECM/ALMARJ	40
1.4- Controle de Qualidade e Condições de Consumo dos Mexilhões	42
Considerações Finais	46
Capítulo 2 – Aspectos Tecnológicos na Indústria de Mexilhões: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)	49
Capítulo 3 – Famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae no Ecossistema Aquático: Caracterização	61
Capítulo 4 – Análise Microbiológica dos Mexilhões <i>in natura</i> e pré-cozidos	80
4.1 – Local de Estudo	81
4.2- Tipo de Amostras	82
4.3 – Material e Métodos	82
4.3.1 – Amostragem	82
4.4 – Análises Microbiológicas	85
4.4.1 – Isolamento e Identificação	85
4.4.2 – Provas Bioquímicas	86

4.4.2.1 - Teste de β Galactosidase (ONPG)	87
4.4.2.2 - Caracterização Antigênica	87
4.4.2.3 - Reação de Kanagawa em Ágar Wagatsuma	88
4.4.2.4 - Teste de sensibilidade à agentes antimicrobianos	89
4.5- Análise Estatística dos Dados	90
4.6 - Resultados	91
4.7 - Discussão	112
Capítulo 5 – A Vigilância Sanitária de Alimentos no Cultivo de Mexilhões	120
5.1 – Globalização e Exposição à Patógenos nos Alimentos	123
5.2 – O aumento da resistência antimicrobiana de patógenos veiculados por alimentos de origem aquática	127
5.3 – Conseqüência da exposição à patógenos resistentes a antimicrobianos para a saúde humana	129
6 - Considerações Finais e Conclusões	133
7 - Referências Bibliográficas	154

Apresentação:

A segurança alimentar é um assunto de extrema importância para a Saúde Pública brasileira. De um lado, uma enorme parcela da população sobrevive em condições precárias de extrema pobreza, sem acesso ao alimento necessário à sua subsistência; de outro a parcela que se alimenta acaba muitas vezes exposta a graves riscos, como, entre outros, o de adquirir toxinfecção alimentar.

As Doenças de Transmissão Alimentar são, em sua maioria, causadas pela contaminação microbiana, o que pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva ou até mesmo na fase de preparo do produto final na residência do consumidor, pela ausência de procedimentos adequados nas etapas de produção, comercialização e consumo de alimentos em si inócuos à saúde humana.

Considerando esse aspecto de segurança alimentar, analisamos a qualidade microbiológica de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões (EECM) situada em Jurujuba, Niterói.

O objeto principal desta pesquisa centrou-se na análise de patógenos emergentes (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus* e *Plesiomonas shigelloides*). Em primeiro lugar, procuramos orientar nossa pesquisa com o objetivo de avaliar a possibilidade dos mexilhões *in natura* constituírem reservatório para os patógenos emergentes. Em segundo, buscamos analisar a eficiência do processamento tecnológico dos mexilhões, representado pelo pré-cozimento a 100° C, na redução dos microrganismos identificados a partir dos mexilhões *in natura*.

No presente estudo, foram observadas as condições de extração e processamento dos mexilhões *in natura* e pré-cozidos, além das suas condições de manipulação, armazenamento e transporte, uma vez que essas etapas tecnológicas representam fatores fundamentais para a produção de um produto alimentar de qualidade. Os mexilhões utilizados como matéria-prima pela EECM foram obtidos pelos pescadores pertencentes à Associação Livre de Maricultores de Jurujuba (ALMARJ), cujas condições de surgimento, instalação e tentativa de superação dos obstáculos procuramos descrever de forma sucinta. O *habitat* natural dos mexilhões foi bastante diversificado, sendo estes oriundos de diversos pontos da Baía de Guanabara, alguns dos quais com elevadíssimos índices de poluição. Por esta razão, as condições que contribuem para a modificação do ecossistema marinho nesta Baía, seja por razões naturais ou devido à interferência humana, constituíram o ponto de partida deste estudo, cujo referencial teórico e metodológico será exposto a seguir.

Na introdução, descrevemos sucintamente as condições de transformação do ecossistema marinho da Baía de Guanabara apontando para a importância da preservação do ambiente e do monitoramento microbiológico dos mexilhões como importante parâmetro de avaliação da qualidade ambiental. Descrevemos, também, alguns aspectos relacionados ao derramamento de óleo ocorrido em janeiro de 2000 cuja responsabilidade foi atribuída à empresa Petrobras e que estão diretamente relacionados ao nosso objeto de estudo.

No primeiro capítulo, realizamos uma descrição sucinta sobre as condições de criação da EECM pela ALMARJ, as dificuldades enfrentadas por esta Associação, destacando a importância de sua superação pelas autoridades governamentais e pela sociedade, dada a importância do cultivo tecnológico de mexilhões como alternativa para preservação de espécies do ecossistema marinho.

No segundo capítulo, dedicamos atenção especial à descrição das diferentes etapas do processamento tecnológico adotadas pelo sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), identificando os principais pontos críticos de controle e as medidas corretivas e preventivas capazes de auxiliar na diminuição dos riscos de contaminação microbiana. Esse sistema, criado pela NASA (National Aeronautics and Space Administration), é amplamente utilizado em indústrias de alimentos de países desenvolvidos e tem apresentado excelentes

resultados na melhoria da qualidade dos produtos comercializados. Entretanto, no Brasil, embora a legislação recomende a utilização desse sistema poucos avanços têm sido observados nesta área, especialmente com relação às pequenas indústrias.

No terceiro capítulo, realizamos uma descrição detalhada sobre as características dos patógenos emergentes investigados e demais microrganismos de relevância para a saúde pública. Essa descrição teve como objetivo situar o leitor com relação aos aspectos microbiológicos de cada espécie de microrganismo estudado, além de fornecer informações quanto ao tipo de infecção por eles causadas.

No quarto capítulo, abordamos o estudo microbiológico propriamente dito, *in loco*, descrevendo o processo de pesquisa laboratorial referente ao isolamento microbiológico de patógenos emergentes a partir dos mexilhões *in natura* e pré-cozidos comercializados pela Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões (EECM). Nesse estudo, embora não tenhamos identificado microrganismo clássico (*Salmonella* spp.), encontramos patógenos emergentes (*Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*) e diversos outros potencialmente patogênicos para a saúde pública pertencentes às famílias *Vibrionaceae* (*Vibrio cholerae* não O1, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. cincinnatiensis*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. furnissii*, *V. anguillarum*, *V. aestuarius* e *V. harveyi*) e *Aeromonadaceae* (*Aeromonas media*, *A. caviae*, *A. veronii* biótipo *veronii*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. veronii* biótipo *sobria*, *A. schubertii* e *A. jandaei*). Ao mesmo tempo, além da caracterização microbiológica dos mexilhões quanto à presença de patógenos, examinamos as condições de resistência a antimicrobianos, observando a presença de muitas cepas resistentes a antibióticos utilizados frequentemente na clínica humana, com importantes implicações para a saúde pública.

No quinto capítulo, baseado na importância dos patógenos emergentes identificados, tecemos uma breve discussão quanto ao papel da vigilância sanitária de alimentos para garantir o cultivo seguro de mexilhões em nosso País. As condições de aceleração da mobilidade de moluscos e pescados no ecossistema marinho são favorecidas por fatores diversos relacionados sobretudo ao processo de globalização, que amplifica consideravelmente a exposição humana a patógenos nesses alimentos. Além desse fator, o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos usados na terapêutica e suas conseqüências para a saúde humana, ressaltam a

importância de maior articulação entre os sistemas de vigilância sanitária e epidemiológica.

Finalmente, tecemos conclusões visando a reflexão, à luz dos resultados obtidos, sobre as estratégias locais mais eficientes de promoção da saúde, que poderiam ser introduzidas na comunidade de pescadores de Jurujuba, possibilitando a difusão de conhecimentos fundamentais sobre o cultivo de mexilhões e a prevenção de gastroenterites e outras infecções. Tais estratégias deverão ser orientadas no âmbito do SUS (Sistema Único de Saúde) e dos programas de educação ambiental para promover a ampliação da consciência sanitária ao nível local e internalização pela população de comportamentos saudáveis e de sustentabilidade do ambiente.

Introdução

A Baía de Guanabara: o ecossistema marinho e os mexilhões

Originalmente, a Baía de Guanabara era um imenso rio de águas estuarinas que se estendia desde o Pão de Açúcar até a praia de Jurujuba, Niterói. Modificações naturais durante 300 mil anos levaram à formação desta baía, cujo nome, em tupi-guarani significa “seio do mar” (Lamego, 1964).

No início do século passado, o ecossistema aquático da baía produzia cardumes de diversas espécies de pescado, destacando-se as sardinhas, robalos, tainhas e xereletes, bem como crustáceos (lagostas e camarões). Era comum observar a presença de animais marinhos como os cetáceos (golfinhos e baleias). Por outro lado, já se constatava que nas encostas ocorria gradativamente a destruição da Mata Atlântica, através do desmatamento causado pela extração indiscriminada de pau-brasil e posteriormente pelas plantações de cana-de-açúcar. Paulatinamente, esses processos foram expulsando a fauna nativa e, também, modificando a conformação dos rios que desaguavam na Baía e eram as principais vias de acesso ao interior (Amador, 1996).

Os processos de modernização e urbanização da cidade do Rio de Janeiro contribuíram para a destruição do *habitat* da baía. A construção de imóveis para habitação e a ocupação desordenada aliada às baixas condições de saneamento básico, constituíram fatores fundamentais no processo de desmatamento e contaminação das águas da Baía de Guanabara, por lixo e dejetos produzidos pela população que habitava as colinas e encostas que circundam a cidade (FEEMA, 1988).

Em 1906, o Rio de Janeiro possuía 800 mil habitantes, a grande maioria sem alternativa de moradia procurava abrigo nas favelas que proliferavam em decorrência da migração ocasionada pela oferta de trabalho nas pequenas indústrias e em particular, na construção civil. Nesta época, o desmonte do Morro do Senado e Morro do Castelo abriram opções para novos aterros que modificaram o contorno na baía formando o Aterro do Flamengo, o Largo da Glória e o Bairro da Urca. O processo industrial se intensificou, mas a expansão urbana não recebeu o apoio financeiro para a implantação de uma infra-estrutura capaz de suprir as necessidades da população. Esse quadro influenciou na qualidade do ambiente tanto no interior da Baía como nas bacias dos rios que nela deságuam (Oliveira & Krau, 1976).

Os reflexos dessas mudanças podem ser observados até os dias atuais. A situação ambiental da Baía de Guanabara é extremamente preocupante, pois esta baía não é um acidente geográfico autônomo, ela depende do mar que renova suas águas diuturnamente num processo sem fim. Constitui o corpo receptor final de todos os efluentes líquidos gerados nas suas margens e nas bacias de 55 rios e riachos que a alimentam mantendo uma relação de interdependência com os vários ecossistemas a ela integrados (FEEMA, 1988).

A qualidade das águas da baía é, portanto, influenciada diretamente pela carga de poluição lançada nos rios de seu entorno e no seu espelho d'água. As atividades humanas contribuem como fonte principal de poluição, uma vez que existem 14.000 estabelecimentos industriais, 16 terminais marítimos de petróleo, 2 portos comerciais, 12 estaleiros, 2 refinarias de petróleo, mais de 1.000 postos de combustíveis e uma ampla rede de transporte de matérias-primas, combustíveis e produtos industrializados circulando em sua volta em zonas urbanas altamente congestionadas (ibid, 1988).

A bacia que drena para a Baía de Guanabara tem 4.000 Km² sendo formada por vários municípios do Rio de Janeiro. Nesta região habitam cerca de 10 milhões de habitantes, o equivalente a 80% da população do Estado e segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), apresentou a maior taxa de crescimento do país no período de 1980 a 1991. Estima-se que mais de dois terços dessa população habitem regiões adjacentes à Baía de Guanabara (IBGE, 1992).

As principais causas da degradação ambiental da Baía de Guanabara são: desmatamento, destruição de manguezais, aterros, ineficiência na coleta urbana e destino final do lixo, poluição industrial e acidentes ambientais (Kehrig et al., 2002).

A destruição da Mata Atlântica também contribui para este acelerado processo de degradação ambiental. A área remanescente da Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro está restrita a apenas 1.265 Km², correspondendo a 37,5% do original. No período de 1995 a 1997, verificou-se uma redução de 577 hectares das áreas florestais do Estado, o equivalente a um campo de futebol por dia. De 1984 a 1991, as áreas urbanizadas na região da bacia da Baía de Guanabara expandiram-se em 87 Km², enquanto as florestas foram reduzidas em 95 Km² (FEEMA, 2002).

A deficiência de habitação para a população menos favorecida economicamente, resultou na ocupação de áreas florestais inadequadas à urbanização, como as encostas dos morros, margens dos rios e áreas inundáveis. Para se ter uma idéia, na área do Parque Nacional da Tijuca, observou-se o surgimento de 46 novas favelas num período de dois anos (1995-1997). Além da destruição da fauna e da flora da região desmatada, a retirada de árvores e plantas nativas das florestas desprotege o solo criando condições para deslizamentos de encostas provocados por enxurradas o que acaba levando ao assoreamento e obstrução dos rios com lama e lixo e inundações nas áreas urbanizadas (ibid, 2002).

A destruição dos manguezais, considerados *habitat* primordial para a manutenção da vida dos animais aquáticos, também ocorreu de forma acelerada. E dos 260 Km² de manguezais originais, restam apenas 82 Km² na Baía de Guanabara. O processo de assoreamento que se intensifica ao longo do tempo, resulta na progressiva redução do nível de profundidade da Baía. Esse processo destrói o ambiente reduzindo a capacidade de reprodução de diversas espécies como ostras e mexilhões (Amador, 1996).

Os aterros promovidos pelo processo de urbanização do Rio de Janeiro foram responsáveis pela redução de 30% da superfície original da Baía de Guanabara.. Essas interferências no ambiente natural causam alterações, algumas irreversíveis, no sistema de circulação de águas reduzindo drasticamente a capacidade

de autodepuração da Baía e causando danos inestimáveis aos animais de vida aquática, afetando diretamente a qualidade de vida do homem (Oliveira & Krau, 1976).

A deficiência do sistema de saneamento básico, agravada pela falta de tratamento dos esgotos sanitários representa a principal fonte de poluição da Baía. As redes coletoras não são suficientes e a predominância em áreas mais pobres, do esgoto a céu aberto favorece a chegada de esgoto *in natura* à Baía de Guanabara, como receptor natural de todos os rios, canais e galerias da cidade do Rio de Janeiro (Sissino & Moreira, 1996).

Adicionalmente, a deficiência de coleta e a falta de locais adequados, para receber o lixo doméstico e os rejeitos de indústrias, hospitais e laboratórios constituem um problema de ampla repercussão para a saúde pública. Os dejetos humanos aliados aos rejeitos e ao lixo orgânico e inorgânico são focos de diversas doenças infecciosas e parasitárias, bacterianas e virais, podendo ainda representar risco de contaminação humana por materiais tóxicos e radioativos. O seu acúmulo sem tratamento promove além disso, a contaminação do solo e, conseqüentemente, a poluição de águas superficiais e subterrâneas, causando também a obstrução dos sistemas de drenagem e provocando inundações com enormes riscos para a saúde humana e também animal (ibid, 1996).

Somando-se os riscos de acidentes ambientais com vazamento de óleo, que ocorrem com relativa frequência nas refinarias, portos comerciais, estaleiros e postos de combustíveis, a situação ambiental torna-se desastrosa e cada vez mais preocupante. No ano de 2000, ocorreu um vazamento de 1,3 milhão de litros de óleo diretamente na Baía de Guanabara, atingindo o ecossistema marinho e causando morte de diversos animais aquáticos, destruindo ainda mais os manguezais e poluindo as praias litorâneas. Além de prejudicar o balneário e o turismo, desastres ambientais como esse têm causado danos econômicos aos trabalhadores que subsistem da pesca, trazendo problemas para a saúde ambiental e qualidade de vida da população.

Todos esses processos de degradação ambiental têm importante impacto na flora e fauna marinhas, afetando diretamente o ecossistema aquático. Do ponto de vista ecológico, os sistemas aquáticos são um conjunto complexo de subsistemas

diversos nos quais interagem processos biológicos e relações ecológicas que, integrados entre si e com o exterior, determinam o comportamento total do ecossistema. A poluição ambiental representa, portanto um dos fatores mais prejudiciais ao ecossistema aquático.

A vulnerabilidade do ambiente aquático está relacionada ao lançamento de efluentes orgânicos. O despejo de esgoto *in natura* e de resíduos industriais diretamente nas águas naturais da Baía de Guanabara, sem prévio tratamento constitui uma das principais causas de destruição do *habitat* aquático (Machado et al., 2002).

Um dos fatores que contribui para o aumento da vulnerabilidade do ambiente aquático é o lançamento de efluentes orgânicos, pelo precário sistema de saneamento básico anteriormente observado. As águas da bacia pluvial que deságuam na Baía de Guanabara contêm (pelo processo de urbanização desordenada, falta de saneamento básico e coleta de lixo), milhões de microrganismos por mililitro, ficando a microbiota composta por bactérias autóctones e de origem entérica que acabam sendo lançadas no ambiente aquático através dos efluentes domésticos. Essa contaminação ocasiona problemas diversos para a saúde pública: riscos associados à contaminação de balneários e ao consumo de alimentos marinhos ou estuarinos oriundos dessas zonas (Paranhos et al., 1995).

Como veremos mais adiante, no que se refere especificamente ao consumo desses alimentos, muitas enfermidades são transmitidas ao homem por diversos microrganismos, através da ingestão de moluscos bivalves marinhos não submetidos ao cozimento ou insuficientemente cozidos. Essa contaminação pode ocorrer diretamente através da água, ou indiretamente no consumo de produtos *in natura* contaminados durante os processos de manipulação, armazenamento, transporte ou preparação para o consumo.

No mundo contemporâneo, estudos diversos (Rippey, 1994) mostram que surtos de doenças relacionadas ao consumo de pescados, moluscos e derivados variam de acordo com os hábitos alimentares da população e com o clima local. São mais freqüentes no verão quando a temperatura das águas é mais elevada. No Japão, cerca de 70% das Doenças de Transmissão Alimentar (DTA) estão associadas ao

consumo de pescado sem cocção. Nos Estados Unidos, desde o ano de 1800 mais de 400 surtos com 14000 casos foram descritos, representando 11% das DTA.

No Brasil, as principais espécies de cultivo de moluscos são as ostras, comumente consumidas *in natura* com algumas gotas de limão, e os mexilhões, consumidos após levemente cozidos. Os mexilhões são animais micrófagos, isto é, alimentam-se de partículas e microrganismos em suspensão na água, mas não são selecionadores qualitativos de alimentos. São capazes de filtrar cerca de 5 litros de água por hora e o nível de absorção de nutrientes está intimamente relacionado à temperatura, salinidade e salubridade do meio que o molusco habita. Essas características são importantes, pois seu consumo, sem prévio aquecimento, pode veicular uma série de patógenos ao homem, tornando-se um risco para a saúde pública (Bussani, 1983).

Os mexilhões podem ser encontrados sobre costões naturais ou pedras de aterro dentro da Baía de Guanabara. É comum encontrar uma maior proporção desses animais próximo à entrada da baía onde a alta densidade de algas serve como substrato para sua fixação. O cultivo de mexilhões é uma atividade que depende da dinâmica ambiental e fatores negativos, decorrentes de poluição ou mesmo em situações acidentais, onde ocorra derramamento de efluentes tóxicos influenciarão no volume da produção e na receptividade do produto pelo mercado consumidor. A preservação do ambiente aquático é uma questão de qualidade de vida para a sociedade e gerações futuras, mas para os pescadores é uma questão de necessidade básica e urgente (Torres, 1983).

As principais fontes de contaminação de mexilhões através do esgoto e resíduos industriais são a contaminação por matéria orgânica, microrganismos (bactérias e vírus), óleos, detergentes, produtos não biodegradáveis e metais pesados. Microrganismos e metais pesados são os contaminantes mais perigosos porque nem sempre causam alterações aparentes ou imediatas e o molusco, embora contaminado pode ser considerado apto para consumo (OMS, 1975; Homma et al., 1975).

Tendo em vista que o ambiente pode ser definido como: “ (...) *tudo o que tem a ver com a vida de um ser ou de um grupo de seres vivos. Tudo o que tem a ver com a vida, sua manutenção e reprodução*”, a preservação do *habitat* aquático é uma

medida de extrema importância para a manutenção do equilíbrio da cadeia alimentar no ecossistema marinho, onde se inserem os mexilhões (Neves & Tostes, 1992).

O ambiente é um sistema físico (meio abiótico) e biológico (meio biótico) em que vivem os seres humanos e outros organismos, constituindo um todo complexo com muitos componentes interagindo em seu interior. A biodiversidade marinha expressa o total de gens, espécies e ecossistemas de uma região e possui valor inestimável para a vida no planeta Terra.

As principais causas de perda da biodiversidade marinha são a degradação e fragmentação do *habitat*, invasão de espécies introduzidas em ambientes que não constituem o *habitat* natural, superexploração dos recursos vivos, poluição, pesca predatória e as modificações climáticas globais. Em associação às causas citadas existem fatores fundamentais que têm levado ao longo dos anos à perda de biodiversidade global e, em particular da biodiversidade marinha. Dentre esses fatores podemos incluir como os conseqüentes às altas taxas de crescimento demográfico e o consumo dos recursos naturais sem planejamento.

A preservação do ambiente é de responsabilidade da Sociedade e do Poder Público, devendo ambos estar permanentemente atentos para que seja efetiva. Proteger o ambiente é uma das formas de preservar a biodiversidade e melhorar a qualidade de vida e saúde da sociedade. A legislação ambiental brasileira, através da Constituição Federal ou de Planos Diretores de Municípios ou Estados, visa gerar instrumentos de defesa ao ambiente, garantindo o acesso à informação por parte da sociedade. O mais importante princípio é o da reparação:

“As condutas e atividades consideradas lesivas ao meio ambiente sujeitarão os infratores, pessoas físicas ou jurídicas, a sanções penais e administrativas, independentemente da obrigação de reparar os danos causados.” (Constituição Federal do Brasil, art.225, VII § 3º, Brasil, 1988).

O ambiente é considerado um patrimônio de uso comum do povo e, portanto representa uma riqueza social a ser preservada por todos. Com base neste princípio, a Lei nº 6.938 (Brasil, 1981) instituiu o princípio da *responsabilidade*

objetiva nos casos de danos ambientais. Dessa maneira, os responsáveis pelos danos causados ao ambiente, independente da intenção ou não de causá-los devem ser responsabilizados civil e penalmente e obrigados a reparar o estrago. A aplicação imediata das leis ambientais, por sua vez, é realizada pelo Poder Executivo, o qual deverá estar agindo de forma a evitar e/ou punir os crimes de degradação ambiental.

Qualquer alteração, favorável ou desfavorável, no ambiente ou em algum de seus componentes, resultante de uma determinada ação ou atividade é considerada pela legislação brasileira (Brasil, 1986) como *impacto ambiental*. Essa alteração poderá direta ou indiretamente afetar a saúde, a segurança e o bem-estar da população, as atividades sociais, econômicas, a biota, as condições estéticas e sanitárias e a qualidade dos recursos ambientais.

O aumento da interferência humana sobre o ambiente, geralmente acaba criando conflitos entre os objetivos humanos e os processos da natureza. No sentido de evitar danos ao ambiente é importante a realização da avaliação de impacto ambiental, uma atividade designada para identificar e prever os resultados de uma ação no meio biogeofísico, na saúde e no bem estar do homem. Para que atividades humanas, com ou sem fins lucrativos relacionadas direta ou indiretamente ao ambiente sejam legalizadas, o Decreto nº 88.351/1983 regulamentou a aplicação dos Estudos de Impacto Ambiental. Essa legislação determina em seu artigo 18:

“A construção, instalação, ampliação e funcionamento de estabelecimentos com atividades utilizadoras de recursos ambientais, consideradas efetiva ou potencialmente poluidoras, assim como os projetos capazes, sob qualquer forma, de causar degradação ambiental, dependerão de uma autorização prévia da instituição Estadual integrante do SISNAMA, sem prejuízo de outras autorizações legalmente exigidas.” (Brasil, 1983).

Dentre os planos para evitar os danos ao ambiente incluem-se a educação ambiental, a aplicação das leis e os Estudos de Impacto Ambiental (EIA) que prevêem modificações ambientais relacionadas a atividades econômicas, estimando os custos para o ambiente e a sociedade.

Os Estudos de Impacto Ambiental (EIA) visam não apenas proteger o ambiente, mas também prevenir a ocorrência de desastres ecológicos provocados pela natureza ou pelo homem. Em nosso País, os desastres naturais, como furacões, terremotos e maremotos são muito raros, entretanto, aqueles ocasionados por atividades humanas são cada vez mais freqüentes. A maioria desses desastres ocasionam a mortandade da fauna e da flora causando prejuízos irreparáveis ao ecossistema, às comunidades ribeirinhas que vivem da pesca e à toda a população das cidades cujos mananciais forem atingidos.

Condições inadequadas de preservação do ambiente podem aumentar sua patogenicidade, e no caso do ambiente marinho aqui estudado, examinamos a possível contaminação e o potencial patogênico de produtos extraídos do ecossistema aquático representado pelos mexilhões.

Como observado, ecossistemas aquáticos submetidos à poluição ou contaminação podem trazer sérios problemas de saúde aos seres humanos. Certamente as toxinfecções alimentares de origem bacteriana representam a consequência mais comum relacionada ao consumo de moluscos bivalves provenientes de áreas poluídas. Existem riscos de doenças diversas provocadas por parasitos, biotoxinas e intoxicações químicas (metais pesados, agrotóxicos) e por microrganismos. O processamento adequado dos mexilhões é, sem dúvida, essencial para minimizar os riscos até aqui apontados.

Objetivos Gerais:

- Realizar pesquisa microbiológica de microrganismos clássico (*Salmonella* spp.) e emergentes (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus* e *Plesiomonas shigelloides*);
- Avaliar o processamento tecnológico de pré-cozimento dos mexilhões beneficiados pela EECM/ALMARJ;
- Identificar os principais Pontos Críticos de Controle (PCC) no processamento dos mexilhões.

Objetivos Específicos:

- Observar a ocorrência e prevalência de patógenos clássico e emergentes isolados a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos;
- Observar a sazonalidade dos microrganismos isolados a partir dos mexilhões *in natura* e pré-cozidos;
- Avaliar a susceptibilidade dos microrganismos isolados frente à diversos antimicrobianos;
- Discutir a importância da Vigilância Sanitária de Alimentos para o cultivo de mexilhões.

Capítulo 1

A Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões de Jurujuba: Aspectos Tecnológicos e a Relação com o Ambiente.

Nosso estudo analisou a Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões (EECM) que pertence à Associação Livre de Maricultores de Jurujuba (ALMARJ) criada em 1992 e integrada por membros da comunidade de Jurujuba, Niterói. Esta comunidade representa um dos grupos mais tradicionais com atuação na pesca artesanal e na extração de mexilhões da Baía de Guanabara.

Centramos nossa análise nos aspectos organizacionais e tecnológicos do referido estabelecimento, examinando as alterações introduzidas ou propostas para o processo de extração, processamento e comercialização dos mexilhões.

Iniciaremos esse capítulo com uma breve discussão sobre o cultivo experimental na maricultura em contraposição à pesca predatória, suas possibilidades e limites. A seguir, descreveremos uma experiência concreta de tentativa de implementação de uma estação experimental de cultivo, realizando um breve histórico da ALMARJ e da instalação da EECM. Examinaremos, por fim, as estratégias e obstáculos enfrentados pela Associação e sua Estação Experimental, diante do agravamento das condições de degradação ambiental nas áreas de coleta de mexilhões.

1.1-Cultivo Experimental *versus* Pesca Predatória

No mundo contemporâneo, com o aumento da consciência ecológica, o cultivo experimental de pescados e moluscos tem emergido de forma crescente, como alternativa economicamente viável à pesca predatória, evitando seus impactos ambientais.

Observa-se em escala mundial expressivo crescimento do consumo de mexilhões e ostras devido à popularização de restaurantes voltados à comercialização de frutos do mar. Em consequência, dados da FAO (Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas), demonstram que a produção mundial de pescado, no ano de 1996, já tinha atingido um volume de 121 milhões de toneladas das quais 94,6 milhões oriundas da pesca de captura e 26,4 milhões resultantes da aquicultura (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção mundial de pescado e sua utilização nos anos de 1990, 1992, 1994, 1995 1996 e 1997.

	1990	1992	1994	1995	1996	1997 ¹
	<i>(milhões de toneladas)</i>					
PRODUÇÃO						
ÁGUAS INTERIORES						
Aqüicultura	8.17	9.39	12.11	13.86	15.61	17.13
Capturas	6.59	6.25	6.91	7.38	7.55	7.70
Total águas interiores	14.76	15.64	19.02	21.24	23.16	24.83
ÁGUAS MARINHAS						
Aqüicultura	4.96	6.13	8.67	10.42	10.78	11.14
Capturas	79.29	79.95	85.77	85.62	87.07	86.03
Total águas marinhas	84.25	86.08	94.44	96.04	97.85	97.17
Total aqüicultura	13.13	15.52	20.77	24.28	26.38	28.27
Total capturas	85.88	86.21	92.68	93.00	94.63	93.73
Total das pescas mundiais	99.01	101.73	113.46	117.28	121.01	122.00
UTILIZAÇÃO						
Consumo Humano	70.82	72.43	79.99	86.49	90.62	92.50
Outras utilizações	28.19	29.29	33.47	30.78	30.39	29.50
¹ . Dados provisórios e estimados para o ano de 1997.						

Fonte: FAO/1996.

No Brasil, a costa litorânea possui excelentes condições para o desenvolvimento das atividades pesqueiras. O ecossistema aquático brasileiro é influenciado diretamente por correntes marinhas que determinam a quantidade e qualidade de pescado disponíveis para extração. Embora considerados riquíssimos, esses recursos naturais ainda são pouco explorados quando consideramos o potencial de produção pesqueira em nível nacional, o que pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Estatística da Pesca no Brasil, no ano de 2000 - Produção de pescado (mil toneladas) estimada por modalidade e por região brasileira.

Região	Total	Pesca Extrativa		Aqüicultura	
		Marinha	Continental	Mar	Água doce
Norte	225.911,0	105.146,5	112.428,5	140,0	8.196,0
Nordeste	219.614,5	136.893,5	50.159,5	24.402,0	8.159,5
Sudeste	155.130,0	101.997,0	19.089,0	564,5	33.479,5
Sul	215.860,0	123.650,0	5.699,0	13.268,0	73.243,0
Centro-Oeste	26.861,0	-	11.783,0	-	15.078,0
TOTAL	843.376,5	467.687,0	199.159,0	38.374,5	138.156,0

Fonte: IBAMA (2002).

Durante muitos anos, os pescadores brasileiros estiveram acostumados a realizar a pesca predatória, o que em algumas regiões contribuiu para a diminuição de algumas espécies de pescado e para a estagnação do setor pesqueiro. Esse quadro foi agravado pela falta de modernização da atividade pesqueira e de pesquisas necessárias ao aproveitamento sustentável da costa litorânea brasileira. Como alternativa à pesca predatória, o cultivo experimental de pescado e mexilhões, baseado em sistemas de aqüicultura, emergiu como uma opção viável em nosso País, com perspectivas de repercussões positivas para a economia e ambiente.

A discrepância na produção de pescado e moluscos nas atividades de pesca de captura tradicionais e de aqüicultura, deve-se obviamente à natureza ainda incipiente e experimental da segunda que requer estudos, procedimentos e investimentos adequados ao seu desenvolvimento. Em que pesem todos esses requisitos para o desenvolvimento da aqüicultura, esta atividade, além de preservar o ambiente, ainda implica bem menos investimentos que a pesca predatória.

Apesar da facilidade de extração da pesca predatória, esta possui importantes limitações, principalmente em relação ao custo, uma vez que os gastos com embarcações (combustíveis, óleo, equipamentos e manutenção), operários, legalização, entreposto de pesca, processamento do produto, necessidade de utilização de frio natural (gelo) ou artificial (gases frigoríficos) e transporte ao

mercado consumidor são atividades que exigem altos investimentos. É um negócio considerado arriscado, se considerarmos todos os problemas enfrentados pelo setor, devendo-se ainda considerar as flutuações naturais que podem tornar o alimento escasso durante determinada época do ano.

A aquicultura é uma atividade que depende diretamente das condições do ecossistema aquático onde será desenvolvida e o equilíbrio ecológico é fundamental para possibilitar o sucesso da atividade. É verdade que o cultivo de pescado e moluscos em cativeiro possui também alguns fatores limitantes que devem ser considerados, como fatores climáticos (condições meteorológicas, radiações solares e temperatura média anual), fatores edáficos (correntes marinhas, condições marítimas, variações hidrográficas, poluição ambiental e turbidez) e fatores bióticos (predadores, competidores, parasitos e *bloom* planctônico). No entanto, esse cultivo permite minimizar consideravelmente os riscos observados na pesca predatória e algumas vantagens adicionais podem ser citadas:

1. Baixo custo de investimento em comparação com a pesca oceânica e costeira;
2. Controle rigoroso na obtenção de um produto de qualidade;
3. Controle do ambiente (alimentação, reprodução, temperatura, salinidade na busca de condições ótimas para o desenvolvimento máximo do animal);
4. Eliminação de problemas naturais (sazonalidade, predadores, competidores e doenças);
5. Produção constante para atender a demanda e as exigências do consumidor (alimento fresco, refrigerado ou congelado).

Além de todos esses fatores citados, a criação em cativeiro elimina muitos outros fatores indesejáveis. Dentre eles podemos destacar o efeito prejudicial de predadores naturais (estrela do mar) e competidores (plantas e animais marinhos) que diminuem a oferta de oxigênio e alimento para os mexilhões. Mas, a principal vantagem do cultivo está centrada no fato de permitir o controle, praticamente total, dos problemas de toxicidade e contaminação microbiológica, quando comparados com os mexilhões capturados diretamente do ecossistema marinho natural (Iversen, 1982).

Quanto ao cultivo de mexilhões, estudos revelam que esta é uma atividade econômica artesanal das mais rentáveis, e os valores nutritivos são considerados altíssimos, superando a carne bovina, suína e de aves. Apresentam uma maior digestibilidade e menor teor de ácidos-graxos não saturados, controlando os níveis de colesterol sanguíneo e reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares. Portanto, o seu consumo é altamente recomendável (Santos, 1982).

Apesar da importância e das vantagens do cultivo de mexilhões, a exploração tanto em relação aos recursos naturais quanto ao cultivo em cativeiro é ainda bastante modesta e a implementação de estações de cultivo experimental, como a pretendida em Jurujuba, é essencial para o desenvolvimento deste setor de atividade.

No Brasil, embora o eixo Rio-São Paulo e as cidades litorâneas do Nordeste produzam mexilhões em escala considerável que são absorvidos pelo mercado interno, em especial nos seus centros urbanos, esta produção ainda é relativamente reduzida considerando-se o potencial pesqueiro nacional. Segundo o IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente), a produção nacional de mexilhões apresenta-se em franco crescimento: em 1990 a produção era de apenas 120 toneladas/ano, em 1997 alcançou 1.089 toneladas e em 2000 houve um acréscimo considerável, atingindo 2.500 toneladas.

Os avanços técnico-científicos observados nos últimos anos, aliados à uma boa política de comercialização poderão certamente contribuir para a expansão significativa desta atividade econômica, uma vez que, como mostra a literatura especializada, a maricultura, se adequadamente desenvolvida e explorada; poderá representar no futuro parcela expressiva da alimentação humana mundial.

1.2- Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões em Jurujuba

Jurujuba é considerada uma das maiores comunidades de maricultores da Baía de Guanabara. Desde a década de 80, os pescadores e maricultores da região vêm travando luta para alcançar sua emancipação social, o que traria dentre muitos benefícios, a melhoria das condições econômicas desse grupo da sociedade e contribuiria com conceitos para a criação de um ambiente saudável naquela região, um dos requisitos fundamentais para o desenvolvimento da saúde e de um ambiente humano sustentável (WHO, 1986, 1988; Costa, 1994).

Devido à ausência de uma política pesqueira direcionada aos pequenos produtores, os pescadores de Jurujuba se organizaram e fundaram a ALMARJ (Associação Livre de Maricultores de Jurujuba), com objetivo de instalar uma tecnologia de cultivo de mexilhões capaz de modificar o quadro de atividade extrativa praticada ao longo dos anos.

A ALMARJ, criada em 1992, representou um marco importante para a organização social e profissional dos maricultores. A partir da sua criação, o engajamento social dos pescadores permitiu à comunidade e seus diversos parceiros institucionais, como veremos a seguir, repensar coletivamente a atividade pesqueira sob vários aspectos sociais e ambientais. Esse novo pensar que surge em decorrência da atividade extrativa de mexilhões, em particular a drástica redução no número de mexilhões disponíveis nos bancos naturais, muito provavelmente resultado do longo processo de degradação ambiental da Baía de Guanabara.

A partir de então, os órgãos governamentais (Prefeitura Municipal de Niterói e Vigilância Sanitária) perceberam a necessidade de incluir os pescadores da ALMARJ nos planos de fiscalização ambiental e tecnológica como requisito fundamental para a existência de um centro de beneficiamento de mexilhões.

Desta forma, a ALMARJ conseguiu assegurar a retaguarda organizacional necessária à implementação da Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões (EECM) responsável pelo beneficiamento destes moluscos, localizada junto à praia de Jurujuba, Niterói, ocupando uma área de 300 m² destinada a atividades diversas, como recepção, estocagem, lavagem e seleção, tratamento térmico e resfriamento, desconchamento e lavagem, embalagem, resfriamento, acondicionamento e expedição. No Capítulo 2, descreveremos em detalhe estas diferentes etapas do processamento dos moluscos na EECM.

A criação da EECM possibilitou à ALMARJ a obtenção do título de posse do terreno de 25 residências, totalizando 3,2 mil m² de terreno construído e também 440 m² de área marinha para a construção de um pier em forma de “T”, visando facilitar a chegada dos barcos e desembarque dos mexilhões.

Além disso, a EECM auxiliou na promoção da organização e profissionalização da atividade de maricultura, criando uma alternativa econômica para os associados da ALMARJ, conforme padrões modernos da gestão social, ambiental e empresarial. Seu objetivo principal é estimular a pesca não predatória, através de sistemas experimentais de cultivo marinho. Entendia-se que esta prática, a longo prazo, reduziria a exploração nos bancos naturais, preservando o ambiente aquático. O domínio tecnológico, por outro lado, aumentaria a geração de renda dos maricultores.

A criação da EECM exigia alguns requisitos legais para seu funcionamento, isto proporcionou aos pescadores o estabelecimento de contatos com diversas autoridades públicas municipais e estaduais. Esses contatos foram importantes e resultaram em parcerias para o desenvolvimento do projeto “Mexilhão Rio” submetido ao Programa Life/PNUD para obtenção de recursos financeiros. A EECM/ALMARJ contou com apoio técnico de uma equipe multidisciplinar de profissionais pertencentes a órgãos governamentais como a Prefeitura Municipal de Niterói (PMN) e a Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ).

O custo total do projeto “Mexilhão Rio” foi orçado em US\$ 122.000,00. O projeto recebeu apoio financeiro da Prefeitura de Niterói e do Governo do Estado do Rio de Janeiro (US\$ 90.000 00), do Programa Life/PNUD (Local Initiative Facility

for Urban Environment/Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento - US\$ 30.000,00) e também da ALMARJ (US\$ 2.000,00). Segundo informações da ALMARJ, nas entrevistas realizadas, todos os recursos foram alocados para compra de equipamentos e materiais para iniciar a implantação tecnológica de cultivo dos mexilhões da EECM.

O projeto “Mexilhão Rio” recebeu apoio tecnológico e científico de organizações governamentais, não-governamentais e comunitárias. Houve a participação de órgãos importantes como: Prefeitura de Niterói (Secretaria de Urbanismo e Ambiente), Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Departamento de Oceanografia e Hidrografia-UERJ), Universidade Federal Fluminense (Departamento de Tecnologia de Alimentos-UFF) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (Coppe-UFRJ). Além de parcerias com diversas instituições: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ), Agência de Desenvolvimento Regional Metropolitana III (SEBRAE/RJ), Federação das Associações de Pescadores do Estado do Rio de Janeiro (FAPESCA), Instituto Niteroiense de Estudos Urbanos (INEU), Instituto de Arquitetos do Brasil – seção Niterói (IAB), Secretaria de Estado de Planejamento e Controle (SECPLAN) e grupos comunitários como a Federação de Moradores de Niterói (FANIT).

A parceria com a FIPERJ resultou no acesso aos estudos realizados pela Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (FEEMA), bem como as análises microbiológicas realizadas pelo Laboratório de Alimentos e Rações (LARA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o que permitiu delimitar a área apropriada para a instalação do cultivo de mexilhões. Os resultados desses estudos laboratoriais apontaram a região próxima à Fortaleza de Santa Cruz como a ideal para iniciar o programa de cultivo, pois revelava na ocasião baixos índices de poluição ambiental. No entanto, como essa área é de propriedade militar, o projeto inicial foi submetido às exigências burocráticas junto ao Exército e à Marinha do Brasil, passando por longo processo de aprovação. O processo burocrático somente foi concluído ao final do ano de 2002, com a liberação pelas autoridades das áreas militares próximas à Fortaleza de Santa Cruz, para exploração dos mexilhões pela ALMARJ/EECM.

Contudo, durante o período das coletas dos mexilhões para avaliação microbiológica, em nossa investigação, compreendido entre janeiro a dezembro de 2000, nenhuma solução viável tinha sido até então proposta. Os pescadores foram obrigados a aguardar o parecer do Exército e da Marinha sobre o projeto inicial. Enquanto não havia autorização para sua atividade na região próxima à Fortaleza de Santa Cruz, não lhes restou outra saída senão continuarem a praticar a extração de mexilhões nos bancos naturais da região da Baía de Guanabara, muitos dos quais em áreas poluídas.

A atividade extrativa, que continuou sendo praticada no período de nosso estudo pela EECM/ALMARJ, pode ser estimada em cerca de uma tonelada por dia, abastecendo restaurantes de Niterói e Rio de Janeiro. Esse quadro, embora reflita o enorme esforço realizado por esta comunidade para preservar sua atividade apesar das condições adversas de seu entorno tem se mostrado altamente preocupante para a saúde pública. Como veremos no Capítulo 4, além dos patógenos emergentes por nós identificados nos moluscos coletados e sua resistência antimicrobiana, chamam também a atenção os altos índices de poluição da Baía de Guanabara, expressa por outros indicadores apontados na literatura sobre o tema (índices de coliformes fecais, presença de mercúrio e outros metais pesados), além de substâncias tóxicas diversas, como óleos e derivados do petróleo, lançadas neste ecossistema através de acidentes como o derramamento de óleo ocorrido em janeiro de 2000 (Ribeiro, 2000; Moutella, 2001; Pinheiro Jr., et al., 2002).

1.3- Impactos Ambientais dos Derramamentos de Óleo: Agravamento dos Obstáculos Enfrentados pela EECM/ALMARJ

No período de 1997 a 2000 foram registradas na Baía de Guanabara 12 graves ocorrências de vazamento de óleo nos dutos da Refinaria de Duque de Caxias (ReDuc), sendo 6 deles na região da Ilha D'Água. Em 2000, no início de nosso estudo, ocorreram graves acidentes ambientais na Baía de Guanabara afetando consideravelmente as iniciativas dos maricultores da ALMARJ/EECM. No período do derramamento de óleo na Baía de Guanabara, os maricultores da região de Jurujuba e demais pescadores e maricultores do entorno da Baía foram impedidos de realizar suas atividades de extração e cultivo de mexilhões ocasionando perdas econômicas, além de grave repercussão para o ambiente.

O primeiro acidente, de maior repercussão, ocorreu em janeiro de 2000 e ocasionou o vazamento de 1 milhão e 300 mil litros de óleo provocado pelo rompimento de um duto de 13 quilômetros que liga a Refinaria de Duque de Caxias (subsidiária da Petrobras) ao terminal de navios na Ilha D'Água. O vazamento ocorreu cerca de 2 quilômetros da Reduc e durou aproximadamente 30 minutos. O óleo despejado atingiu 40 quilômetros de extensão, afetando gravemente diversas comunidades que vivem no entorno da Baía de Guanabara. A maior preocupação das autoridades era a preservação do manguezal de Guapimirim, área de reprodução de peixes e crustáceos considerada Área de Proteção Ambiental (APA). Ambientalistas e cientistas estimam que a recuperação do ecossistema da Baía de Guanabara deverá levar no mínimo 10 anos.

Dada a importância dos danos ambientais causados, vários órgãos, como o CREA-RJ (Conselho Regional de Engenheiros e Arquitetos do Rio de Janeiro), SINDIPETRO-RJ (Sindicato dos Petroleiros do Rio de Janeiro), Secretarias de Ambiente, dentre outros, mobilizaram diversas iniciativas políticas com o objetivo de apurar as causas e responsabilidades sobre os sucessivos vazamentos de óleo na Baía

de Guanabara. Foram realizadas audiências públicas com a participação de organizações governamentais, não-governamentais e inclusive pescadores e representantes de várias comunidades atingidas. Foi instaurada também uma CPI (Comissão Parlamentar de Inquérito) destinada a apurar as causas e efeitos desses desastres ecológicos de ampla repercussão para o ecossistema.

Os resultados desses movimentos apontaram a responsabilidade da empresa Petrobras, que foi multada pelos danos ambientais provocados pelo derramamento de óleo. A empresa realizou um cadastramento de todos os pescadores a fim de indenizá-los pelo acidente e para isso utilizou dados das prefeituras dos municípios localizados no entorno da Baía de Guanabara. No entanto, esses dados não foram cruzados com as informações disponíveis nas associações e colônias de pescadores, o que gerou dúvidas sobre a veracidade do processo, levantando inclusive suspeitas de possíveis fraudes. Além disso, as medidas adotadas pela empresa após o acidente também foram muito questionadas. Constatou-se que houve demora na busca da solução dos problemas e que a infra-estrutura da empresa era precária, a ponto da Petrobras ter que importar bóias de contenção de óleo. Esses fatos apontam para a necessidade de implementação de uma efetiva política ambiental, capaz de prevenir acidentes e solucionar problemas com maior rapidez e eficácia.

Neste sentido foi criada a Lei nº 9.966 (Brasil, 2000), que dispõe sobre a prevenção, controle e fiscalização da poluição causada por derramamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas, em águas sob jurisdição nacional. Todas as empresas, instituições portuárias e navios são obrigados a possuir um Plano de Emergência Individual e também integrar um Plano de Emergência Local junto aos órgãos públicos como: Marinha do Brasil, Defesas Cíveis Estaduais e Municipais, FEEMA e Cia. Docas, que realizam projetos de coordenação e fiscalização deste plano.

A correta implementação e fiscalização dos planos de preservação e controle de derramamento de óleo são fundamentais para a preservação do ecossistema aquático e da qualidade dos mexilhões e pescados da Baía de Guanabara. Todos os esforços realizados até aqui pela ALMARJ/EECM serão inúteis se não houver uma efetiva política ambiental que assegure a reversão do grave quadro de poluição desta Baía e crie condições adequadas para as atividades governamentais e

da sociedade no sentido da implementação de um sistema de controle de qualidade capaz de assegurar condições de consumo destes moluscos.

1.4. Controle de Qualidade e Condições de Consumo dos Mexilhões:

Como vimos nesse estudo, os mexilhões são moluscos bivalves filtradores e por esta razão, quando extraídos de regiões com alta poluição do ecossistema aquático, como a Baía de Guanabara, podem representar importante veículo de transmissão de bactérias e vírus patogênicos, além de metais pesados e outras substâncias tóxicas. Há também a possibilidade de contaminação por bactérias autóctones presentes no ambiente marinho, como é o caso das espécies pertencentes às famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae. Portanto, a qualidade dos mexilhões deverá ser constantemente monitorada através de análises microbiológicas e físico-químicas a fim de garantir a produção de um alimento inócuo para a saúde humana (Ribeiro, 2000; Moutella, 2001).

Em geral, a maioria dos países, incluindo o Brasil, submetem a liberação do consumo de mexilhões aos resultados da análise dos níveis de coliformes fecais e *Escherichia coli* presentes no ambiente. No entanto, há grande diversidade de critérios quanto aos níveis de coliformes fecais permitidos tanto na água de cultivo quanto na carne do mexilhão. Em nosso País, a ANVISA, através da RDC 12/2001, dispõe que os moluscos bivalves resfriados ou congelados devem ter no máximo 5 x 10 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de coliformes a 45° C/g (5000 UFC/100g). No México, por outro lado, a legislação para coliformes fecais presentes na carne dos mexilhões é bem mais restritiva e prevê no máximo 230 UFC/100g. No Canadá, a legislação referente aos coliformes fecais na carne dos mexilhões é ainda mais rigorosa, permitindo apenas 170 UFC/100g.

Portanto, há necessidade de reflexão em nosso País quanto aos mais adequados e seguros parâmetros, sob o ponto de vista da saúde pública, quanto à presença aceitável de coliformes fecais na carne dos mexilhões. Ressaltamos que,

embora importante, esse parâmetro não asseguraria totalmente, por si só, a qualidade dos mexilhões, sendo necessária a discussão de outros critérios e possíveis mudanças de legislação como veremos adiante, pois existem microrganismos que podem estar presentes independentemente dos níveis de coliformes fecais, como no caso dos diversos microrganismos das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae isolados no presente estudo.

A fim de evitar danos à saúde pública são conhecidas três regras básicas e simples quanto à manipulação de mexilhões, internacionalmente adotadas: **transportá-los rapidamente, mantê-los limpos e refrigerados, e cozinhá-los em temperatura adequada.** Além destas regras é necessário evitar a extração ou o cultivo em áreas com risco de contaminação, e alguns países como os Estados Unidos e Canadá submetem os mexilhões a processos de depuração natural ou artificial (ozonização, cloração ou irradiação com luz ultravioleta) (Crocì et al., 1994; Lopes, 2001; Bella et al., 2000; Muniaini-Mujika et al., 2002).

A depuração natural ou artificial, isto é, a purificação do produto antes da venda ao consumidor, elimina a maioria dos microrganismos. Porém, é importante destacar que esse procedimento é ineficaz em casos de contaminação por metais pesados e também por certos vírus (hepatite viral e enterovírus). Por esta razão, os processos de depuração têm sido bastante questionados por microbiologistas, uma vez que nem sempre são eficientes quando os mexilhões são provenientes de águas muito poluídas, como é o caso da Baía de Guanabara.

Cabe aqui destacar que o conceito de águas poluídas é bastante controverso. Da mesma forma que para a carne dos mexilhões, cada país institui seus padrões para a quantidade de coliformes fecais permitidos na água de cultivo de moluscos bivalves. Nos Estados Unidos, por exemplo, a liberação de áreas consideradas livres para cultivo de mexilhões é efetuada levando-se em consideração o número máximo de coliformes fecais presentes na água, que não deverá ultrapassar 88 UFC/100mL de água salgada. No Canadá, a legislação prevê como áreas livres para cultivo de moluscos, o número máximo de coliformes fecais em 43 UFC /100mL de água salgada. No México, as águas livres para cultivo para mexilhões serão liberadas apenas quando tiverem no máximo 14 UFC coliformes fecais/100mL de água salgada.

No Brasil, em 1988, o então Ministério da Agricultura (MA), estabeleceu limites referentes à presença de coliformes fecais em águas destinadas ao cultivo de mexilhões (Informação DIPES, nº 097/88), estipulando que as **áreas proibidas** serão aquelas cujo resultado das análises microbiológicas apresentar níveis superiores a 700 coliformes fecais/100mL de água salgada. Esse mesmo dispositivo estabeleceu que as **áreas limitadas** para cultivo contêm níveis de coliformes fecais entre 70-700 coliformes fecais/100mL, sendo indispensável o tratamento dos moluscos através de depuração. As **áreas livres** para maricultura são aquelas que contêm menos de 70 coliformes fecais/100mL de água salgada (Brasil, 1988).

Com base nesse dispositivo, estudos têm sido realizados com o objetivo de monitorar as condições microbiológicas das águas destinadas ao cultivo de mexilhões no País, caracterizando as áreas proibidas, limitadas e livres, segundo a presença de coliformes fecais. Pinheiro Jr. et al. (2002), pesquisaram a qualidade microbiológica de 5 pontos diferentes do ecossistema aquático de Niterói como pode ser observado na tabela a seguir:

Tabela 3- Percentual de amostras de águas classificadas* em função dos resultados da colimetria.

Estação	Proibida	Limitada	Livre
Icaraí	29,4%	17,7%	52,9%
Boa Viagem	25,3%	29,4%	35,3%
Santa Cruz	58,8%	-	41,2%
Piratininga	7,1%	-	92,9%
Rio Branco	-	-	100%

*Classificação, segundo Brasil (1988).

Fonte: Pinheiro Jr. et al., 2002.

Os resultados deste estudo apontam para a necessidade de realização de processo depurativo em mexilhões oriundos das regiões limitadas para cultivo. Paralelamente ao processo de depuração, outros métodos devem ser utilizados como a manipulação higiênica, tratamento de esgotos, cozimento e refrigeração suficientes, resfriamento rápido após cozimento, proibição de cultivo em áreas de risco e

implementação do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) para minimizar os riscos de toxinfecção alimentar veiculadas por microrganismos patogênicos.

Considerações Finais:

Considerando a extensão da costa litorânea brasileira e seu enorme e ainda inexplorado potencial para aquicultura, o incentivo governamental e da sociedade à prática tecnológica de cultivo de moluscos bivalves marinhos, incluindo os mexilhões, pelas populações “ribeirinhas” contribuiria para minimizar os graves problemas sociais e econômicos enfrentados por essa parcela da população. Com o devido apoio, essa prática poderá ser adequadamente explorada no Estado do Rio de Janeiro e em outras regiões do País, com vantagens econômicas para os maricultores e importante retorno social, considerando-se o quadro de pobreza e desnutrição que atinge milhões de brasileiros.

Quanto à experiência da EECM no Estado do Rio de Janeiro, esta atividade, embora tenha resultado em cooperações locais e inter-institucionais bastante importantes e frutíferas, irá certamente requerer iniciativas de longo prazo que assegurem sua continuidade preservando as conquistas até aqui alcançadas. Além do espírito empreendedor dos integrantes da ALMARJ, observa-se também que os mesmos possuem elevada consciência ambiental. Durante o período do nosso estudo, embora esses pescadores tenham se visto, obrigados pelas circunstâncias, a persistir na extração predatória do ambiente aquático, realizaram interessante e importante esforço de recuperação ambiental, lançando as sementes de mexilhões que seriam utilizadas no cultivo diretamente nos bancos naturais de onde eram extraídos.

A organização social da comunidade envolvida numa atitude transformadora desta realidade, repensando o ambiente e revendo os conceitos relacionados à saúde e qualidade de vida, certamente contribuirá com novas perspectivas de promoção da saúde pública modernamente concebidas (Czeresnia, 1999; Akerman et al., 2002). Entretanto, esta consciência ambiental deverá encontrar condições legais e institucionais que favoreçam o seu florescimento e algumas questões centrais deverão ser equacionadas:

1. Com a recente aprovação da área próxima à Fortaleza de Santa Cruz e o novo cultivo experimental das sementes de mexilhões na região, esta atividade será rentável o suficiente para permitir que os maricultores abandonem definitivamente suas atividades extrativas nos pontos tradicionais altamente poluídos da Baía de Guanabara?
2. Os dados recentes que apontam para cerca de 60% de áreas proibidas (índices de colimetria) para cultivo e extração de mexilhões na região da Fortaleza de Santa Cruz, não estariam revelando um crescimento da poluição nesta área desde o início de nosso estudo?
3. Com relação ao controle de qualidade do produto final, será diferenciado para o consumidor, na embalagem, o mexilhão de qualidade obtido por cultivo experimental do mexilhão extraído dos bancos naturais?

Essas questões devem ser amplamente discutidas buscando garantir a credibilidade do produto oferecido pela ALMARJ/EECM e criando condições para a implementação de estratégias de desenvolvimento sustentável, promoção e educação da saúde dos trabalhadores e dos consumidores de mexilhões capazes de melhorar a qualidade de vida da sociedade (Melo & Costa, 1994; Arroyo & Cerqueira, 1997).

Como veremos mais adiante, os mexilhões extraídos da Baía de Guanabara podem representar sérios riscos para a saúde humana. Embora existam critérios e alternativas tecnológicas internacionalmente reconhecidas, que permitem identificar pontos de menor risco e minimizar o impacto da poluição, esses procedimentos só poderão ser seguros se realizados em áreas não proibidas. Como referido, segundo a Informação DIPES nº 097/88, a depuração se restringe às áreas de poluição limitada de acordo com os índices de coliformes fecais, cabendo ainda observar que a tecnologia de depuração não se aplica a metais pesados. Somente nestas áreas se poderá realizar a extração sustentável e segura desses moluscos, com benefícios para a saúde pública e ambiente.

Nas áreas não proibidas, uma possível alternativa tecnológica que tem sido largamente utilizada internacionalmente para melhorar a qualidade da matéria-prima e reduzir os níveis de coliformes fecais e outros microrganismos, seria a implementação de iniciativas governamentais e mecanismos de crédito aos

maricultores para a construção de tanques de depuração natural ou artificial. Isto permitiria minimizar, nas áreas ainda não totalmente poluídas, os riscos que a presença dos coliformes fecais nos mexilhões representa para a saúde dos consumidores.

Para controlar a efetividade do processo de depuração, poderiam ser realizadas análises microbiológicas amostrais antes dos mexilhões entrarem nos tanques de depuração e depois, ao saírem a fim de constatar a diminuição ou eliminação desses patógenos. Essa medida, implantada em países como o Canadá e Estados Unidos, aumentaria a qualidade do produto e atuaria também como medida preventiva da ocorrência de Doenças de Transmissão Alimentar veiculadas por alimentos de origem marinha até que a extração pudesse se dar em águas menos poluídas.

Com relação à questão da qualidade aqui mencionada, faremos no capítulo seguinte, a partir destas considerações quanto à experiência da EECM/ALMARJ, breve descrição do sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) que representa a principal recomendação tecnológica referentes às melhorias que poderiam ser feitas nas instalações e no processamento tecnológico dos mexilhões pré-cozidos.

Capítulo 2

Aspectos Tecnológicos na Indústria de Mexilhões: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)

A indústria de mexilhões no Brasil é um setor em franco desenvolvimento que necessita de atenção técnica e científica, no que se refere à sua implementação e funcionamento a fim de se obter um produto de qualidade e seguro para a saúde pública. A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) representa uma valiosa ferramenta utilizada no campo da vigilância sanitária de alimentos, constituindo-se numa metodologia baseada na avaliação completa do processamento tecnológico. Essa avaliação permite identificar os principais perigos de contaminação na cadeia produtiva, sejam de ordem microbiológica ou físico-química. Os resultados permitem analisar a frequência de contaminação por microrganismos e em quais etapas do processo produtivo existe maior probabilidade de proliferação, contaminação ou sobrevivência de patógenos (Sunner & Ross, 2002).

O sistema APPCC é um método não tradicional e descontínuo de inspeção de alimentos, baseado no controle de perigos e pontos críticos, sendo composto por sete princípios básicos que constituem a sua definição:

1. Analisar os perigos de seguridade dos produtos e sanidade dos alimentos;
2. Estabelecer os pontos de controle, identificando quais destes são críticos;
3. Estabelecer limites em cada ponto de controle crítico;
4. Estabelecer as ações corretivas a serem tomadas;
5. Estabelecer formulários de registros que documentem a rotina de operação;
6. Estabelecer procedimentos para verificação do perfeito funcionamento do plano.

Esse sistema foi criado pela NASA (National Aeronautics and Space Administration), agência americana responsável por pesquisas espaciais, devido à necessidade de produzir alimentos 100% seguros e livres de contaminação, para evitar problemas de toxinfecção alimentar nos astronautas durante as viagens ao espaço. Diversos estudos demonstraram que a única maneira de se obter esse resultado seria estabelecer o controle rigoroso de todas as etapas do processamento tecnológico dos alimentos, desde a obtenção da matéria prima, controle ambiental, higiene pessoal até o armazenamento e distribuição do produto para consumo. Assim, o sistema APPCC foi desenvolvido a partir de conceitos preventivos sendo apresentado pela primeira vez durante a Conferência Nacional de Proteção de Alimentos realizada nos Estados Unidos em 1971. A partir de então, a agência Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA-Food and Drug Administration), implementou uma regulamentação baseada na APPCC para as indústrias de alimentos de baixa acidez.

Em 1985, a Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos recomendou o uso de Sistemas APPCC em programas de proteção de alimentos, sugerindo o treinamento de pessoal dos órgãos públicos e das indústrias alimentícias nesse sistema. Sendo uma estratégia preventiva de base científica e sistemática, seus principais benefícios incluem a prevenção de eventuais perigos, a identificação de pontos críticos de controle e seus registros, garantindo a produção de alimentos seguros e a oportunidade de incrementar a produtividade e competitividade entre as empresas (Rodrigues et al., 1996).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Portaria nº 1.428/1993, estabeleceu a obrigatoriedade da implantação dos procedimentos adotados pelo sistema APPCC nas indústrias de alimentos a partir de 1994. A partir de então, o Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, através do SEPES/DIPOA - Brasília (Setor de Pescados da Diretoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal) tem desenvolvido a implantação do Programa Brasileiro de Controle de Qualidade junto às indústrias pesqueiras de todo o país, com objetivo principal de produzir alimentos com o mínimo de riscos para a saúde do consumidor (Brasil, 1993).

O SEPES/DIPOA criou o Comitê Técnico Intersetorial (CTI), cujas normas de funcionamento instruem as indústrias de alimentos quanto aos requerimentos básicos para elaboração de Controle de Qualidade fundamentados no sistema APPCC.

Esse programa inclui parâmetros de ordem econômica e higiênico-sanitária, que estabelecem maneiras de prevenir a perda da qualidade dos produtos elaborados, garantindo as características nutritivas e sensoriais dos diferentes produtos marinhos.

O projeto de controle de qualidade das indústrias deve ser apresentado ao CTI regional antes de ser enviado para o SEPES/DIPOA, onde será aprovado preliminarmente caso satisfaça os requisitos pertinentes. O projeto deverá conter um plano amplo sobre o controle de qualidade dos alimentos elaborados pela empresa, um mapa organizacional (organograma) da empresa, juntamente com a narrativa da função de cada indivíduo nele inserido.

A descrição do produto alimentício deverá ser a mais completa possível, discriminando o fluxograma de produção (Anexos) e a localização de todos os prováveis pontos críticos de controle. Para cada ponto crítico devem ser discriminados os riscos, as medidas preventivas, os limites críticos, o monitoramento e as ações preventivas, bem como os registros oficiais e as verificações realizadas pela empresa durante o processo de produção.

O formato do sistema APPCC segue uma série de etapas inter-relacionadas, inerentes ao processamento tecnológico das indústrias de alimentos, incluindo as operações envolvidas na produção e no consumo final. Inclui em primeiro lugar, o organograma da empresa onde deve ser elaborado o diagrama do estabelecimento industrial, com a indicação dos setores que efetivamente participam do desenvolvimento, implantação e manutenção do plano. Neste organograma, o setor de garantia de qualidade deverá estar ligado diretamente a direção geral da empresa, para que toda e qualquer medida possa ser analisada segundo a viabilidade econômica. A sua narrativa deve ser completa, ou seja, todos os funcionários com suas respectivas funções devem ser relacionados, para que haja um comprometimento por parte de todos os setores. Devem estar previstas a análise sistemática e a revisão do plano APPCC realizada em conjunto com o pessoal de nível gerencial. A integração dos setores e conscientização de todos os funcionários é imprescindível para a eficácia do plano (ICMSF, 1997).

A análise dos perigos potenciais e suas medidas preventivas envolve, inicialmente, a identificação destes perigos durante o processo de elaboração do

produto. O perigo pode ser definido como a contaminação do alimento por microrganismos patogênicos. A presença de microrganismos deve ser considerada um perigo quando estiverem em níveis inaceitáveis pelas Boas Práticas de Fabricação (BFP), sendo capazes de causar a deterioração do produto ou ocasionar surtos de toxinfecção alimentar, de ampla repercussão para a saúde pública. De acordo com os conceitos do sistema APPCC, uma vez identificados os perigos, estes devem ser prevenidos, reduzidos ou eliminados.

O controle de pontos críticos envolve a elaboração de um diagrama operacional do produto, de maneira seqüencial, clara e simples de todas as suas etapas de processamento. Um ponto crítico de controle pode ser considerado como qualquer ponto, etapa ou procedimento no qual o controle pode ser aplicado, a fim de garantir a segurança do alimento. Os controles são usados para prevenir, eliminar ou reduzir a níveis aceitáveis, os perigos identificados. Existem dois tipos de Pontos Críticos de Controle (PCC), um no qual o perigo pode ser eliminado ou prevenido garantindo a segurança do produto (PCC1), e outro, no qual o perigo é minimizado, mas não é eliminado nem prevenido, não garantindo a segurança do produto (PCC2). Cabe ressaltar que as Boas Práticas de Fabricação são consideradas como pré-requisito fundamental para a aplicação do sistema APPCC (ITAL, 1995).

O estabelecimento de medidas preventivas constitui a ação mais importante do plano APPCC para a garantia da saúde pública, qualidade do produto e integridade econômica. Cada perigo identificado no ponto de controle crítico (PCC) deverá estar associado a uma ou mais medidas preventivas, as quais devem ser adequadamente estabelecidas para assegurar a prevenção, redução ou eliminação do perigo.

O limite crítico consiste num critério que deve estar associado a medidas preventivas de cada PCC para assegurar o controle do perigo. Os parâmetros, para os limites críticos, podem ser quantitativos ou qualitativos e a fixação desses limites deve ser obtida de fontes como guias e padrões da legislação de alimentos fornecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ou pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Municipais.

Os procedimentos de monitoramento são uma sequência planejada de observações e mensurações, realizadas para assegurar que os limites críticos de um PCC não sejam excedidos, garantindo o controle do PCC. É uma das fases fundamentais para o êxito do programa de controle de qualidade. Recomenda-se o monitoramento contínuo através da prática de métodos microbiológicos e físico-químicos. Convém ressaltar que os métodos e equipamentos utilizados devem ser continuamente aferidos, calibrados e validados para manter uma margem de erro mínima.

O estabelecimento de medidas corretivas deve ocorrer ao se constatar que os limites críticos foram excedidos durante qualquer uma das fases de elaboração do produto. Se necessário, a produção deve ser interrompida e as ações corretivas empregadas para restaurar o processo normal. Há necessidade de estabelecer um sistema de registro ou arquivo no qual todos os dados obtidos durante os procedimentos de monitoramento, verificação, resultados laboratoriais devem ser registrados em formulários próprios.

Os registros devem incluir informações relativas à equipe de APPCC e suas respectivas atribuições, descrição do produto, fluxograma da cadeia produtiva e as demarcações dos PCCs, dos perigos, medidas preventivas e limites críticos. Devem constar, também registros do sistema de monitoramento para os desvios dos limites críticos, além de procedimentos para verificação do sistema APPCC. Recomenda-se que os resultados desses procedimentos sejam resumidos através de gráficos ou tabelas, registrando, também os desvios e suas causas.

O procedimento de verificação deverá ser documentado e tem como objetivo verificar se os procedimentos relacionados ao sistema APPCC estão sendo executados adequadamente. Existem três processos envolvidos na verificação: processo técnico científico, que verifica se os limites críticos nos PCCs são satisfatórios, processo de comprovação, que assegura o funcionamento do sistema; e o processo de revalidação que visa assegurar a exatidão e eficácia do sistema APPCC. Esses processos devem ser executados por pessoa da própria empresa, independente da atividade relacionada aos procedimentos de vigilância ou por auditores externos. A determinação da frequência dos procedimentos de verificação é de exclusiva responsabilidade da diretoria da empresa.

O sistema APPCC privilegia a importância sobre a prevenção da contaminação dos alimentos por microrganismos. As medidas preventivas são extremamente importantes, particularmente sob o ponto de vista econômico, pois prevenir um perigo evita gastos desnecessários nas várias esferas da cadeia produtiva. Tais medidas têm repercussão inclusive no sistema de atenção à saúde, que receberá uma menor quantidade de indivíduos acometidos por doenças de veiculação alimentar.

A primeira medida preventiva está relacionada à obtenção da matéria prima. O produtor deve estar atento para qualidade do produto inicial, que será usado na indústria de alimentos na composição do produto final. Da mesma maneira, ingredientes adicionais devem ser rigorosamente selecionados, para garantir que o alimento produzido seja inócuo para a saúde humana, além de garantir as propriedades nutritivas e a competitividade no mercado consumidor.

Especificamente, no caso dos mexilhões avaliados na presente investigação, observamos a necessidade de programas de avaliação das condições ambientais do ecossistema marinho, através da realização periódica de análises microbiológicas e físico-químicas. Através desses programas seria possível garantir as características ideais dos mexilhões *in natura* e conseqüentemente dos pré-cozidos.

Neste sentido, deve-se evitar ao máximo a extração ou cultivo de mexilhões em áreas com risco de contaminação bacteriológica, metais pesados ou defensivos agrícolas. Nos casos em que os resultados da avaliação das condições ambientais demonstrarem níveis de poluição ou contaminação acima dos permitidos pela legislação vigente, torna-se vital que os órgãos competentes atuem junto aos produtores de pescado a fim de limitar as áreas atingidas e proibir pontualmente a pesca predatória, até que a situação se normalize. Essa atitude permite selecionar o produto que será oferecido ao consumidor. É interessante acrescentar que essa seria uma das medidas, pois não existe, em tecnologia de alimentos, um procedimento isolado capaz de assegurar a qualidade do produto, mas uma integração de vários procedimentos.

A possibilidade de contaminação do produto por microrganismos, nas diferentes etapas do processamento pode deteriorar o produto ou causar toxinfecção alimentar em seres humanos. Além da contaminação bacteriológica nas áreas de risco ambiental, existem diversas formas do microrganismo estar presente no alimento, sendo

comum a transmissão direta pelo contato das mãos do manipulador, durante a manipulação, processamento ou comercialização.

Atualmente, a transmissão ambiental constitui uma das mais importantes formas de contaminação de alimentos, pois o produto *in natura* pode conter diversos patógenos oriundos do seu próprio *habitat*. Nesta situação, incluem-se os mexilhões *in natura* e pré-cozidos, avaliados na presente investigação, que apresentaram uma variedade de microrganismos pertencentes às famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae, algumas espécies emergentes e outras com relevante potencial patogênico. Portanto, iniciaremos aqui uma análise dos pontos críticos de controle mais importantes identificados durante o processamento tecnológico dos mexilhões, a fim de contribuir para a definição de estratégias de prevenção da contaminação microbiológica (Silva Jr, 1995).

Inicialmente, as instalações da empresa que se destina a beneficiar os mexilhões devem ser construídas de acordo com as normas exigidas pelo Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, BRASIL, 1997). Resumidamente as principais características de uma instalação adequada incluem:

- Pisos resistentes, antideslizantes, impermeáveis e laváveis;
- Paredes resistentes, impermeáveis, lisas, laváveis e tons claros;
- Teto não poroso, não absorvente, pintado com tinta clara e lavável;
- Portas externas com mecanismos de fechamento automático, janelas com vidros e ventilação, protegidas com tela de 1,18 mm (malha);
- Iluminação uniforme, de maneira a não formar sombras ou alterar as cores;
- Sistemas de ventilação adequados;
- Sanitários e vestiários anexos e separados para cada sexo;
- Refeições em local apropriado, nunca nos locais de processamento;
- Depósito específico para objetos e materiais comestíveis, bem como para materiais tóxicos;
- Local específico para lavagem e secagem de mãos.

Em seguida, devemos estar atentos para a qualidade dos equipamentos e utensílios que entrarão em contato direto ou indireto com o produto. Os equipamentos e utensílios devem ser feitos de material liso, atóxico, não absorvente e resistente à

repetidas operações de limpeza e desinfecção. Os utensílios de manipulação do produto devem ser marcados e não devem ser utilizados com outros tipos de alimento. As mesas devem ser construídas com superfícies lisas, de preferência de aço inoxidável, devendo-se evitar madeira, pois as fendas presentes no material proporcionam ambiente favorável para o cultivo de bactérias e fungos.

A prática de higiene pessoal deve ser parte da rotina dos funcionários envolvidos direta ou indiretamente com os procedimentos tecnológicos. Os funcionários devem ser orientados através de cursos e palestras que beneficiem a conscientização através da educação participativa. Cabe ao departamento pessoal da empresa verificar se as recomendações estão sendo seguidas em todos os setores do estabelecimento, além de providenciar exames de saúde periódicos (exame de fezes e outros). A proibição da presença de animais e pessoas estranhas ao trabalho deve ser terminantemente expressa.

Os funcionários devem ser alertados para não armazenarem equipamentos, roupas e outros materiais em desuso dentro das salas de processamento ou nas áreas de estocagem. Entretanto, apenas essas medidas não serão suficientes, se as dependências do estabelecimento não oferecerem condições para que os funcionários possam executar os hábitos higiênico-sanitários recomendados. Portanto, todas as dependências devem possuir sistemas de lavagem, enxágüe e tratamento bactericida para as mãos, lembrando que essa substância deve ser inócua tanto para a pele dos manipuladores quanto para o produto alimentício.

Após demarcadas as áreas de coleta dos mexilhões, passa-se à etapa de transporte, na qual devemos estar atentos para alguns detalhes como: o intervalo entre coleta e processamento deve ser o mais breve possível e os moluscos não devem ficar expostos diretamente ao sol ou sob superfícies quentes para não acelerar o processo de morte e deterioração do produto. No caso de animais que serão cozidos e desconchados, estes devem ser colocados em caixas com gelo ou outra forma de resfriamento mais efetivo, para garantir a qualidade dos mesmos. É recomendável transportá-los em monoblocos de polietileno sem água, mas com ambiente úmido. O ideal, entretanto seria transportá-los resfriados à temperaturas situadas entre 10 e 15°C. O tempo de transporte, nessas condições, não deve exceder 12 horas, apesar de os animais poderem permanecer vivos por até 24 horas, no caso dos cultivados e até mais, no caso dos silvestres.

A etapa de seleção e lavagem dos mexilhões *in natura*, oriundos dos bancos naturais, devem seguir algumas normas básicas para reduzir a carga microbiana do produto. Com esse objetivo, deve ser realizada lavagem em água corrente para retirada de toda fauna e flora acompanhante. Naqueles casos de haver muitos organismos incrustantes, os mexilhões devem ser submetidos a algum sistema de fricção. Salienta-se que todos os moluscos com as valvas quebradas ou semi-abertas devem ser descartados.

O fornecimento de água e o tratamento de efluentes são pontos de controle durante todas as fases da cadeia produtiva dos mexilhões. A qualidade microbiológica e físico-química da água de abastecimento deve ser monitorada a cada 15 dias, com a finalidade de garantir sua potabilidade e níveis corretos de cloro. A utilização de sistemas de decantação e eliminação de contaminação para as águas residuais e efluentes é obrigatória especialmente, para a preservação ambiental.

Pelo fato da água entrar em contato direto com o produto *in natura* e pré-cozido e devido à possibilidade de veiculação de patógenos pelas vias hídrica e alimentar, em casos de contaminação por bactérias, uma medida preventiva eficaz consiste em submeter os mexilhões a processos de depuração natural ou artificial, os quais permitem a eliminação de grande parte das bactérias presentes em seus sifões.

A imersão dos mexilhões vivos, por uma a duas semanas, em ambiente aquático livre de microrganismos, é a prática mais comum de depuração natural, enquanto que a cloração, ozonização ou ultravioleta representam processos artificiais. Convém ressaltar, que essas práticas devem ser permitidas pelas autoridades competentes através de legislação específica.

Do ponto de vista tecnológico, um dos principais fatores que auxiliam na prevenção da contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos ou evita a multiplicação das bactérias pré-existentes no alimento é o controle da temperatura. O binômio tempo x temperatura consiste numa ferramenta importante para eliminar ou diminuir a carga microbiana presente no alimento, durante as etapas de processamento, manipulação e distribuição do produto para consumo. Através do aumento ou diminuição da temperatura é possível controlar esse ponto crítico na cadeia produtiva.

É interessante observar que cada espécie de microrganismo possui características estruturais e metabólicas próprias, oferecendo condições específicas com relação à resistência ao frio ou calor e ao tempo de exposição. A fim de utilizar corretamente o tempo e a temperatura como medidas de controle e prevenção, assegurando as condições higiênico-sanitárias dos alimentos, é necessário conhecer a temperatura de multiplicação ideal e limitante dos microrganismos patogênicos, a resistência dos patógenos quando submetidos a diferentes temperaturas e o tempo correto para atingir a eficácia do procedimento (cocção, congelamento ou ambos alternadamente).

As temperaturas altas são utilizadas para eliminar os patógenos através do efeito bactericida, enquanto as temperaturas baixas, agem através do efeito bacteriostático, ou seja, impedem a multiplicação da bactéria diminuindo seu metabolismo, sem causar a sua morte.

De um modo geral, a cocção do alimento a 70°C por aproximadamente 2 minutos ou 65°C por 15 minutos é suficiente para reduzir ou eliminar a maioria dos microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. Na indústria de mexilhões, na etapa de pré-cozimento, recomenda-se cocção, de preferência, em autoclave, com peneira, onde os animais são cozidos rapidamente no vapor, sem contato direto com a água, resfriamento rápido em água com gelo e transferência rápida para água fria com antioxidante ou semelhante (ácido cítrico).

Após a etapa de pré-cozimento, os mexilhões resfriados rapidamente devem ser desconchados. Esse processo é realizado manualmente e de preferência sob água corrente. As conchas devem ser eliminadas do local de processamento, o mais rápido possível, para evitar contaminação cruzada. No caso de animais com bisso, este deve ser removido. Os recipientes para depósito dos moluscos desconchados devem ser pequenos, rasos e perfurados para facilitar o escoamento da água. Logo após o desconche, deve-se submeter os mexilhões a outro tratamento de lavagem e resfriamento usando substância com poder antioxidante. Os mexilhões desconchados devem ser resfriados imediatamente para venda ou congelados para estocagem.

Temperaturas de congelamento afetam os microrganismos Gram negativos e a faixa de temperatura que causa maior letalidade está situada entre -5°C e 0°C . Na literatura, existem dados que demonstram a espécie *Vibrio cholerae* multiplicando-se a temperaturas de 5°C , bem como *Salmonella* spp. presentes em alimentos armazenados a 6°C . Foram descritos, casos de *Aeromonas* spp.. isolada de produtos cárneos congelados (Kirov et al., 1993). Entretanto, a cocção e o congelamento, quando realizados corretamente, podem controlar drasticamente a contaminação inicial do produto, sendo considerados fatores fundamentais no controle de pontos críticos. Recomenda-se para mexilhões, o congelamento rápido, com os animais individualizados em bandejas de aço inoxidável, em freezer que garanta temperatura de -18°C durante no mínimo 30 minutos.

É importante alertar aos consumidores com relação ao processo de descongelamento dos produtos em suas residências. Existem algumas práticas que podem alterar as características dos alimentos e invalidar todos os processamentos tecnológicos empregados para mantê-los apto ao consumo. Muitas pessoas realizam o descongelamento forçado do alimento, retirando-o da embalagem e colocando-o em água corrente fria ou quente. Esse procedimento causa dois problemas, em primeiro lugar proporciona a perda de nutrientes do alimento e, em segundo, favorece a contaminação ambiental.

Uma outra prática também realizada pelos consumidores é descongelar o produto, ainda na embalagem, colocando-o submerso em água quente ou fria. Tal procedimento cria um ambiente semelhante ao de uma estufa, favorecendo a multiplicação dos microrganismos.

Ao contrário do que se poderia pensar, o descongelamento lento em temperatura ambiente também favorece a multiplicação de patógenos, além da probabilidade de contaminação cruzada de outros alimentos. O ideal é descongelar o produto sob temperaturas baixas, retirando-o do congelador doméstico e colocando-o no compartimento do refrigerador (4°C). Essa informação pode constar na embalagem do produto como orientação ao consumidor.

A adoção das medidas tecnológicas, resumidas nos Anexos, podem contribuir para as vigilâncias epidemiológica, sanitária e ambiental, através da garantia

da qualidade de produção de mexilhões pré-cozidos, além de auxiliar positivamente na prevenção de gastroenterites provocadas por microrganismos emergentes veiculados por alimentos marinhos.

Capítulo 3

Famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae no Ecossistema Aquático:

Caracterização

Atualmente, a comunidade científica tem voltado suas atenções ao estudo de microrganismos considerados emergentes. As doenças infecciosas emergentes são aquelas que têm aumentado de prevalência (número de casos novos e antigos) nas últimas duas décadas. A emergência de novos patógenos geralmente reflete modificações no ambiente. Essas mudanças podem ocorrer sob os aspectos da demografia humana, comportamento social, tecnologia de alimentos e desenvolvimento econômico e comercial. Além disso, essas mudanças podem ocorrer numa escala microscópica (ex.: aquisição de genes codificadores de resistência antimicrobiana) ou macroscópica (ex.: comércio internacional). A adaptação microbiana pode ser responsável pela emergência de novas doenças devido a maior especificidade do patógeno a um hospedeiro animal ou do surgimento de cepas mais virulentas. A resistência antimicrobiana frente a determinados antibióticos é um tipo de adaptação microbiana que pode causar doenças veiculadas por alimentos ainda mais graves (Notermans & Hooenboom, 1992; Landgraf, 1997; Tauxe, 2002).

O conceito de doenças emergentes e reemergentes criado pelo Center of Disease Control (CDC) dos Estados Unidos da América, designa que as doenças emergentes são aquelas causadas pela introdução ou descoberta de novos microrganismos, ou ainda pelo aumento da incidência ou prevalência de doenças causadas por microrganismos conhecidos. Por outro lado, doenças reemergentes caracterizam-se pela ressurgência ou reincidência de doenças cujos patógenos são conhecidos, mas que, devido a modificações sócio-ambientais, ressurgem com significativa expressão epidemiológica. Alguns membros das famílias Vibrionaceae e

Aeromonadaceae são considerados patógenos emergentes e podem ser veiculados aos seres humanos, através da ingestão de água contaminada e/ou moluscos bivalves marinhos consumidos sem prévio aquecimento (Doyle, 1992; 1994).

Embora o consumo de mexilhões no Brasil, não seja um hábito freqüente da maioria da população a ponto de possuímos uma indústria de moluscos bem estruturada, existe amplo consumo de mexilhões em restaurantes nos principais centros urbanos do País. Portanto, é importante discutirmos sobre a qualidade higiênico-sanitária desses moluscos cultivados e/ou extraídos do *habitat* natural e posteriormente comercializados e consumidos *in natura*, inclusive em restaurantes especializados em culinária oriental.

O cultivo e/ou extração de moluscos representa, dessa maneira, uma prática de comércio realizada na maior parte das vezes por determinadas populações que habitam regiões próximas ao mar e que dele retiram seu meio de subsistência. A captura e o processamento dos moluscos bivalves marinhos são geralmente realizados por pescadores que não possuem conhecimento e consciência sobre os problemas sanitários. Muitas vezes, os métodos utilizados são rudimentares e os mexilhões são expostos às ações dos ventos, chuva e sol, sem a preocupação com a higiene e proporcionando risco de contaminação (Cattaneo, 1990).

O cenário nacional relativo ao cultivo de moluscos varia de acordo com a região. No Nordeste, por exemplo, é uma atividade basicamente feminina que permite às mulheres participarem ativamente da renda familiar. No Rio de Janeiro, o trabalho pesqueiro feminino constitui-se em pesca com linha de mão, salga e preparo de mantas de peixe seco, participação nos arrastos de praia e principalmente coleta de mariscos e crustáceos (mariscagem). No entanto, existe um preconceito com relação a essas atividades que são consideradas de importância secundária e os homens que se dedicam a elas são desqualificados profissionalmente. Com a criação de Estações Experimentais de Cultivo de Mexilhões, observa-se a tendência de valorização da atividade de maricultura, o que tem contribuído para profundas melhorias no setor refletindo na qualidade do produto final (Sá, 1999).

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de reconhecer no ambiente marinho, bactérias autóctones e outras potencialmente capazes de provocar

doenças no homem. O *habitat* natural dos microrganismos das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae é o ambiente aquático dulcícola e marinho. Convém ressaltar que a presença desses microrganismos no ecossistema aquático não possui correlação direta com a presença de indicadores de contaminação fecal (*Escherichia coli*). Dessa maneira, águas consideradas próprias para consumo humano e balneário segundo os parâmetros de coliformes fecais, não estão totalmente livres da possibilidade de conter as bactérias das referidas famílias (Oliver et al., 1983; Kueh & Chan, 1985; West, 1989).

O gênero *Vibrio* pertence à família Vibrionaceae e sua principal espécie é o *Vibrio cholerae* que possui importância histórica e contemporânea por ser agente etiológico da cólera. Essa doença diarreica foi de grande relevância no passado, quando na Inglaterra em 1817, John Snow, descobriu a associação de casos da doença com a rede de abastecimento de água permitindo traçar o perfil epidemiológico da enfermidade antes mesmo da descoberta do patógeno. Apesar dos avanços sanitários, epidemiológicos e técnico-científicos, a cólera ainda representa um grande flagelo para a saúde pública em diversos países. Na atualidade, a cólera é considerada uma doença endêmica nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e está altamente relacionada à falta de saneamento básico e precárias condições de vida e saúde das populações (Baumann et al., 1984).

Segundo Frazier & Westhoff (1993), as espécies de *Vibrio* são Gram negativas, não esporogênicas, em formato de curva ou vírgula, móveis e possuem flagelo polar quando crescem em meio líquido. A maioria das cepas produz oxidase, com exceção de *V. metschnikovii* e *V. gazogenes*, catalase e fermentam glicose sem produção de gás. As principais espécies de *Vibrio* reconhecidas em nosso meio, como patogênicas para o homem são: *Vibrio cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. hollisae*, *V. furnisii*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* e *V. fluvialis*.

Vibrio cholerae O1, descoberto por Robert Koch em 1884, por causar epidemias e pandemias de cólera desde 1817. As cepas podem ser divididas de acordo com as diferenças na composição da parede celular (antígeno somático O) que classifica o grupo em 139 sorogrupos diferentes. Todas as cepas apresentam um antígeno flagelar comum (H) e na década de 30 foi determinado que as cepas

pandêmicas eram aglutinadas por um único anti-soro, denominado O1. As cepas de *V. cholerae* O1 podem ser divididas em três sorogrupos: Inaba, Ogawa e Hikogima. A identificação desses sorogrupos possui importância para estudos epidemiológicos (Colwell, 1996).

Uma segunda subdivisão é baseada nas características de resistência a fagos e polimixina, capacidade de aglutinar hemácias de galinha e outros caracteres bioquímicos distinguindo dois biótipos de *V. cholerae* O1: Clássico e El Tor, os quais podem ou não produzir toxinas, assim as cepas podem ser toxigênicas ou não. As toxigênicas, responsáveis por causar a cólera, são capazes de produzir a toxina colérica (CT-cholerae toxin) ou uma toxina muito semelhante a ela. As cepas não-toxigênicas não produzem toxina colérica, mas podem causar diarreia ou infecção de feridas (Bravo et. al., 1998).

A atual pandemia de cólera, iniciada em 1961 no Sudeste Asiático, é produzida pelo grupo Ogawa. Por outro lado, foi identificado um foco endêmico associado à *V. cholerae* O1 sorotipo Inaba, diferente da cepa atual, na região da Costa do Golfo dos Estados Unidos. Em janeiro de 1991, a cólera surgiu em várias cidades costeiras do Peru alastrando-se por via hídrica para países como Equador, Chile, Colômbia e Brasil. Essa epidemia aparentemente está associada ao sorotipo Inaba biótipo El Tor. Em 1992, foi identificada na Índia, na região de Madras, uma enfermidade semelhante à cólera a qual foi disseminada para Calcutá, Bangladesh e diversas regiões da Índia. A cepa não foi classificada segundo os 138 sorotipos conhecidos e por essa razão foi reconhecida como sendo um novo sorogrupo denominado O139-Bengala (*ibid*, 1998).

O reservatório comprovado da cólera é o homem. No entanto, a presença desse microrganismo no *habitat* aquático e sua associação à quitina de copépodes, zooplanktons e peixes, pode favorecer a contaminação dos moluscos bivalves durante o processo de filtração da água. Considerando que a capacidade de fixação dos vibrios à carapaça quitinosa do zooplankton permite a sua permanência no ambiente aquático, foi realizado um estudo no ambiente marinho brasileiro. Os resultados deste estudo evidenciaram a presença de *V. cholerae* O1 através de métodos de imunofluorescência, permitindo concluir que esse microrganismo

comportava-se de forma autóctone nas águas brasileiras (Colwell & Kaper, 1977; Martins et al., 1993; Murphree & Tamplin, 1995; Rubin, 2000; Gonçalves, 2001; Nogueira et al., 2002).

A cólera é uma doença infecciosa intestinal aguda cujo período de incubação varia de 6 horas a 5 dias. Os sintomas podem ser leves (diarréia branda) ou severos nos quais a diarréia aquosa assume um aspecto semelhante à água de arroz e odor de peixe. O paciente apresenta grande perda de fluidos, cerca de um litro de líquidos por hora podendo evoluir para um quadro de desidratação grave. Se não houver tratamento rápido e adequado, um quadro de acidose e colapso circulatório pode se instaurar levando ao óbito. No entanto, os quadros leves e as infecções assintomáticas são muito mais freqüentes que as formas graves (Colwell, 1996).

Estima-se que a dose infectante para causar a doença seja de aproximadamente um bilhão de células de *V. cholerae*. Contudo, o consumo de antiácidos, medicamentos que reduzem a acidez gástrica, ou distúrbios que levem a diminuição da produção de ácido clorídrico pelo estômago reduzem o número de células necessárias para causar infecção (Hackney & Dicharry, 1988).

Variações climáticas e geográficas influenciam na temperatura da água e conseqüentemente na população de vibrios patogênicos os quais preferem temperaturas elevadas isto é, em torno de 10°C ou mais. No entanto, seu número decresce quando essa temperatura é superior à 30°C. *Vibrio cholerae* dentre os vibrios, tem sido o mais estudado sabendo-se que a faixa de temperatura da água mais favorável ao seu crescimento situa-se entre 10 e 32°C, na qual o microrganismo se mantém na superfície. Abaixo de 10°C, a bactéria tende a se localizar no sedimento a fim de aumentar seu tempo de viabilidade. A salinidade ideal situa-se entre 0,3 a 1,79‰, enquanto ambientes com salinidade inferior a 0,3‰ comprometem a viabilidade do vibrião colérico. O pH ótimo situa-se entre 7,0 e 9,0 e o *V. cholerae* não resiste à dessecação (West, 1989; Motes, 1994; Ital, 1995).

Devido ao fato dos vibrios patogênicos encontrarem-se naturalmente no ambiente marinho, mesmo em áreas livres de endemia, tornou-se significativo pesquisar a ecologia microbiana e associá-la à epidemiologia das infecções humanas. Em termos gerais, os principais fatores abióticos que influenciam a sobrevivência e a

quantidade desses microrganismos em seu *habitat* natural são a temperatura da água, concentração de material orgânico e salinidade (West, 1989; Kumate et al., 1998).

Vibrio mimicus é uma espécie associada a casos de diarreia provocados por consumo de pescados e frutos do mar crus ou mal cozidos, principalmente ostras cruas. Foi curiosamente isolado a partir de casos de gastroenterite, após consumo de ovos crus de tartaruga na Costa Rica entre 1991 e 1994. É estreitamente relacionado à espécie *V. cholerae* O1 comportando-se da mesma forma quanto ao requerimento de sal, ou seja, não é estritamente halofílico e diferenciando-se dessa espécie por não fermentar a sacarose. Esse microrganismo parece ter distribuição mundial e sua ecologia é semelhante às cepas de *V. cholerae* não O1. Em geral, as cepas de *V. mimicus* são Voges-Proskauer negativas e crescem em forma de colônias verdes no agar TCBS, enquanto que *V. cholerae* apresenta colônias amarelas nesse meio de cultura (Hackney & Dicharry, 1988).

Além do seu potencial de causar gastroenterite, *V. mimicus* pode também causar otite, embora esse tipo de infecção não seja comum. As amostras isoladas a partir de casos clínicos de diarreia são frequentemente negativas no que diz respeito aos testes de patogenicidade, mas em determinadas cepas foram encontradas enterotoxinas termolábeis e termoestáveis (West, 1989; Hackney & Dicharry, 1988).

Vibrio alginolyticus é uma espécie halofílica classificada inicialmente como biótipo 2 de *V. parahaemolyticus*. É uma bactéria comum no ambiente marinho e pode ser isolada a partir de moluscos bivalves inclusive de mexilhões. Contudo, não está associada a casos de gastroenterite sendo por isso, considerada uma espécie oportunista cujo isolamento é maior a partir de infecções extra - intestinais como nos casos de infecções superficiais, otites e conjuntivites em pacientes expostos ao ambiente marinho contaminado. Embora a infecção, na maioria das vezes, seja autolimitante, indivíduos imunodeprimidos são bastante suscetíveis a esse patógeno (Lopes, 1993; Chien et al., 2002; Jaksic et al., 2002.).

Vibrio carchariae, patógeno isolado inicialmente de tubarões, é muito similar ao *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* diferenciando-se destes pela ausência de hidrólise de gelatina a 22°C, motilidade negativa a 36°C e reação de ornitina descarboxilase negativa. É uma espécie presente em ambientes

aquáticos, mas somente há alguns anos foi isolada, a partir de uma infecção humana extra-intestinal (West, 1989, Lopes, 1993, Yii et al., 1997, Nicolas et al., 2002).

Algumas espécies, embora relatadas como patogênicas ao homem, são menos freqüentes, como *Vibrio cincinnatiensis*, descoberto em Cincinnati, a partir de uma amostra de sangue e fluido espinhal de um paciente. A espécie *Vibrio fluvialis* foi isolada em 1977, a partir de evidências de que o consumo de ostras *in natura* desencadeou um surto de gastroenterite. Foram relatados também, o isolamento do microrganismo oriundo de ferimentos de um paciente no Havaí, da água e sedimentos na Baía de Nova York, de mariscos na Louisiana, de um idoso acometido por diarreia, das fezes de uma criança de apenas 1 mês de idade e de um homem adulto imunodeprimido (Hodge et al., 1995; Varghese et al., 1996; Maugeri et al., 2000; Heidelberg et al., 2002; Cavallo & Stabili, 2002)

Estudos referentes ao *Vibrio furnisii* revelaram que esse pode estar associado a casos de gastroenterite aguda, após consumo de alimentos marinhos crus ou insuficientemente cozidos (Magalhães et. al, 1993; Chakraborty et al., 1997).

Infecções por *Vibrio damsela* (*Photobacterium damsela*) são raras, mas segundo relatos, produzem no homem infecções de feridas, especialmente após exposição à água salgada nas regiões tropicais e semitropicais (West, 1989; Tang & Wong, 1999; Scoglio et al., 2001).

Vibrio metschnikovii está amplamente distribuído no ambiente aquático marinho. Possui uma característica peculiar que o diferencia dos outros vibrios patogênicos que é o fato de ser oxidase negativo. Algumas cepas foram isoladas de ostras, caranguejos e camarões, no entanto, infecções humanas são raras. Foram descritos 2 casos de infecção por esta espécie, sendo um caso fatal (Hansen et al., 1993; Scoglio et al., 2001).

Vibrio hollisae é uma espécie halofílica isolada de peixes saudáveis e pode estar associada a casos de diarreia. Foi isolada de fezes de pacientes com gastroenterite, após consumo de ostras cruas. Alguns estudos têm sugerido a presença de uma hemolisina semelhante a TDH do *V. parahaemolyticus* que seria responsável

pela sua patogenicidade, paralelamente a uma enterotoxina sensível ao calor (Carnahan *et al.*, 1994; Lesmana *et al.*, 2002).

Vibrio vulnificus, descrito por Hollis *et al.* (1976), é uma espécie potencialmente perigosa ao homem após a ingestão de alimentos marinhos. Existe naturalmente em regiões do oceano Atlântico, oceano Pacífico e golfo do México. Recentemente, tem sido incluído como um patógeno novo ou emergente de interesse em alimentos (Garcia-Moreno & Landgraf, 1997; Landgraf, 1997; Helay, 2001; Johnson & Arnett, 2001; Nascimento *et al.*, 2001).

O isolamento de *V. vulnificus* a partir de amostras ambientais tem demonstrado dificuldades, mas há relatos do isolamento da bactéria a partir de plancton e zooplâncton principalmente de regiões tropicais e temperadas em todo o mundo (Ghinsberg, 1999). Especial destaque deve ser dado à região do Golfo do México, nos Estados Unidos (DePaola, 1994), no Mar Mediterrâneo, Espanha (Arias *et al.*, 1999) e Itália (Barbieri, 1999).

A sobrevivência de *V. vulnificus* em alimentos tem sido amplamente estudada por Cook (1994,1997) que encontrou cepas capazes de se multiplicar em ostras estocadas à temperaturas de 13°C. Oliver (1981), reportou a sobrevivência deste patógeno em ostras cruas mantidas no gelo e também a temperaturas de – 20°C por 12 semanas sugerindo que essas cepas ficam sob estado viável mas não cultivável como demonstrado por Bryan *et al.*, (1999). Portanto, apenas a refrigeração ou congelamento não são suficientes para eliminar estes microrganismos de determinados alimentos marinhos, sendo necessária a aplicação de práticas tecnológicas adequadas para evitar a contaminação dos mesmos.

Nos Estados Unidos, a maior parte dos casos humanos associados a *Vibrio vulnificus* está diretamente relacionada ao consumo de moluscos bivalves *in natura* ou parcialmente cozidos (Oliver & Kaper, 1997, Cook, 1997). As gastroenterites provocadas por este microrganismo situam-se numa média de 50 casos por ano (Linkous & Oliver, 1999) e os casos não notificados podem chegar a 41000 sugerindo que a maioria das infecções são autolimitadas. Ressalta-se que foram registrados casos da doença em diversos países como a Dinamarca (Dalsgaard, 1996) e França (Geneste *et al.*, 2000).

A maior parte dos casos de infecção por *V. vulnificus* caracteriza-se por uma rápida e progressiva evolução. Os principais sintomas associados à septicemia são febre, calafrios e vômitos que se iniciam cerca de 38 horas após a ingestão de ostras cruas. Assinala-se que os sintomas gastrentéricos não são frequentes. A infecção de lesões cutâneas pode culminar com necrose, septicemia e elevadas taxas de letalidade (40-60%). Especula-se que o germe penetre na via sistêmica, através da veia porta ou do sistema linfático intestinal (Oliver & Kaper, 1997; Dowdy et al., 1999, Fouz & Amaro, 2003).

O mecanismo de virulência desse patógeno tem atraído a atenção de pesquisadores devido à gravidade das infecções. Acredita-se que componentes citolíticos e citotóxicos produzam toxinas que aliadas a cápsula polissacarídica e a collagenase, elastase, protease e hemolisina, contribuam para a invasão tecidual e celular, exibindo atividades proteolíticas e citolíticas correlacionadas a diversos estágios patológicos da infecção no homem, bem como a utilização de ferro *in vivo* e a presença de cápsula. Condições clínicas predisponentes à bacteremia causada por *V. vulnificus* incluem também os processos patológicos que causam o aumento da deposição de ferro: cirrose crônica, hepatite, talassemia major, hemocromatose e alcoolismo (Oliver et al., 1983, Linkous & Oliver, 1999, Strom & Paranjpye, 2000).

A dose de infecção em seres humanos permanece ainda em estudos. Pesquisas realizadas por Jackson et al (1997) a partir de mariscos resultaram na conclusão de que 10^3 células do microrganismo seriam suficientes para causar infecção inclusive fatais (Mascola et al., 1986).

Vibrio vulnificus é fenotipicamente similar ao *V. parahaemolyticus*, apresentando características bioquímicas semelhantes como lisina descarboxilase positiva, arginina deidrolase negativa, e diferindo-se por requerer menor concentração de sal (0,5%). Pode ser diferenciado de outros membros do gênero através da fermentação da celobiose, sendo a maioria das cepas de *Vibrio vulnificus* ONPG (β - galactosidase) positivas e fermentadoras de lactose. O antibiograma pode ser um método auxiliar de diferenciação das outras espécies uma vez que *V. vulnificus* é resistente a colistina e suscetível a ampicilina (Oliver et al., 1982, Tamplin, 2001).

Investigações clínicas e epidemiológicas comprovam que a espécie *Vibrio vulnificus* é bastante patogênica, pois pode causar septicemia com altos índices de letalidade (50%), após ingestão de ostras *in natura* dentro de um período de 24 horas após a manifestação dos sintomas. A frequência das infecções por *V. vulnificus* é maior nos meses de verão e a variação sazonal favorece seu crescimento em ambientes aquáticos onde a temperatura seja alta e a salinidade baixa. Infecções de ferimentos podem ocorrer quando expostos a ambientes contaminados. Por outro lado, infecções sistêmicas estão relacionadas ao consumo de moluscos bivalves não submetidos ao cozimento (Cook, 1994; Dowdy et al., 1999; Heelay et al., 2001).

Vibrio parahaemolyticus foi isolado pela primeira vez em 1951, por Fujino et al., a partir de um surto de gastroenterite ocasionado pela ingestão de “shirasu” (sardinhas novas, semidessecadas, parcialmente aquecidas). Esse surto ocorreu no Japão atingindo 272 pessoas e ocasionando 20 óbitos. Desde então, tem sido pesquisado e descobriu-se que é um habitante natural do ambiente marinho, especialmente em climas temperados, no entanto, sua distribuição é mundial. Está intimamente associado a surtos de gastroenterite provocados após o consumo de alimentos contaminados destacando os de origem marinha (Sakazaki et al., 1963).

Em 1953, o microrganismo foi inicialmente classificado como pertencente ao gênero *Pasteurella* (*Pasteurella parahaemolytica*). Posteriormente, um estudo feito por Takikawa, em 1958, evidenciou a característica halofílica do germe e suas propriedades bioquímicas, foi sugerido então, a denominação *Pseudomonas enteritis*. Mais tarde estudos realizados por Miyamoto et al. (1961), baseados na diferença das reações sorológicas entre o microrganismo estudado e as comumente encontradas para o gênero *Pseudomonas*, propuseram a existência de um novo gênero denominado *Oceanomonas*. Em 1965, Sakazaki et al., sugeriram a denominação de *Vibrio parahaemolyticus* após examinarem 1977 culturas, descartando a possibilidade das denominações anteriores porque o microrganismo isolado possuía tolerância de crescimento em meios com amplas concentrações de cloreto de sódio, fermentava glicose sem a produção de gás e suas características bioquímicas eram diferentes dos gêneros propostos (Barros, 1977).

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria Gram-negativa, morfológicamente apresenta-se em forma de bastonetes curtos (retos ou curvos) e possui mobilidade devido à presença de um flagelo polar observado quando em meio líquido. É anaeróbio facultativo fermentador de carboidratos sem formação de gás, cresce bem em pH alcalino (7,5 - 8,5) e em temperaturas de 35 a 37°C. É estritamente halofílico desenvolvendo-se em meios contendo 2 - 3% de sal (NaCl). O meio de isolamento mais utilizado é o agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose) no qual o microrganismo cresce em forma de colônias verdes indicando sua característica sacarose negativa (Blackstom et al., 2003).

As infecções humanas causadas por *V. parahaemolyticus* tem sido reportadas comumente na Ásia e nos Estados Unidos, sendo considerada rara na Europa. As Doenças de Transmissão Alimentar são a principal forma de infecção provocada por este microrganismo presente em alimentos crus ou imprópriamente cozidos ou ainda em alimentos cozidos ou em casos de recontaminação dos alimentos. Infecções extraintestinais podem ocorrer mas numa frequência bem menor quando comparada com as gastroenterites (Daniels et al., 2000, Zaneti et al., 2001, Alam et al., 2002).

Na Ásia, *V. parahaemolyticus* tem sido o causador mais comum das doenças veiculadas por alimentos, alcançando cerca de 70% dos casos registrados. No Japão foram registrados 496 surtos durante o período de 1996-1998. Na Tailândia ocorreram 197 surtos causados por este microrganismo no período de 1986-1995. Nos Estados Unidos foram registrados casos na região da Costa do Golfo, na Baía de Chesapeake e em diversas outras regiões costeiras. Foram registrados também casos esporádicos da doença na França (Pan et al., 1997, CDC, 1999, Lemoine et al., 1999).

As cepas patogênicas distinguem-se das não-patogênicas pela produção de uma hemolisina citotóxica, cardiotóxica e termoestável (Thermostable Direct Hemolysin). Além da TDH, existem também a TRH (TDH-related hemolysin), fosfolipase A e lisofosfolipase. Destas, a TDH e a TRH são as mais correlacionadas à patogenicidade e são codificadas pelos genes *tdh* e *thr*, respectivamente (Nishibushi & Kaper, 1995).

A hemolisina TDH causa uma beta-hemólise dos eritrócitos humanos, em meio de cultura (Ágar Wagatsuma) numa reação denominada Kanagawa (Kanagawa Phenomenon – KP). A associação entre KP + de uma cepa e a habilidade em causar gastroenterite está bem estabelecida. Cerca de 95% das amostras provenientes de casos clínicos são positivas para essa reação. Especula-se que as cepas de *V. parahaemolyticus* se tornem positivas no intestino humano durante a infecção, predominando nas amostras fecais após o desenvolvimento dos sintomas da doença. Algumas evidências apontam para a possibilidade de que eventuais cepas Kanagawa positivas, isoladas do ambiente aquático, tenham como reservatório os sedimentos e mariscos (Sakazaki & Balows, 1981, Nishibushi & Kaper, 1995).

A reação de Kanagawa (Kanagawa Phenomenon - KP) é freqüentemente negativa quando as amostras isoladas são de origem ambiental. Contudo, isolados clínicos KP negativos e produtores de TRH demonstraram aspectos clínicos similares à gastroenterite provocada por cepas produtoras de TDH. Isso significa que cepas Kanagawa negativas podem ser capazes de provocar infecções significativas (Abbott et al., 1989, Shirai et al., 1990, Honda et al., 1992).

Hackney et al. (1980), sugerem que além da característica Kanagawa positiva ou negativa, a patogenicidade das cepas de *V. parahaemolyticus* estariam relacionadas à capacidade de aderência às células intestinais humanas. Entretanto, verificaram que cepas Kanagawa positivas apresentam uma habilidade maior de aderência quando comparadas às cepas negativas.

A gastroenterite causada por esse patógeno caracteriza-se por desencadear um quadro de moderada gravidade incluindo diarreia branda, cólicas abdominais, náuseas, vômitos e febre. O período de incubação da doença situa-se entre 4 a 96 horas e em média tem um curso de aproximadamente 2 a 7 dias. Alguns estudos revelam que a dose infectante situa-se na faixa de 2×10^5 a 3×10^7 UFC (Unidade Formadora de Colônia), Kanagawa positivas, embora estudos com voluntários que ingeriram alimentos contaminados com cepas Kanagawa negativas

na proporção $1,6 \times 10^{10}$ tenham apresentado sintomas da doença (Oliver & Kaper, 1997).

Em geral, é uma doença autolimitada que evolui sem a necessidade de hospitalização, entretanto, casos fatais também podem ocorrer. Há risco bastante significativo de adquirir a doença após a ingestão de alimentos marinhos preparados ao estilo oriental sem cocção, ou em condições de manipulação pouco higiênicas que facilitem a contaminação dos alimentos constituindo fatores que devem ser considerados, principalmente para a tomada de medidas preventivas. Existem relatos de infecções extraintestinais (ouvidos e olhos) após contato com águas naturais salgadas e casos de septicemia seguida de óbito em pacientes com cirrose, no entanto, a frequência é relativamente baixa (West, 1989).

Durante um surto de cólera na Malásia, no período de março a agosto de 1974, Jegathesan & Paramasivam (1976) descreveram a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em 47 amostras de pacientes com gastroenterite. Com esses resultados, os autores concluíram que em muitos casos a sintomatologia da gastroenterite causada pelo *Vibrio parahaemolyticus* pode assemelhar-se à cólera e que o diagnóstico laboratorial é indicado para a definição correta da etiologia da doença.

Manifestações clínicas causadas por este germe também foram bastante relatadas ao longo dos anos. Em 1973, Peffers et al. descreveram casos de gastroenterite causados por *Vibrio parahaemolyticus* em cinco passageiros de um avião que fez o percurso de Bangkok para Londres. As amostras isoladas demonstraram-se Kanagawa positivas e pertencentes ao sorotipo O2K3. A refeição servida aos passageiros foi analisada confirmando a presença do germe nas amostras de caranguejo não submetidas à cocção.

Higashihara et al. (1991) avaliaram um surto de gastroenterite que afetou 24 pessoas durante as comemorações de Ano Novo em Honolulu, após o consumo de ostras cruas. Algumas espécies de *Vibrio* foram isoladas dos alimentos crus servidos às pessoas que apresentaram sintomas de infecção gastrintérica, dentre estas *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. fluvialis*.

Atualmente, *Vibrio parahaemolyticus* tem sido reconhecido como um importante patógeno capaz de causar manifestações gastrentéricas após o consumo de pescados e moluscos bivalves marinhos sem cocção ou mal cozidos. Sua importância refere-se ao fato de estar amplamente distribuído na natureza, sendo isolado de águas costeiras do mundo inteiro ao longo dos anos (West, 1989). O microrganismo foi isolado no ecossistema aquático da França (Urdaci et al., 1988), Espanha (Macián et al., 2000), Itália (Crocì et al., 2001) e também do Brasil (Garcia-Moreno & Landgraf, 1997, Pereira, 1998, Lira, 2000).

No Brasil, no que se refere a alimentos marinhos, *V. parahaemolyticus* foi isolado de amostras de mexilhões (Archer & Moretto, 1994; Lira, 2000) e lulas (Lima et al., 1994). Tem sido isolado também de ostras (DePaola et al., 1990; Gooch et al., 2002), o que confirma o risco potencial para a saúde pública associado ao consumo de mariscos crus ou mal cozidos.

Com base em evidências genéticas e moleculares, Colwell et al., (1986) propuseram a criação de uma nova família denominada Aeromonadaceae a qual englobaria o gênero *Aeromonas* proposto em 1936 (Kluyvera & VanNiel). Algumas espécies desse gênero possuem importância para a clínica humana e aquicultura como é o caso das seguintes espécies: *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* biótipo *sobria*, *A. jandaei*, *A. veronii* biótipo *veronii*, *A. schubertii* e *A. trota*.

Aeromonas spp. são bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores da glicose. São geralmente móveis por flagelo polar monotríqueo, a exceção de *A. salmonicida* e *A. media*. Possuem a enzima citocromo-oxidase e são resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4 diamino 6,7 diisopropilpteridina). Crescem numa ampla faixa de temperatura (0°C a 45°C), o que permite que sejam isoladas de diversas fontes de alimentos inclusive aqueles estocados sob refrigeração, e pH (5,5 a 9,0). São reconhecidos diversos fatores de virulência, destacando-se as aerolisinas, hemolisinas, proteases, lipases e Dnases, os quais tem importante papel no desenvolvimento da doença tanto em seres humanos quanto em animais. Em geral, são sensíveis à maioria dos desinfetantes inclusive o cloro, entretanto cabe ressaltar que em condições adversas a bactéria pode ficar sob sua forma “viável mas não cultivável” (Granum et al., 1998).

As diversas espécies de *Aeromonas* apresentam bom crescimento em Agar sangue de carneiro acrescido de 5% de ampicilina ou Agar GSP (Agar Seletivo para *Pseudomonas-Aeromonas*) no qual crescem sob a forma de colônias amarelas circundadas por um halo de hidrólise do amido. As provas bioquímicas são baseadas na prova de oxidase e resistência ao agente vibriostático O/129. Usualmente esses microrganismos são sensíveis aos seguintes agentes antimicrobianos: cloranfenicol, colistina, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim. De um modo geral são resistentes a ampicilina, carbenicilina, cefazolim, cefalotim e ticarcilina. Essa resistência aos antibióticos tem interesse tanto para o controle de doenças em animais quanto em seres humanos, uma vez que o uso indiscriminado destas drogas tem incrementado a resistência dos microrganismos (ibid., 1998).

As *Aeromonas* são microrganismos predominantemente hídricos e a frequência de isolamento, a exemplo dos víbrios, é mais elevada nos meses de verão, em especial nas zonas temperadas e tropicais. Em geral, não são consideradas como habitante normal do trato gastrointestinal humano. Contudo, nas regiões de clima temperado, estima-se que o número de portadores assintomáticos aproxime-se de 3%, enquanto em regiões tropicais esse percentual pode atingir 30% ou mais (Kelly et al., 1993)

Durante muito tempo, as diversas espécies de *Aeromonas* foram consideradas oportunistas, porém estudos realizados em microbiologia de alimentos permitiram descobrir a relação desses microrganismos com infecções humanas após consumo de alimentos de origem aquática, sob a forma *in natura* ou insuficientemente cozidos (Meng & Doyle, 1998, Martins et al., 2002; Vivekanandhan et al., 2002).

Na literatura, as espécies mais frequentemente citadas em associação à patogenicidade humana são *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* biótipo *sobria*. Algumas são consideradas patógenos em circunstâncias raras como: *A. jandaei* e *A. schubertii*. Existem ainda aquelas ocasionalmente isoladas de material clínico cujo significado permanece desconhecido tais como: *A. sobria*, *A. media*, *A. trota* e *A. salmonicida*, estas duas últimas adaptadas a pescado e responsáveis por surtos de epizootias (Carnahan et al., 1991, Wang et al., 2000; Davies et al., 2001).

Aeromonas spp. são isoladas mundialmente de ambientes aquáticos dulcícolas ou salinos, em áreas de poluição ou não. Esse ambiente constitui o reservatório do microrganismo e representa uma importante fonte de infecção para o homem seja sob a forma direta (balneabilidade) ou indireta através da contaminação de alimentos contaminados. Apesar do predomínio em alimentos de origem aquática, ocorre também uma alta incidência de diversas espécies de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem não aquática como vegetais, carne vermelha e de aves representando um alerta para a saúde pública no que se refere a vigilância sanitária. As populações mais atingidas por essas infecções são de crianças, idosos e indivíduos debilitados ou portadores de doenças crônico-degenerativas. Além disso, *Aeromonas* spp. pode causar infecção em animais trazendo sérios prejuízos econômicos para a aquicultura (furunculose em salmonídeos, como no caso de *A. salmonicida*) e ranicultura (doença da pata vermelha) e até mesmo em animais silvestres criados em cativeiro ou não (Neves et al., 1992).

A infecção humana causada por *Aeromonas* spp. caracteriza-se por diarreia aguda aquosa autolimitada, de curta duração, podendo ser acompanhada de febre, vômitos e dor epigástrica assemelhando-se à síndrome causada por *V. cholerae* O1. Manifestações extraintestinais também já foram relatadas como infecções cutâneas, hepatobiliares, urinárias, oculares, endocardites, osteomielites, bacteremias e septicemias. Os acometimentos mais graves podem ocorrer em maior frequência nos indivíduos com comprometimento do sistema imunológico ou distúrbios hepatobiliares. Apesar disso, o papel dos fatores de virulência descritos não está inteiramente elucidado. Sabe-se que a temperatura de crescimento do microrganismo influencia a expressão de fatores associados à virulência aumentando sua patogenicidade, em particular quando isoladas a partir de alimentos estocados sob refrigeração. O maior obstáculo dos estudos sobre a patogenicidade de *Aeromonas* spp. é a inexistência de um modelo animal que reproduza a infecção observada em seres humanos (Kirov et al., 1993; Ménard et al., 2002).

No Brasil, existem diversos relatos de isolamento de diferentes espécies de *Aeromonas* spp. de amostras clínicas de casos de diarreia infantil, infecção hospitalar, ou gastroenterites causadas por ingestão de alimentos como ostras, mexilhões, pescado e vegetais. Em nosso meio, foram isoladas no ambiente aquático

(Neves et al., 1992), em amostras de solo de jardim e recreação (Rodrigues et al., 1994), pescado (Rall et al., 1998; Alves, 2000) e vegetais (Pedroso et al., 1997).

Aeromonas hydrophila é uma espécie que cresce a 37°C e possui mobilidade sendo devido a essas características, classificada no grupo das mesófilas juntamente com *A. caviae* e *A. sobria*. Por outro lado, existe o grupo das psicrófilas que inclui uma única espécie denominada *A. salmonicida*. Essa espécie não cresce bem a 37°C, é imóvel, e sua importância está relacionada a patogenicidade em peixes podendo causar danos zootécnicos e econômicos (Wang & Silva, 1999; Venkat et al., 2000, Martins et al., 2002; Radu, 2003).

Aeromonas sobria tem sido isolada de casos de diarreia aquosa apresentando uma toxina similar à cólera (toxina Asao). Em geral, cerca de 20% dos pacientes estudados desenvolveram quadro de infecção intestinal com sintomas de disenteria semelhante às provocadas por espécies de *Shigella* e cepas de *Campylobacter jejuni* invasoras (Araújo, 2001).

Aeromonas schubertii possui importância clínica relacionada ao seu isolamento a partir de infecção de feridas subsequentes à exposição à água, ao solo ou a alimentos contaminados, com incidência máxima nas estações quentes. Por sua vez, *A. veronii* foi descrita como produtora de bacteremia, infecções de feridas e diarreia. *A. jandaei* foi isolada como agente de infecção em quatro pacientes. *A. trota* é um patógeno frequente de pescado (truta), mas foi isolado também de amostras fecais humanas (Hickmann et al., 1988; Isonhood & Drake, 2002; Petersen & Dalsgaard, 2003).

Plesiomonas shigelloides é uma bactéria Gram-negativa isolada de ambientes aquáticos, peixes, moluscos, animais de sangue frio (sapos, rãs, tartarugas e lagartos) e domésticos (cães e gatos). A maioria das cepas patogênicas parece ser de origem aquática e a infecção humana ocorre através do consumo de água não tratada e contaminada. O homem também pode ser infectado após ingestão de alimentos contaminados e não lavados. Existem relatos de diarreia associada ao microrganismo em epidemias e casos isolados descritos após ingestão de mariscos crus. A incidência de gastroenterites provocadas pelo microrganismo é maior na época do verão (Rolston & Hopfer, 1980; Sanyal et al., 1980).

Os sintomas da gastroenterite causada por *Plesiomonas shigelloides* caracterizam-se por diarreia aquosa leve, sem presença de sangue e muco. Pode, porém, apresentar-se como uma colite grave ou síndrome semelhante à cólera, em particular em pacientes imunodeprimidos ou portadores de tumor maligno localizado na região gastrointestinal. Os indivíduos mais suscetíveis são crianças e idosos e as apresentações extra-intestinais septicêmicas podem ocorrer em pessoas imunodeprimidas ou portadoras de doenças crônico-degenerativas, podendo levar ao óbito. A patogenicidade da espécie *Plesiomonas shigelloides* está provavelmente relacionada à produção de uma enterotoxina enteropatogênica (Holmberg & Farmer, 1984; Reihardt & George, 1985; Brenden et al., 1988).

Embora esse capítulo seja dedicado às famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae, uma breve exposição referente ao gênero *Salmonella* spp., microrganismo clássico (*Enterobacteriaceae* tribo *Salmonelleae*) será oportunamente aqui delineada pelo fato de também poder estar presente nos ambientes aquáticos e frutos do mar, quando contaminados por esgotos domésticos.

As infecções humanas produzidas por salmonelas ocorrem através da ingestão de alimentos, água ou leite contaminados por fezes humanas ou de animais. As características de infecção por *Salmonella* incluem a gastroenterite como a forma de manifestação mais freqüente, variando de uma diarreia leve a fulminante (rara), acompanhada de febre, náuseas e vômitos. Cepas invasivas podem causar bacteremia e septicemia sem sintomas gastrentéricos (Vieira et al., 2001).

Nos casos clássicos de infecção invasiva por *Salmonella* Typhi e Paratyphi A, B e C, a evolução é bimodal, caracterizado por um período precoce (1 a 2 semanas de duração) de febre e constipação, durante o qual os cultivos de sangue são positivos e os de fezes negativos. A segunda fase caracteriza-se por uma diarreia durante a qual os cultivos sanguíneos são negativos e os de fezes positivos. Salienta-se que há possibilidade de evolução para estado de portador assintomático após a cura clínica sobretudo de *S. Typhi* no qual indivíduos infectados previamente podem permanecer excretando o microrganismo nas fezes até 1 ano após a remissão dos sintomas.

As salmonelas chamadas intestinais que podem causar diarreia de evolução mais arrastada podem também permanecer presentes nas fezes por dias ou meses. Portanto, condições humanas de portadores assintomáticos de *Salmonella* spp. tornam o microrganismo de extrema importância para investigações relacionadas aos manipuladores de alimentos, em especial quando os alimentos são crus. Portanto, a análise de *Salmonella* spp. em alimentos é considerado um importante parâmetro de avaliação das condições higiênico-sanitárias dos produtos de origem animal. Para que esses produtos sejam considerados aptos para consumo humano esse microrganismo deve estar ausente em 25 gramas de amostra de alimento analisada (Peresi et al., 1998; Santos et al., 2003).

Capítulo 4

Estudo *in loco*: Análise Microbiológica dos Mexilhões *in natura* e pré-cozidos

Este estudo teve por objetivo realizar a análise microbiológica dos mexilhões *in natura* e pré-cozidos, produzidos e comercializados pela Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões, determinando a ocorrência e prevalência de bactérias patogênicas (*Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*). Paralelamente, foi observada a sazonalidade desses microrganismos através da sua frequência de isolamento, e realizado teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Esse monitoramento dos mexilhões chamou atenção para a relevância da Vigilância Sanitária e Epidemiológica na prevenção das gastroenterites causadas por microrganismos emergentes veiculados pelo consumo de mexilhões *in natura* e pré-cozidos, comercializados pela Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões, Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro.

4.1- Local de Estudo

Como já considerado, a criação da Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões (EECM), situada em Jurujuba, Niterói, pela Associação Livre de Maricultores do Rio de Janeiro (ALMARJ), teve como principal objetivo melhorar o processo de extração de mexilhões e criar condições para o cultivo racional dentro do plano de desenvolvimento autosustentável.

Jurujuba é um bairro tranquilo com ares de interior, situado próximo à Fortaleza de Santa Cruz, ponto turístico da cidade de Niterói. A maioria dos moradores nasceram e cresceram na localidade e muitos vivem da pesca direta ou indiretamente.

Os homens saem para o mar em traineiras ou pequenas embarcações, enquanto as mulheres cuidam dos afazeres domésticos e ajudam na renda familiar trabalhando na indústria de conservas situada no bairro ou realizando tarefas relacionadas à pesca consideradas femininas como a salga, desconchamento de camarão e moluscos.

Existem diversos restaurantes, inclusive muito famosos na localidade, abastecidos com o pescado e mexilhões trazidos do mar pelos pescadores da região sem a necessidade de atravessadores. No entanto, a produção pesqueira é maior do que a demanda local e os produtos da pesca são comercializados em diversos pontos de venda, principalmente no Mercado dos Peixes localizado no bairro Ponta da Areia.

4.2- Tipo de Amostras

Nesta pesquisa analisamos microbiologicamente as amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos, a fim de realizar um estudo comparativo e ao mesmo tempo capaz de fornecer dados sobre a eficiência do processamento tecnológico de pré-cozimento a 100° C na redução de patógenos pertencentes às famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae.

4.3- Material e Métodos (FDA, 1995)

4.3.1- Amostragem:

Os mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) foram capturados diretamente dos bancos naturais pelos pescadores da EECM/ALMARJ e transportados nos barcos de pesca em monoblocos de polietileno até a Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões de Jurujuba (Niterói-Rio de Janeiro). Segundo informações dos pescadores, os locais de coleta corresponderam às ilhas e praias da região e adjacências constituindo 19 pontos diferentes, a saber: Ilha Redonda, Ilha dos Pais, Ilha dos Veados, Ilha Palmeiras, Ilha Cagarras, Ilha Comprida, Ilha dos Cargos, Ilha da Feiticeira, Ilha das Mães, Ilha do Meio, Costão de Niterói, Aeroporto Santos Dumont, Ilha do Governador, Fortaleza de Santa Cruz, Praia da Boa Viagem, Praia de Icaraí, Praia de Botafogo, Praia do Flamengo e Praia da Urca.

Os barcos de pesca ancoravam diretamente na área destinada à recepção dos mexilhões, sem nenhum tipo de proteção contra as intempéries e raios solares. Os mexilhões dispostos em monoblocos de polietileno, sem adição de gelo e sem a identificação do local de coleta foram lavados com jatos de água corrente. Para agilizar o processo de lavagem, foi construído um tanque de aço inoxidável, abastecido com água proveniente de um poço artesiano, sem sistema de água corrente.

Os mexilhões *in natura* lavados através de um ou outro método, foram pré-cozidos em autoclaves com peneira, à temperatura de 100°C, por no máximo 20 minutos. Esse processo é realizado com a finalidade de auxiliar na abertura das valvas não representando porém, o cozimento da carne do mexilhão. Após pré-cozidos, os mexilhões foram lavados uma segunda vez, através do sistema de água corrente, para auxiliar no processo de resfriamento, aguardando cerca de 20 a 30 minutos em temperatura ambiente, até que estivessem escorridos.

Depois de resfriados parcialmente, os mexilhões seguiram para área de desconchamento, ou seja, retirada das valvas. Esse processo foi realizado, em bancadas revestidas de aço inoxidável sem a utilização de luvas ou de água corrente. Depois de separadas, as valvas foram depositadas em monoblocos de polietileno e descartadas em caçambas da Companhia de Limpeza de Niterói (CLIN). A EECM, no período do estudo, realizava contato com uma fábrica de botões em São Paulo a fim de promover o reaproveitamento condicional das valvas dos mexilhões.

As partes comestíveis dos mexilhões foram colocadas em monoblocos de polietileno e lavadas em água corrente para retirar eventuais sujidades e resíduos das valvas. Após devidamente escorridos, os mexilhões foram pesados em balança comercial, embalados (500g e 1000g), selados e carimbados com a data de fabricação e prazo de validade. Finalmente, o produto foi armazenado em câmara fria (- 18° a - 20°C), durante no mínimo 30 minutos antes da distribuição aos centros comerciais.

Nesta investigação, as coletas foram realizadas quinzenalmente no período compreendido entre 26 de janeiro a 13 de dezembro de 2000, a fim de fornecer dados sazonais sobre o isolamento dos microrganismos investigados. Foram analisadas um total de 86 amostras de mexilhões, compostas por 43 amostras *in natura* e 43 pré-cozidos, coletados e beneficiados pela EECM. Segundo informações dos pescadores cada coleta correspondeu, em média, a dois pontos de amostragem diferentes.

Na área de recepção, os mexilhões *in natura* acondicionados em monoblocos de polietileno foram coletados, recolhendo-se cerca de 15 a 20 unidades amostrais que estivessem com as valvas fechadas caracterizando que estavam vivos. Os mexilhões *in natura* foram colocados em sacos de polietileno, devidamente

identificados de acordo com o local de origem e mantidos em refrigeração (4°C). Aguardou-se o período necessário para a realização do processamento tecnológico dos mexilhões para efetuar a coleta dos mexilhões pré-cozidos. Em média, esse tempo durou aproximadamente 30 a 40 minutos. Posteriormente, foram pesadas cerca de 50 gramas de mexilhões pré-cozidos e embaladas em saco de polietileno, identificadas e transportadas juntamente com as amostras *in natura* em caixa de isopor contendo gelo reciclável. O transporte foi realizado em prazo não superior a 2 horas e as amostras encaminhadas ao Laboratório de Enterobactérias, Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

As amostras pré-cozidas foram colocadas em temperatura de refrigeração (4°C), enquanto as amostras *in natura* eram trabalhadas. Os mexilhões, com as valvas fechadas, foram lavados e escovados vigorosamente em água corrente para retirada das sujidades e então secos com papel toalha. Em seguida, foram abertos com auxílio de faca e bisturi de lâmina fixa, ambos esterilizados, retirando-se a parte corpórea e o líquido intervalvar, recolhendo-os em placa de Petri.

As amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos constituíram um par amostral isto é, a amostra *in natura* correspondia à pré-cozida com relação à procedência (lote). As amostras foram pesadas separadamente retirando-se cerca de 25 gramas de amostra. A cada amostra pesada foram adicionadas 225 mL de solução salina de Butterfield (pH:7,2) representando uma diluição 10^{-1} , homogeneizada em Waring-Blender.

4.4- Análises Microbiológicas (FDA, 1995).

4.4.1- Isolamento e Identificação

A partir da diluição 10^{-1} foram realizadas novas diluições para isolamento e identificação de *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* e *Salmonella* sp. Para tal, foi retirada uma alíquota de 1 mL da amostra 10^{-1} e diluída em 10 mL de APA (Água Peptonada Alcalina) adicionada de 1 e 3% de NaCl, solução salina de Butterfield e caldo de enriquecimento de Kauffmann-White, os quais permaneceram por 24 horas em estufa bacteriológica (37°C).

De cada tubo apresentando crescimento procedeu-se a semeadura nos seguintes meios seletivos indicadores: mCPC (Ágar Colistin Polimixina Celobiose modificado), GSP (Ágar seletivo para *Pseudomonas-Aeromonas-Oxoid*), TCBS (Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose-Difco), IBB (Ágar Inositol Bile Verde Brilhante), EMB (Ágar Eosina Azul de Metileno-Oxoid) e HE (Ágar Entérico Hektoen-Oxoid). Os meios de cultura devidamente semeados foram incubados a 37°C por 24 horas (Desmond & Janda, 1986; Massad & Oliver, 1987).

Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a confirmação preliminar das colônias (5 a 10) suspeitas, realizando-se os seguintes testes: crescimento em Ágar Kligler-Ferro (KIA-Oxoid), Ágar Lisina-Ferro (LIA-Oxoid), C.V. (Costa-Vernin) e produção da enzima citocromo-oxidase, a partir de crescimento em ágar inclinado adicionado de 0,5 e 1% de NaCl, utilizando 1% da solução reativa de tetrametil-p-fenilenodiamino dihidroclorídrico.

4.4.2- Provas Bioquímicas

As colônias sacarose negativas, suspeitas de *Vibrio vulnificus*, foram submetidas a uma seriação bioquímica simplificada que incluiu teste em meio SIM adicionado de 3% de NaCl, Voges-Proskauer adicionado de 1% de NaCl, halofilismo (0, 3, 6, 8 e 10% de NaCl), resistência ao agente vibriostático O/129 (fosfato de 2,4 diamino-6, diisopropil-pteridina) e ONPG (σ nitrofenil- β -D galactopiranosídeo) (Vanderzant & Splittoesser, 1992).

As colônias sacarose positivas, suspeitas de *A. hydrophila*, e *Plesiomonas shigelloides* foram submetidas a provas bioquímicas mais completas, quais sejam: citocromo-oxidase, oxidação/fermentação da glicose, utilização de aminoácidos (lisina/ornitina descarboxilase, arginina dehidrolase), fermentação da sacarose, arabinose, manose e halofilismo (0, 3, 6, 8 e 10%) (Janda et al, 1996).

As colônias citocromo-oxidase negativas, suspeitas de *Salmonella* spp., foram submetidas a uma bioquímica simplificada incluindo teste em meio SIM para a verificação de H₂S (gás), mobilidade e ausência de indol, além da descarboxilação do aminoácido lisina e verificação da produção de citrato (Peresi et al., 1998).

As amostras identificadas bioquimicamente como *V. parahaemolyticus* foram submetidas ao teste de Kanagawa em ágar Wagatsuma a fim de verificar sua patogenicidade através da hemólise total dos eritrócitos humanos. Foram ainda submetidas à prova sorológica para identificação do sorotipo. Essa prova foi realizada em placa de vidro, na qual foi empregada os soros mono e polivalentes, produzidos por Denka Seiken Co. Ltda, Tokio, Japão. E, em seguida, correlacionados os antígenos O e K a fim de verificar se os sorotipos encontrados eram conhecidos, desconhecidos ou novos.

4.4.2.1- Teste de β -Galactosidase (ONPG) (Ital, 1995)

As amostras identificadas bioquimicamente como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* foram testadas quanto à presença de ONPG. Para tal, foi inoculada uma alçada de inóculo proveniente de agar nutriente acrescido de 1% de NaCl (24 horas) em tubos contendo 0,2 mL de salina. Os discos de ONPG foram colocados no interior dos tubos e incubados em banho-maria a 37°C por 24 horas. As cepas de *V. parahaemolyticus* são ONPG negativas porque não dispõem das enzimas de fermentação da lactose sendo incapazes de hidrolisar o galactosídeo ONPG, análogo à lactose.

4.4.2.2- Caracterização Antigênica (FDA, 1995)

A caracterização antigênica consiste na identificação dos antígenos somáticos “O” (Ohne) em sua forma lisa (S), e capsulares “K” (Kapsum). Os antígenos “O” são resistentes ao álcool, aos ácidos diluídos e ao calor, não sendo destruídos a temperatura de 100°C por 2 horas. Compõe-se quimicamente de complexos fosfolipídicos-polissacarídicos. Os antígenos “K” também chamados de envoltório ou capsulares apresentam como característica a inibição da aglutinação frente aos antissoros somáticos.

As cepas de *V. parahaemolyticus* foram inoculadas, em duplicata, em meio agar TSA (Agar Trypticase de Soja) contendo 2% de NaCl e incubadas a 37°C por 24 horas.

Determinação dos antígenos “O”:

Os inóculos em TSA 2% foram lavados em solução contendo 5% de glicerol e 2% de NaCl para a formação de uma suspensão densa que foi autoclavada durante 1 hora a 121°C e em seguida centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos.

A determinação foi realizada com auxílio de uma pipeta sorológica, colocando-se uma gota da suspensão em placa de vidro dividida em 12 quadrados, sendo um deles reservado para o controle. A etapa seguinte consistiu em colocar os antissoros (O1 a O11), homogeneizados, observando a ocorrência ou não de aglutinação em 1 minuto. Nos casos em que não ocorreu aglutinação, o processo foi repetido e a amostra retestada.

Determinação dos antígenos “K”:

Os crescimentos em TSA 2% foram lavados em solução salina 2% até obtenção de uma suspensão densa. Então, foram testados os antissoros polivalentes (I a IX) e em seguida os monovalentes. Cepas que não aglutinaram foram retestadas.

4.4.2.3-Reação de Kanagawa em Agar Wagatsuma (Ital, 1995)

Realizada nas amostras de *V. parahaemolyticus*, com a finalidade de verificar a patogenicidade através da hemólise total dos eritrócitos humanos. Após o preparo do meio Agar Wagatsuma, foram coletadas assepticamente por venopunção cerca de 10 mL de eritrócitos humanos (tipo O), transferidos para erlenmeyer contendo pérolas de vidros esterilizadas. Em seguida os eritrócitos foram lavados 3 vezes em salina fisiológica (0,85%) e reconstituído o volume de sangue original. A cada 100 mL do meio resfriado a 50°C foram adicionados 2 mL de eritrócitos lavados. O plaqueamento foi imediato e a leitura do halo de hemólise feita após 24 horas de incubação a 37°C.

4.4.2.4- Teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos

Foram selecionadas para a avaliação de resistência antimicrobiana aquelas espécies de maior relevância epidemiológica para a clínica humana (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae* não O1, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* e *V. vulnificus*).

As amostras identificadas bioquimicamente como *A. hydrophila* foram submetidas a provas de susceptibilidade a agentes microbianos através da prova por difusão com disco utilizando 9 classes de antimicrobianos: **aminoglicosídeos** (amicacina-AK, 30 µg e gentamicina-CN, 10µg), **antifenicóis** (cloranfenicol-C, 30µg), **cefalosporinas** (ceftriaxona-CRO, 30µg), **associação de sulfas** (sulfametoxazol-trimetoprim-SXT 23,75µg/1,25µg), **nitrofuranos** (nitrofurantoína-F, 300µg), **quinolonas** (ciprofloxacina-CIP, 5µg), **penicilinas** (ampicilina-AMP, 10µg), **tetraciclinas** (tetraciclina-TE, 30µg) e **carbapenems** (imipenem-IMP, 10µg).

Espécies consideradas de relevante potencial patogênico como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* e *V. cholerae* não O1 foram submetidas a testes de antibiograma utilizando 6 classes dos seguintes antimicrobianos: **tetraciclinas** (tetraciclina-TE, 30µg), **antifenicóis** (cloranfenicol-C, 30µg), **nitrofuranos** (nitrofurantoína-F, 300µg), **associação de sulfas** (sulfametoxazol-trimetoprim-SXT 23,75µg/1,25µg), **quinolonas** (ciprofloxacina-CIP, 5µg) e **penicilinas** (ampicilina-AMP, 10µg).

O meio utilizado para o teste foi ágar Mueller-Hinton (Oxoid) preparado de acordo com as instruções do fabricante e distribuídos em placas de Petri com altura máxima de 4 mm.

Para execução do teste obteve-se o crescimento das amostras em 1 mL de APA 1%, NaCl a 37°C, sob agitação por aproximadamente 2 horas. Em seguida foram semeadas para reisolamento em placas contendo Agar Nutriente (Difco) acrescido de 1% de NaCl e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente foram selecionadas de 3 a 5 colônias de morfologia compatível, sendo estas inoculadas em 2 mL de caldo Mueller Hinton (Merck) e incubadas a 37°C, até atingirem a turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland aferida em fotocolorímetro (Vitek-Biomérieux). A suspensão bacteriana foi semeada uniformemente em placas, com auxílio de *swabs* esterilizados. O inóculo foi absorvido por 10 a 15 minutos e os discos com antibióticos depositados, com auxílio de dispensador (Oxoid). Para cada cepa de microrganismo investigado foram utilizadas duas placas de Mueller Hinton contendo os antibióticos a serem testados. Após incubação das placas a 35°C por 24 horas foi efetuada a leitura dos halos de inibição utilizando paquímetro.

As cepas padrões utilizadas para controle foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 e *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, cujas variações aceitáveis para as medidas dos halos de inibição destas cepas encontram-se estabelecidas no National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 2001).

4.5- Análise estatística dos dados:

A análise estatística dos dados apresentados neste trabalho foram realizadas em programa de computador (The SAS System) pela analista de sistemas do NPD (Núcleo de Processamento de Dados) da Universidade Federal Fluminense, Angela S.Guedes.

Os testes utilizados foram Qui quadrado para a distribuição mensal dos microrganismos isolados ($p>0,10$) e Mantel Haenszel para a distribuição dos microrganismos isolados após o processamento de pré-cozimento ($p>0,97$). Os resultados do tratamento estatístico revelaram uma diferença significativa entre os dados avaliados.

4.6- Resultados

Os resultados obtidos após a análise microbiológica das 86 amostras de mexilhões submetidos à pesquisa de patógeno clássico (*Salmonella* spp.) e emergentes (*V. vulnificus*, *A. hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*) permitiram o isolamento e identificação de 568 cepas pertencentes a 3 gêneros: *Aeromonas* spp. (372), *Vibrio* sp. (188) e *Plesiomonas shigelloides* (08). Adicionalmente, observamos que em nenhuma das amostras avaliadas detectou-se a presença de *Salmonella* spp. (Gráfico 1).

Observamos que, das 372 cepas de *Aeromonas* spp. isoladas, 172 originaram-se dos mexilhões *in natura* e 200 dos pré-cozidos (Gráfico 2). Com relação, ao gênero *Vibrio*, foram isoladas 136 cepas a partir dos mexilhões *in natura* e 52 dos pré-cozidos. (Gráfico 3). Finalmente, das 08 cepas de *Plesiomonas shigelloides* identificadas, 02 foram isoladas a partir de mexilhões *in natura* e 06 dos pré-cozidos (Gráfico 4).

Destacamos que os meses de junho, julho, agosto, outubro e dezembro apresentaram maior frequência de isolamento e identificação sugerindo uma possível distribuição sazonal das espécies de *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides* (Tabela 1a e 1b).

Das 188 cepas do gênero *Vibrio* spp. foram isoladas 12 espécies quais sejam: *Vibrio* spp. (48- 25,53%), *V. cholerae* não O1 (32- 17,02%), *V. alginolyticus* (31- 16,48%), *V. parahaemolyticus* (17- 9,04%), *V. vulnificus* (14- 7,44%), *V. fluvialis* (10- 5,31%), *V. cincinnatiensis* (08- 4,25%), *V. carchariae* (08- 4,25%), *V. damsela* (07- 3,72%), *V. furnissii* (07- 3,72%), *V. anguillarum* (04- 2,12%), *V. aestuarinus* (01- 0,53%) e *V. harveyi* (01- 0,53%) (Tabela 2).

Com relação aos mexilhões *in natura* foram isoladas 136 cepas do gênero *Vibrio*, distribuídas nas seguintes espécies: *Vibrio* spp. (40- 21,27%), *V. alginolyticus*

(26- 13,82%), *V. cholerae* não O1 (23- 12,23%), *V. parahaemolyticus* (11- 5,85%), *V. carchariae* (08- 4,25%), *V. vulnificus* (06- 3,19%), *V. damsela* (06- 3,19%), *V. cincinnatiensis* (05- 2,65%), *V. anguillarum* (04- 2,12%), *V. fluvialis* (03- 1,59%), *V. furnisii* (02- 1,06%), *V. aestuarinus* (01- 0,53%) e *V. harveyi* (01- 0,53%) (Tabela 2).

As amostras de mexilhões pré-cozidos, por sua vez, permitiram o isolamento e identificação de 52 cepas de *Vibrio* distribuídas da seguinte forma: *V. cholerae* não O1 (09- 4,78%), *V. vulnificus* (08- 4,25%), *Vibrio* spp. (08- 4,25%), *V. fluvialis* (07- 3,72%), *V. parahaemolyticus* (06- 3,19%), *V. alginolyticus* (05- 2,65%), *V. furnisii* (05- 2,6%), *V. cincinnatiensis* (03- 1,59%) e *V. damsela* (01- 0,53%) (Tabela 2).

Das 568 cepas isoladas, 372 pertenciam ao gênero *Aeromonas* distribuídas entre as seguintes espécies: *A. media* (141- 31,10%), *A. hydrophila* (59- 15,50%), *A. caviae* (56- 14,80%), *A. veronii* biótipo *veronii* (44- 11,60%), *Aeromonas* spp.. (28- 7,36%), *A. sobria* (16- 4,20%), *A. trota* (16- 4,20%), *A. jandaei* (05- 1,31%), *A. schubertii* (05- 1,31%) e *A. veronii* biótipo *sobria* (02- 0,52%) (Tabela 3).

Os mexilhões *in natura* permitiram o isolamento e identificação de 172 cepas de *Aeromonas* observando a seguinte distribuição: *A. media* (47- 12,36%), *A. hydrophila* (38- 10%), *A. veronii* biótipo *veronii* (27- 7,10%), *A. caviae* (22- 5,80%), *Aeromonas* spp.. (18- 4,73%), *A. trota* (10- 2,63%), *A. sobria* (09- 2,40%) e *A. veronii* biótipo *sobria* (01- 0,26%) (Tabela 3).

Por outro lado, a partir dos mexilhões pré-cozidos foram isoladas 200 cepas de *Aeromonas*, assim distribuídas: *A. media* (94- 24,73%), *A. caviae* (34- 9%), *A. hydrophila* (21- 5,50%), *A. veronii* biótipo *veronii* (17- 4,47%), *Aeromonas* spp.. (10- 2,63%), *A. sobria* (07- 1,84%), *A. trota* (06- 1,57%), *A. jandaei* (05- 1,31%), *A. schubertii* (05- 1,31%) e *A. veronii* biótipo *sobria* (01- 0,26%) (Tabela 3).

Cabe ressaltar que a distribuição das cepas de *Plesiomonas shigelloides* se deu da seguinte maneira: 02 (0,52%), a partir de mexilhões *in natura* e 06 (1,57%) dos pré-cozidos perfazendo um total de 08 cepas (2,10%) isoladas (Tabela 3).

Considerando a existência de amostras repetidas, foram selecionadas 14 das 17 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas neste estudo e analisadas antigenicamente com o objetivo de identificar os sorotipos mais frequentes nas amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos. Assim sendo, os sorotipos mais isolados foram: 2 não tipados (O5K? e O10 K?), 4 novos (O8K15, O9K56, O2K30, O8K60) e 4 conhecidos (O1K25, O10K52, O2K3 e O3K6) (Tabela 4).

As 14 cepas de *V. parahaemolyticus* analisadas antigenicamente foram avaliadas quanto ao seu potencial patogênico através da atividade hemolítica em Ágar Wagatsuma designada reação de Kanagawa. Destas, 4 apresentaram-se Kanagawa positivas e 10 negativas. Todas as cepas de *V. parahaemolyticus* positivas para reação de Kanagawa eram provenientes das amostras de mexilhões *in natura* (Tabela 4).

Das 59 cepas de *Aeromonas hydrophila* isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos, considerando-se a existência de amostras repetidas, foram selecionadas 26, com o objetivo de realização da prova de susceptibilidade a agentes antimicrobianos através de difusão com disco. Os resultados do teste demonstraram resistência das cepas a 3 drogas: ampicilina (61,53%), nitrofurantoína (7,69%) e sulfametoxazol-trimetoprim (3,84%). As drogas que apresentaram maior percentual de sensibilidade foram ceftriaxona, ciprofloxacina, tetraciclina, amicacina, cloranfenicol, imipenem e gentamicina, todas com 100% de sensibilidade, seguidas por sulfametoxazol-trimetoprim (96,15%), nitrofurantoína (92,30%) e ampicilina (38,46%) (Tabela 5).

Seguindo a mesma metodologia, foram avaliadas 25 cepas de *V. cholerae* não O1 apresentando os seguintes resultados: resistência das cepas a 5 fármacos, entre eles ampicilina (40,74%), pefloxacina (7,40%), tetraciclina (3,70%) e nitrofurantoína (3,70%). As cepas apresentaram sensibilidade de 100% absoluta ao sulfametoxazol-trimetoprim e ao cloranfenicol. Resultados de significativa expressão com relação à sensibilidade foi observada de acordo com os seguintes antimicrobianos: nitrofurantoína (88,88%), tetraciclina (77,77%), pefloxacina (62,96%), ampicilina (59,25%). Algumas cepas apresentaram-se em estado intermediário frente a determinados antibióticos como pefloxacina (29,62%), tetraciclina (18,51%) e nitrofurantoína (18,51%) (Tabela 6).

Vibrio vulnificus apresentou perfil de resistência aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (90,90%) e nitrofurantoína (9,09%). As cepas avaliadas apresentaram 100% de sensibilidade ao cloranfenicol sendo seguido por sulfametoxazol-trimetoprim (90,90%), nitrofurantoína (81,81%), pefloxacina (72,72%), tetraciclina (27,27%). Um perfil intermediário relevante foi observado para tetraciclina (72,72%) (Tabela 7).

Vibrio fluvialis apresentou perfil de sensibilidade de 100% aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina, cloranfenicol e nitrofurantoína. Apresentou ainda, 88,88% de sensibilidade a pefloxacina seguido por sulfametoxazol-trimetoprim (77,77%). Um perfil intermediário foi apresentado para sulfametoxazol-trimetoprim (22,22%), pefloxacina (11,11%) e ampicilina (11,11%). Por outro lado, a resistência foi observada em 88,88% para ampicilina (Tabela 8).

Cepas de *V. parahaemolyticus* apresentaram o seguinte perfil de resistência aos agentes microbianos: ampicilina (56,25%), nitrofurantoína (18,75%) e tetraciclina (18,75%). No entanto, apresentaram perfis de sensibilidade expressivos, a saber: cloranfenicol (87,50%), pefloxacina (87,50%), nitrofurantoína (81,25%), tetraciclina (68,75%), sulfametoxazol-trimetoprim (68,75%), ampicilina (43,75%) e Ressalta-se que perfis intermediários foram observados para sulfametoxazol-trimetoprim (31,25%), pefloxacina (12,50%), cloranfenicol (12,50%) e tetraciclina (12,50%) (Tabela 9).

É interessante observar que a espécie *Vibrio cholerae* não O1 apresentou perfil de resistência à ampicilina e multirresistência à pefloxacina-ampicilina, nitrofurantoína-pefloxacina. *Vibrio fluvialis* e *V. parahaemolyticus* apresentaram cepas resistentes à ampicilina. As espécies de *Vibrio vulnificus* apresentaram-se resistentes à ampicilina e nitrofurantoína. *Aeromonas hydrophila* apresentou perfil de resistência à ampicilina e multirresistência à nitrofurantoína-ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim-ampicilina.

Das 32 cepas de *Vibrio cholerae* não O1 identificadas através dos testes bioquímicos foi possível a classificação das cepas de acordo com os grupos de Heiberg. Assim, 23 cepas foram classificadas como grupo I, 6 pertenciam ao grupo III, 2 ao grupo II e 1 ao grupo VII.

Podemos observar nas Tabelas 10 e 11, a distribuição das espécies isoladas de acordo com os pontos de coleta. As cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas neste estudo originaram-se das seguintes áreas: Praia de Icaraí, Ilha dos Cargos, Aeroporto Santos Dumont, Praia da Boa Viagem, Praia do Flamengo, Costão de Niterói.

As cepas de *V. vulnificus* isoladas originaram-se das áreas da Praia de Boa Viagem, Ilha dos Cargos, Aeroporto Santos Dumont, Ilha do Meio e Ilha das Palmeiras. Enquanto *V. fluvialis* foi isolado das águas das regiões da Ilha dos Cargos, Ilha dos Pais, Praia de Botafogo, Praia da Boa Viagem e Aeroporto Santos Dumont.

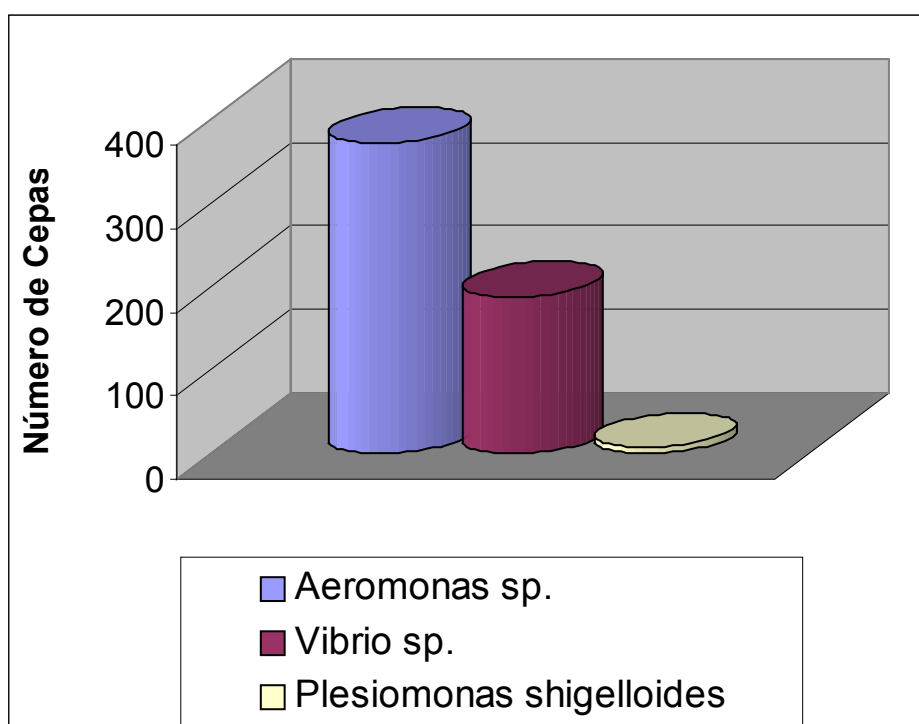
As cepas de *Plesiomonas shigelloides* isoladas originaram-se dos seguintes pontos amostrais: Ilha dos Cargos, Praia da Boa Viagem, Costão de Niterói, Praia de Icaraí e Ilha do Meio.

V. cholerae não O1 apresentou-se amplamente distribuída no ecossistema aquático da baía de Guanabara tendo sido isolada das seguintes regiões: Ilha da Feiticeira, Ilha do Governador, Praia de Icaraí, Aeroporto Santos Dumont, Praia da Boa Viagem, Praia de Botafogo, Ilha das Mães, Ilha dos Pais, Ilhas Cagarras, Ilha dos Veados, Ilha Redonda e Ilha das Palmeiras.

Aeromonas hydrophila foi a espécie mais amplamente distribuída no ecossistema aquático estudado tendo sido isoladas dos 19 pontos de coleta, quais sejam: Praia de Icaraí, Praia da Boa Viagem, Costão de Niterói, Praia de Botafogo, Praia da Urca, Ilha do Governador, Aeroporto Santos Dumont, Praia do Flamengo, Fortaleza de Santa Cruz, Ilha das Mães, Ilhas Cagarras, Ilha das Palmeiras, Ilha Redonda, Ilha Comprida, Ilha dos Pais, Ilha dos Veados, Ilha dos Cargos, Ilha do Meio e Ilha da Feiticeira.

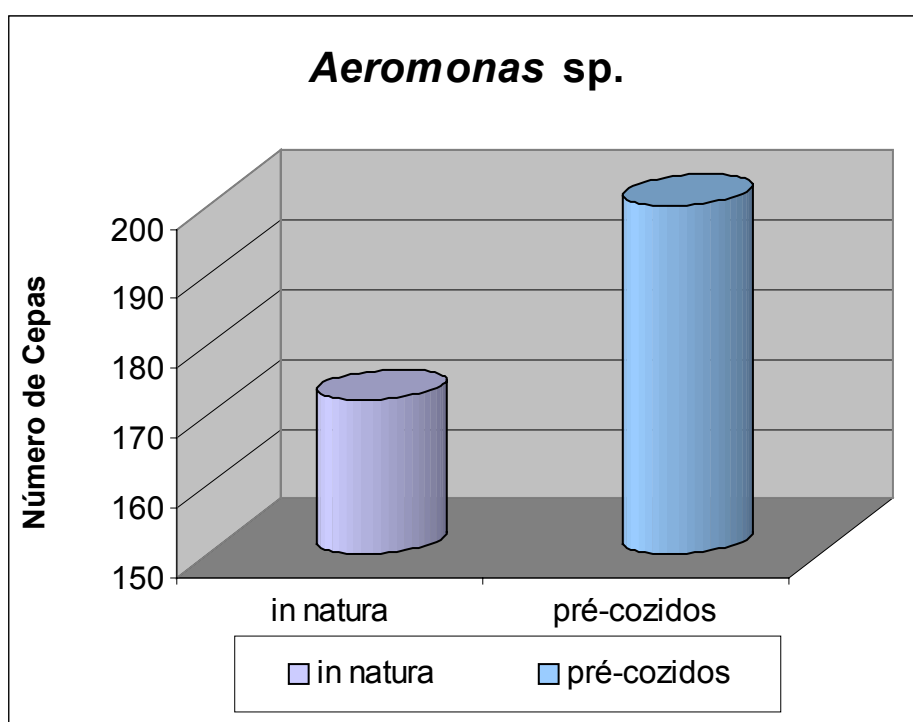
Gráficos e Tabelas:

Gráfico 1- Cepas de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de 86 amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).



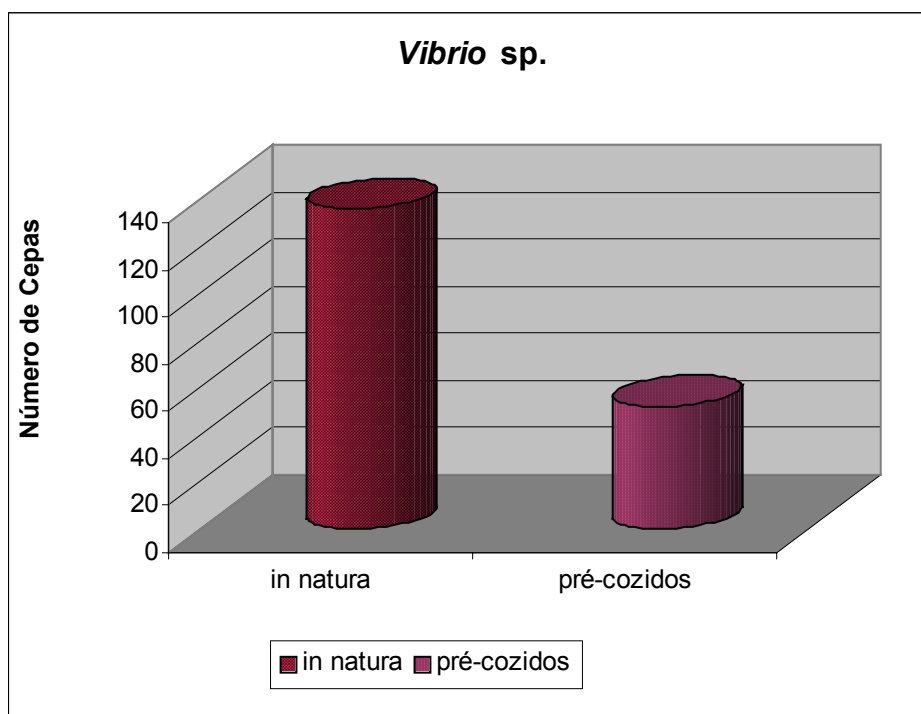
$p > 0,97$ (Mantel-Haenszel).

Gráfico 2- Cepas de *Aeromonas* spp.. isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).



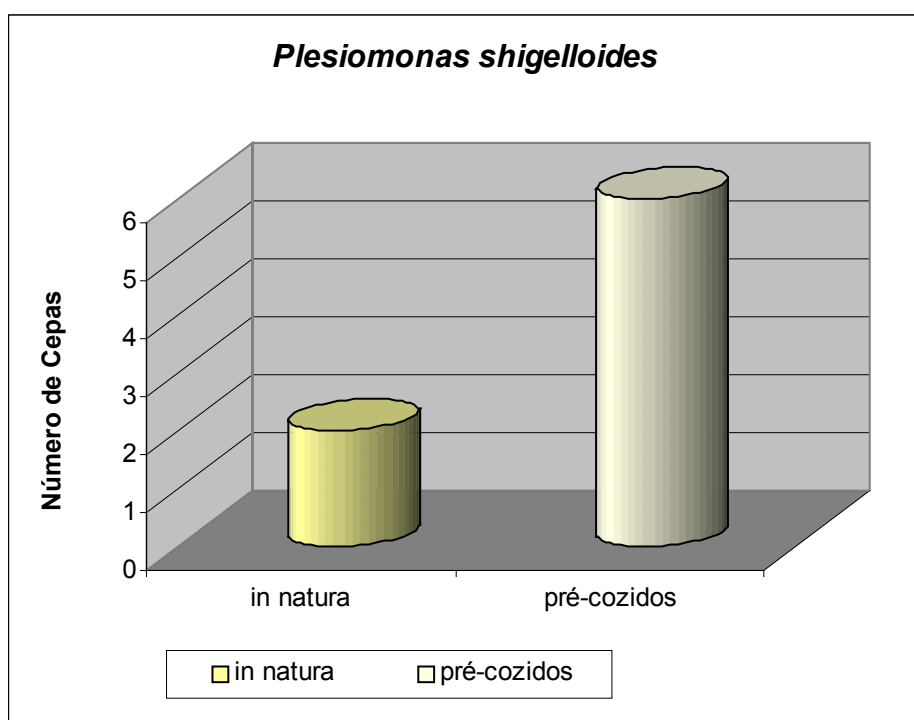
$p > 0,97$ (Mantel-Haenszel).

Gráfico 3- Cepas de *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).



$p > 0,97$ (Mantel-Haenszel).

Gráfico 4- Cepas de *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).



$p > 0,97$ (Mantel-Haenszel).

Tabela 1 a.- Distribuição mensal (janeiro-junho) dos microrganismos isolados a partir de amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Microrganismos	jan	fev	mar	abr	mai	jun	Total
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	3	0	0	0	4	8
<i>A. sobria</i>	2	3	1	2	0	7	15
<i>A. caviae</i>	4	3	0	4	0	8	19
<i>A. media</i>	1	10	4	0	2	13	30
<i>A. veronii veronii</i>	0	2	0	2	0	1	5
<i>A. veronii sobria</i>	1	0	1	0	1	0	3
<i>A. trota</i>	3	2	0	1	0	2	8
<i>A. jandaei</i>	0	0	0	3	0	0	3
<i>A. schubertii</i>	0	0	0	4	1	0	5
<i>Aeromonas</i> spp..	0	0	2	0	0	0	2
Total	12	23	8	16	4	35	98
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	0	0	3	0	0	2	5
Total	0	0	3	0	0	2	5
<i>Vibrio cholerae</i> não O1	1	0	1	4	9	0	15
<i>V. alginolyticus</i>	5	3	4	3	0	5	20
<i>V. cincinnatiensis</i>	0	1	0	3	1	0	5
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	4	1	2	1	2	10
<i>V. vulnificus</i>	0	1	3	0	0	3	7
<i>V. fluvialis</i>	0	1	1	0	2	5	9
<i>V. damsela</i>	0	0	3	0	0	1	4
<i>V. aestuarinus</i>	0	0	1	0	0	0	1
<i>V. furnisii</i>	0	0	1	0	0	3	4
<i>V. anguillarum</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. carchariae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. harveyi</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio</i> spp.	0	1	10	0	3	6	20
Total	6	11	25	12	16	25	95
Total geral	18	34	36	28	20	62	198

$p > 0,10$ (Qui-quadrado)

Tabela 1 b.- Distribuição mensal (julho-dezembro) dos microrganismos isolados a partir de amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Microrganismos	jul	ago	set	out	nov	dez	Total
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	29	4	4	5	6	51
<i>A. sobria</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>A. caviae</i>	2	19	5	3	0	8	37
<i>A. media</i>	16	30	9	30	12	14	111
<i>A. veronii veronii</i>	16	9	7	3	1	2	38
<i>A. veronii sobria</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. trota</i>	0	5	1	2	0	0	8
<i>A. jandaei</i>	0	0	0	1	0	1	2
<i>A. schubertii</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas spp.</i>	6	7	7	2	2	2	26
Total	43	100	33	45	20	33	274
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	0	0	2	1	0	0	3
Total	0	0	2	1	0	0	3
<i>Vibrio cholerae</i> não O1	2	5	0	7	3	0	17
<i>V. alginolyticus</i>	1	4	0	0	1	5	11
<i>V. cincinnatiensis</i>	2	1	0	0	0	0	3
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	4	0	0	0	0	7
<i>V. vulnificus</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>V. fluvialis</i>	0	0	0	1	0	6	7
<i>V. damsela</i>	0	0	0	1	0	2	3
<i>V. aestuarinus</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. furnisii</i>	2	0	0	0	0	1	3
<i>V. anguillarum</i>	3	1	0	0	0	0	4
<i>V. carchariae</i>	6	0	0	0	2	0	8
<i>V. harveyi</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Vibrio spp.</i>	10	5	1	8	1	3	28
Total	29	21	1	18	7	17	93
Total geral	72	121	36	64	27	50	370

$p > 0,10$ (Qui-quadrado)

Tabela 2- Frequência das espécies de *Vibrio* spp. isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos produzidos e comercializados pela EECM.

<u>Microrganismos</u>	<u><i>In natura</i></u>	<u>Pré-cozidos</u>	<u>Total</u>
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Vibrio</i> spp.	40 (21,27)	08 (4,25)	48(25,53)
<i>V. cholerae</i> não O1	23 (12,23)	09 (4,78)	32 (17,02)
<i>V. alginolyticus</i>	26 (13,82)	05 (2,65)	31 (16,48)
<i>V. parahaemolyticus</i>	11 (5,85)	06 (3,19)	17 (9,04)
<i>V. vulnificus</i>	06 (3,19)	08 (4,25)	14 (7,44)
<i>V. fluvialis</i>	03 (1,59)	07 (3,72)	10 (5,31)
<i>V. cincinnatiensis</i>	05 (2,65)	03 (1,59)	08 (4,25)
<i>V. carchariae</i>	08 (4,25)	00	08 (4,25)
<i>V. damsela</i>	06 (3,19)	01 (0,53)	07 (3,72)
<i>V. furnisii</i>	02 (1,06)	05 (2,65)	07 (3,72)
<i>V. anguillarum</i>	04 (2,12)	00	04 (2,12)
<i>V. aestuarinus</i>	01 (0,53)	00	01 (0,53)
<i>V. harveyi</i>	01 (0,53)	00	01 (0,53)
Total	136 (72,34)	52 (27,65)	188 (100)

p>0,97 (Mantel-Haenszel).

N= número total de cepas caracterizadas

% = Percentual correspondente ao total de cepas caracterizadas

Tabela 3 – Frequência das espécies de *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos comercializados pela EEC M.

<u>Microrganismos</u>	<u><i>In natura</i></u>	<u>Pré-cozidos</u>	<u>Total</u>
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>A. media</i>	47 (12,36)	94 (24,73)	141 (37,10)
<i>A. hydrophila</i>	38 (10,00)	21 (5,50)	59 (15,50)
<i>A. caviae</i>	22 (5,80)	34 (9,00)	56 (14,80)
<i>A. veronii veronii</i>	27 (7,10)	17 (4,47)	44 (11,60)
<i>Aeromonas</i> sp.	18 (4,73)	10 (2,63)	28 (7,36)
<i>A. sobria</i>	09 (2,40)	07 (1,84)	16 (4,20)
<i>A. trota</i>	10 (2,63)	06 (1,57)	16 (4,20)
<i>P. shigelloides</i>	02 (0,52)	06 (1,57)	08 (2,10)
<i>A. veronii sobria</i>	01 (0,26)	01 (0,26)	02 (0,52)
<i>A. schubertii</i>	00	05 (1,31)	05 (1,31)
<i>A. jandaei</i>	00	05 (1,31)	05 (1,31)
Total	174 (45,80)	206 (54,20)	380 (100)

p>0,97 (Mantel-Haenszel).

N= número total de cepas caracterizadas

% = Percentual correspondente ao total de cepas caracterizadas

Tabela 4- Reação de Kanagawa e sorologia das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de amostras de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) produzidos e comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Nº da Amostra	Reação de Kanagawa	Sorologia
1	-	O5K?
2	+	O8K15 *
3	+	O9K56 *
4	-	O1K25
5	-	O9K56 *
6	-	O10K52
7	-	O10K52
8	+	O10K52
9	-	O2K3
10	+	O3K6
11	-	O2K30
12	-	O10K?
13	-	O10K?
14	-	O8K60 *

* Não caracterizado anteriormente.

Tabela 5 - Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 26 cepas de *Aeromonas hydrophila* isoladas a partir de amostras de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Cepas	Sensibilidade	Resistência
A, B, C, D, E, F, G, H, I, J,	CRO-SXT-F-CN-CIP-AMP-TE-AK-C-IMP	-
K, L, M, N, O P, Q, R, S, T,	CRO-SXT-F-CN-CIP-TE-AK-C-IMP	AMP
U, V, W		
X, Y	CRO-SXT-CN-CIP-TE-AK-C-IMP	F-AMP
Z	CRO-F-CN-CIP-TE-AK-C-IMP	SXT-AMP

CRO (Ceftriaxona), SXT (Sulfametoxazol-trimetoprim), F (Nitrofurantoína), CN (Gentamicina), CIP (Ciprofloxacina), AMP (Ampicilina), TE (Tetraciclina), AK (Amicacina) C (Cloranfenicol) e IMP (Imipenem).

Tabela 6- Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 25 cepas de *Vibrio cholerae* não O1 isoladas a partir de amostras de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Cepas	Sensibilidade	Intermediário	Resistência
A, B.	TE-C-F-SXT-PEF-AMP.	-	-
C, D, E, F, G, H	TE-C-F-SXT-PEF-AMP	-	-
I, J	TE-C-F-SXT- PEF-AMP	-	-
K	TE-C-F-SXT-PEF	-	AMP
L	C-F-SXT-PEF-AMP	TE	-
M, N, O	TE-C-F-SXT	PEF	AMP
P, Q	TE-C-SXT-AMP	-	F-PEF
R, S	TE-C-SXT-PEF-AMP	F	-
T, U	C-F-SXT-PEF-AMP	TE	-
V	TE-C-FSXT	-	PEF-AMP
W	TE-C-F-SXT	PEF	AMP
X	C-F-SXT-AMP	TE-PEF	-
Y	C-F-SXT	PEF	TE-AMP

TE (Tetraciclina), C (Cloranfenicol), F (Nitrofurantoína), SXT (Sulfametoxazol-trimetoprim), PEF (Pefloxacina) e AMP (Ampicilina).

Tabela 7 - Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 10 cepas de *Vibrio vulnificus* isoladas a partir de amostras de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Cepas	Sensibilidade	Intermediário	Resistência
A	C-F-SXT	TE-PEF	AMP
B	TE-C-SXT-PEF	F	AMP
C	C-AMP	SXT-PEF-TE	F
D, E, F, G	C-F-SXT-PEF	TE	AMP
H	TE-C-F-SXT-PEF	-	AMP
I	C-F-SXT	TE-PEF	AMP
J	TE-C-F-SXT-PEF	-	AMP

TE (Tetraciclina), C (Cloranfenicol), F (Nitrofurantoína), SXT (Sulfametoxazol-trimetoprim), PEF (Pefloxacina) e AMP (Ampicilina).

Tabela 8 - Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 09 cepas de *Vibrio fluvialis* isoladas a partir de amostras de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Cepas	Sensibilidade	Intermediário	Resistência
A, B, C, D, E	TE-C-F-SXT-PEF	-	AMP
F, G	TE-C-F-PEF	SXT	AMP
H	TE-C-F-SXT	PEF	AMP
I	TE-C-F-SXT-PEF	AMP	-

TE (Tetraciclina), C (Cloranfenicol), F (Nitrofurantoína), SXT (Sulfametoxazol-trimetoprim), PEF (Pefloxacina), e AMP (Ampicilina).

Tabela 9 - Perfil de Resistência aos Antimicrobianos das 11 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas a partir de mexilhões *in natura* e pré-cozidos comercializados pela EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões).

Cepas	Sensibilidade	Intermediário	Resistência
A	C-F-PEF-AMP	TE-SXT	-
B,C, D, E	C-F-PEF-TE-SXT	-	AMP
F	TE-C-F-SXT-PEF	-	AMP
G, H	TE-C-F-PEF-AMP	SXT	-
I	C-F-SXT	TE-PEF	AMP
J	TE-C-SXT	PEF	AMP
K	TE-C-F-SXT-PEF	-	AMP

TE (Tetraciclina), C (Cloranfenicol), F (Nitrofurantoína), SXT (Sulfametoxazol-trimetoprim), PEF (Pefloxacina), e AMP (Ampicilina).

4.7- Discussão

A qualidade higiênico-sanitária de produtos de origem animal é um fator primordial para assegurar a produção de um produto de qualidade e inócuo para a saúde humana. O monitoramento microbiológico varia de acordo com o tipo de alimento e sua apresentação final ao consumidor. Neste sentido, os mexilhões constituem parte integrante do ecossistema aquático e suas características de filtradores permitem que sejam utilizados como excelente parâmetro da qualidade ambiental.

A avaliação de *Salmonella* spp. como parâmetro indicador da qualidade microbiológica dos mexilhões *in natura* e pré-cozidos não permitiu o isolamento de microrganismos desse gênero a partir das amostras analisadas neste estudo. Do ponto de vista da Vigilância Sanitária e da legislação brasileira (Brasil, 2001), os resultados microbiológicos para esse parâmetro indicaram que tanto os mexilhões *in natura* quanto os pré-cozidos encontravam-se em condições higiênico-sanitárias satisfatórias para o consumo humano. Entretanto, há necessidade de monitoramento constante sobre a possível presença desse microrganismo em alimentos, pois casos humanos ocasionados por *S. Typhi* têm ocorrido em nosso meio com relativa frequência, tendo sido reportados 48 casos no ano de 2002 (LABENT, 2003).

De acordo com Wood (1976), o exame microbiológico periódico da água e dos moluscos bivalves compõem excelente parâmetro indicador da contaminação por microrganismos patogênicos. Portanto, os mexilhões são utilizados como sentinelas da qualidade do ecossistema marinho.

Com referência ao monitoramento de *V. cholerae* O1, embora o reservatório da doença por ele causada seja o homem, verificou-se a ausência dessa espécie nos ambientes estudados através da avaliação dos mexilhões capturados nos bancos naturais, em diversas regiões da Baía de Guanabara, pelos pescadores da EECM. Esses resultados reforçam a importância dos esforços dos Sistemas de Saúde

que desde 1993, após o pico epidêmico da doença no país, vêm trabalhando no sentido de reduzir o número de casos de cólera através de melhorias no sistema de abastecimento público de água, do fornecimento de hipoclorito de sódio à população e das campanhas de educação sanitária.

Em 1999, houve um surto da doença no Porto de Paranaguá supostamente relacionado a caminhoneiros originários da região Nordeste. O Ministério da Saúde intensificou as ações de prevenção e vigilância epidemiológica nessa região a fim de favorecer o controle da doença. Então, no ano 2000 foram reportados 734 novos casos atingindo principalmente Pernambuco e Alagoas. No ano seguinte, o número de casos em todo o país limitou-se a sete, também concentrados na região Nordeste, sendo 4 no Ceará, 1 em Pernambuco, 1 em Alagoas e 1 em Sergipe (Funasa, 2003).

Segundo dados da FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), caso a situação de controle da doença seja mantida nos próximos anos, estima-se que em pouco tempo a doença poderá entrar para o rol de enfermidades transmissíveis com tendência declinante ou mesmo brevemente erradicada.

A maioria dos casos de cólera, e de outras gastroenterites relacionadas à via hídrica, possuem intrínseca relação com a qualidade da água de abastecimento público que, em casos de contaminação, representam importante fator desencadeador para ocorrência de surtos. Considerando que muitos dos locais de coleta da presente investigação são reconhecidamente poluídos inclusive com a presença de despejos sanitários como é o caso da Praia de Icaraí, Praia do Flamengo, Praia da Urca, Praia de Botafogo, Praia de Boa Viagem, Aeroporto Santos Dumont e Ilha do Governador, poderíamos especular os riscos de contaminação humana seja por atividades pesqueiras ou de balneário e também pelo consumo de alimentos provenientes desses locais (Pinheiro Jr. et al., 2002).

A análise bacteriológica referente à enumeração de coliformes fecais e *Escherichia coli* tem sido recomendada a fim de auxiliar na eliminação da influência negativa de agentes poluentes e contaminantes microbiológicos que prejudicam a qualidade dos mexilhões e do ambiente aquático de um modo geral. Esse parâmetro não possui relação direta com a detecção de microrganismos das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae, e por esta razão não foi investigado neste estudo.

Contudo, devemos frisar que o consumo de mexilhões, oriundos de locais sabidamente poluídos, pode representar sérios riscos para a saúde dos pescadores, manipuladores e consumidores dos referidos moluscos.

Vibrio cholerae não O1 foi isolado no presente estudo numa frequência significativa tanto a partir dos mexilhões *in natura* (12,23%) quanto dos pré-cozidos (4,78%) corroborando com os dados obtidos em pesquisa semelhante realizada por Hadly (1997) na Flórida, confirmando a detecção da espécie em 28% das amostras avaliadas a partir do ambiente estuarino. Dados do Laboratório de Enterobactérias (LABENT, 2003) reportam que foram isoladas 5 cepas de *V. cholerae* não O1 partir de fontes humanas, no ano de 2002. Tendo em vista a possibilidade desse microrganismo causar infecção humana semelhante à cólera, torna-se uma necessidade observar as características de distribuição da bactéria no ambiente e alimentos marinhos.

No Brasil, *V. alginolyticus* foi isolado a partir de ostras oriundas da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro (Rodrigues & Hofer, 1996). Ainda em nosso País, Matté et al (1994) isolaram o microrganismo a partir de mexilhões numa faixa de 92-100%. Em 2001, foram isoladas 6 cepas de *V. alginolyticus* provenientes de casos humanos (LABENT, 2003). A frequência de isolamento desse microrganismo no presente estudo, a partir de mexilhões *in natura* (13,82%) e pré-cozidos (2,65%) possui dois aspectos importantes que devem ser destacados: a presença de *V. alginolyticus* no ambiente aquático representa um risco, pois pode ocasionar otites tanto nos pescadores quanto em mergulhadores, esportistas ou banhistas. Por outro lado, seu isolamento em mexilhões constitui um problema tecnológico para os manipuladores na etapa de desconchamento dos mexilhões, uma vez que as valvas ocasionalmente provocam ferimentos nas mãos daqueles que os manipulam representando, assim, porta de entrada para estes e outros microrganismos.

Algumas espécies consideradas de menor expressão epidemiológica, sob o ponto de vista da saúde pública, foram isoladas nesta investigação como *V. cincinnatiensis* (4,25%), *V. damsela* (3,72%), *V. aestuarinus* (0,53%), *V. anguillarum* (2,12%), *V. carchariae* (4,25%) e *V. harveyi* (0,53%). Em investigação semelhante, isolamos *V. harveyi* (65%), *V. alginolyticus* (20%), *V. carchariae* (11%) e *V. parahaemolyticus* (4%) a partir de mexilhões de banco natural da região da Ponta de Itaipu, Niterói (Pereira, 1998). Salienta-se no presente estudo, que algumas espécies

embora não possuam potencial patogênico aos seres humanos podem causar infecções em pescado e mariscos tornando-se um problema para a aquicultura. Apesar da sua baixa incidência é importante prosseguir as pesquisas desses microrganismos para que se possa controlar efetivamente as gastroenterites por eles causadas.

As espécies *Vibrio fluvialis* (5,31%) e *V. furnisii* (3,72%) foram isoladas neste estudo numa proporção que sugere alerta com relação à sua presença em alimentos marinhos. Estes dados podem ser confirmados pelas investigações de Matté *et al* (1994), que isolaram *V. fluvialis* na faixa de 34-67% a partir de mexilhões. Ressalta-se que no ano 2000, foi isolada 1 cepa de *V. fluvialis*, no Brasil, a partir de infecção humana (LABENT, 2003).

Vibrio parahaemolyticus foi freqüentemente isolado neste estudo. Dados nacionais e internacionais corroboram os resultados apresentados aqui anteriormente. Nos Estados Unidos, o microrganismo tem sido isolado com freqüência a partir de ostras (DePaola *et al.*, 2003), e na região da Flórida, a partir de material humano numa freqüência de 29% (Hadly, 1997). A incidência desse patógeno no Brasil, nos últimos anos, tem aumentado significativamente observando-se os dados do LABENT (2003), tendo sido reportados 8 casos humanos em 2001 e 14 em 2002. Em São Paulo, Landgraf *et al.* (1996), observaram amostras de alimentos marinhos positivas (35%) para *V. parahaemolyticus*. Ainda no Brasil, Theophilo & Vieira (1994) investigaram amostras de caranguejos provenientes da Praia do Futuro em Fortaleza, e obtiveram uma freqüência de isolamento de 75% para *V. parahaemolyticus*, a partir de amostras *in natura* e 20,5% nas amostras pré-cozidas. Esses dados reforçam a importância da etapa de pré-cozimento dos mexilhões para diminuir a carga microbiana do alimento.

Beauchat (1977), realizou uma investigação comparativa entre três meios de enriquecimento para recuperação de células alteradas de *V. parahaemolyticus* originárias de amostras de caranguejos refrigeradas e congeladas. Os resultados demonstraram que submeter as amostras a temperaturas de resfriamento de 2°C por 30 minutos é suficiente para comprometer às células bacterianas. Verificou também que a manutenção do alimento a temperaturas superiores a 13°C permitiram o crescimento do microrganismo nas amostras analisadas. Com base nesses resultados, ressaltamos a importância da etapa de armazenamento dos mexilhões pré-cozidos em temperaturas

de frigorificação, no sentido de impedir a multiplicação desse e de outros patógenos ao homem.

Estudos epidemiológicos revelaram que a maior parte das amostras clínicas isoladas induz ao fenômeno de Kanagawa, caracterizado por uma zona de beta-hemólise ao redor do crescimento em meio Ágar Wagatsuma. A literatura indica que apenas 1% das amostras de origem ambiental é Kanagawa positiva. Nesta pesquisa foram determinadas 4 cepas de *V. parahaemolyticus* positivas para a reação de Kanagawa (28,57%). Esta frequência aparentemente alta pode ser explicada pela grande amplitude dos pontos de coleta (19) que constituíram a investigação, bem como pela baixa incidência de isolamento das cepas identificadas (14). Além disso, Silva (1977) isolou 13,33% de cepas Kanagawa positivas oriundas de ostras. Cabe ressaltar que alguns autores (Sarkar et al., 1987) preconizam que cepas Kanagawa negativas não estão totalmente isentas de patogenicidade. Portanto, estudos que privilegiem esclarecimentos sobre a patogenicidade desse microrganismo devem ser incentivados.

Dados epidemiológicos de igual importância referem-se a sorotipagem das cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas. Binta & Nyaga (1982), isolaram os sorotipos O10K52 e O11K40. Em nossa pesquisa, uma das cepas isoladas foi identificada como sorotipo O10K52 e apresentou-se Kanagawa positiva, bem como os sorotipos novos O8K15 e O9K56 e também o conhecido O3K6. Em 1997, o sorotipo O3K6 foi incriminado como responsável por causar surto de gastroenterite na Índia e por isso tem sido citado como um sorotipo emergente (Daniels et al., 2000). Esses dados sugerem uma possível correlação entre as cepas sorotipadas e a reação de Kanagawa, no entanto, afirmações conclusivas somente podem ser efetuadas após associação com casos humanos confirmados (Wong et al., 2000).

No Brasil, a incidência de *Vibrio vulnificus* isolados a partir de infecção humana, segundo dados do LABENT (2003), limitou-se a dois casos em 2001. Entretanto, em nossa investigação, essa espécie foi isolada das amostras de mexilhões numa frequência relativamente alta (7,44%) revelando uma situação preocupante devido aos riscos causados por sua infecção particularmente em crianças, idosos e imunodeprimidos. O efeito da temperatura ambiente sobre as células de *V. vulnificus* é de extrema importância para a viabilidade do germe. Temperaturas situadas na faixa

de 4 a - 20°C são suficientes para minimizar os riscos de sua presença em alimentos marinhos (Powell, 1999).

A análise geral, dos resultados apresentados no presente estudo, revelou a incidência de *Aeromonas media* (37,10%), *A. hydrophila* (15,50%), *A. caviae* (14,80%) e *A. veronii* biótipo *veronii* (11,60%). Esses resultados estão muito próximos dos observados por Neves et al. (1992), assumindo importância em Saúde Pública, tendo em vista seu relevante potencial patogênico para o ser humano.

De acordo com dados do LABENT (2003), no período de 1996 a 2002, foram isoladas 69 cepas de *A. caviae* oriundas de casos humanos, sendo seguida por *A. hydrophila* responsável por 52 casos humanos. Espécies como *A. veronii* biótipo *sobria* e *A. media*, também foram isoladas a partir de infecção humana com 24 e 21 cepas respectivamente. No mesmo período, observou-se o isolamento de 13 cepas de *A. sobria* e 8 de *A. veronii* biótipo *veronii*, a partir de infecção humana. Isto reforça a necessidade de ações que visem a prevenção de casos isolados ou ainda surtos de gastroenterite humana, após consumo de alimentos marinhos contaminados e consumidos, seja sob a forma *in natura*, insuficientemente cozidos ou mesmo congelados (Hanninen et al., 1997).

Aeromonas media representou a espécie mais incidente tanto a partir das amostras de mexilhões *in natura* (12,36%) quanto das pré-cozidas (24,73%). Como observado em investigação semelhante realizada por Rall et al. (1998), tais resultados são relevantes tendo em vista que este microrganismo não costuma ser referido, em nosso meio com a frequência na qual foi isolada nesta investigação, sugerindo que o *habitat* dos mexilhões naquele dado momento constituía uma importante fonte de microrganismos dessa espécie. Alerta-se quanto à necessidade de ampliar o conhecimento sobre esse microrganismo, a fim de elucidar sua real importância para os campos da microbiologia e vigilância sanitária de alimentos (Mattick & Donovan, 1998).

Aeromonas hydrophila apresentou significativo isolamento a partir das amostras *in natura* (10%) e pré-cozidos (5,50%). Considerando que tais microrganismos são capazes de elaborar inúmeros produtos, incluindo toxinas e enzimas, os quais podem se manter nos alimentos mesmo em condição de

refrigeração, os resultados obtidos alertam para a possibilidade de ocorrência de gastroenterite, bem como infecção cutânea em manipuladores de alimentos. As espécies *A. veronii* biótipo *veronii* (7,10%) e *A. caviae* (4,47%) identificadas nesta investigação, a partir de mexilhões *in natura* têm sido isoladas de diferentes fontes humanas, ambientais e alimentares. Portanto, a exposição de crianças, idosos e imunodeprimidos ao risco de infecção deve ser considerada como um problema de saúde pública, o qual necessita de prevenção sanitária e epidemiológica (Nishikawa & Kishi, 1988).

Por outro lado, *Aeromonas sobria* e *A. trota* foram isoladas com menor frequência, tanto a partir das amostras *in natura* quanto pré-cozidas. Mas, a importância desses microrganismos não deve ser desprezada, uma vez que *A. sobria* tem sido reportada como patógeno emergente isolada de fontes humanas e animais, enquanto que *A. trota* está associada a doenças em trutas e mexilhões criados em sistemas de aquicultura como bem observado por Almeida & Nunes (1995).

Aeromonas veronii biótipo *sobria* apresentou a mesma frequência (0,26%) de isolamento a partir das amostras *in natura* e pré-cozidos. Há relatos de isolamento do microrganismo a partir de carne bovina e surtos de diarreia em humanos. A reduzida incidência desta bactéria na presente investigação pode ser um reflexo do *habitat* dos mexilhões estudados. Entretanto, esta espécie é reconhecida juntamente com *A. hydrophila* por sua elevada capacidade de virulência (Carnahan, 1991).

Observamos uma frequência significativa de isolamento de cepas bacterianas não classificáveis, através da metodologia clássica baseada na capacidade bioquímica do microrganismo. Este episódio ocorreu em 7,36% das bactérias isoladas. Deste percentual, 18 cepas de *Aeromonas* spp. foram isoladas dos mexilhões *in natura*, enquanto 10 dos pré-cozidos. Este fato aponta para a dificuldade de classificação, sob o ponto de vista taxonômico, deste gênero cuja definição das espécies ainda encontra-se em fase de estabelecimento pelo Grupo de Trabalho Taxonômico do Comitê Internacional de Sistemática Bacteriológica (Neytsk et al., 2000).

Com relação à sazonalidade dos microrganismos isolados, foi possível observar que algumas espécies tiveram um pico de isolamento no período entre agosto e outubro e outras, como *Plesiomonas shigelloides* apresentou distribuição esporádica por diversos meses do ano. Esses dados sugerem a existência de características sazonais no isolamento de microrganismos dos gêneros *Aeromonas* e *Plesiomonas shigelloides*. No entanto, investigações mais apuradas devem ser realizadas para avaliar com maior segurança esse tipo de comportamento, pois os resultados podem ser úteis tanto para vigilância ambiental e sanitária quanto epidemiológica.

O efeito da temperatura de pré-cozimento dos mexilhões revelou-se em alguns casos efetivo, levando à diminuição de algumas espécies patogênicas: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii* biótipo *veronii* e *A. trota*. Por outro lado, chama atenção, o fato de que algumas espécies (*A. media*, *A. caviae*, *A. jandaei* e *A. schubertii*) obtiveram maior isolamento nas amostras pré-cozidas. Este resultado sugere que há possibilidade de problemas referentes à manutenção do binômio tempo/temperatura de pré-cozimento ou recontaminação do produto, reforçando a importância do pré-cozimento adequado (100° C) na redução da presença de microrganismos nos alimentos de origem marinha.

Capítulo 5

A Vigilância Sanitária de Alimentos no Cultivo de Mexilhões

Pelas razões até aqui apontadas, as doenças veiculadas por alimentos e em particular por moluscos diversos, como os mexilhões, representam um enorme problema para a saúde pública mundial. Nos países mais desenvolvidos, especialmente Estados Unidos e Europa, há uma rede de laboratórios de vigilância alimentar interligados e conectados aos órgãos de vigilância epidemiológica e sanitária, o que permite identificar um surto de origem alimentar com relativa rapidez.

Nos Estados Unidos, esse programa foi denominado Foodborne Diseases Active Surveillance (FoodNet) e é desenvolvido em parceria com órgãos como o CDC (Center for Diseases Control) e FDA (Food and Drug Administration's Center). Paralelamente ao FoodNet foi criado também uma importante rede de informações, coordenadas pelo CDC e pela EPA (Environmental Protection Agency), que formam um sistema de rastreamento de surtos associados a microrganismos veiculados pela água, de abastecimento e recreacional denominado, Waterborne Diseases Surveillance.

Os dados obtidos pelos programas FoodNet e Waterborne Diseases Surveillance formam um sistema nacional integrado de vigilância epidemiológica, com base em indicadores confiáveis e avançados, o que permite a obtenção de uma estimativa mais precisa do número de pessoas que adoecem em decorrência de problemas relacionados ao consumo de alimentos e água contaminados por diferentes patógenos, incluindo os emergentes.

Em 1997, o Programa Ativo de Vigilância de Doenças Veiculadas por Alimentos (FoodNet) confirmou 51 casos de infecção por *Vibrio* em 5 estados americanos que integram o programa de doenças infecciosas emergentes (Tabela 1).

Esse programa é desenvolvido com o apoio e participação de laboratórios, instituições de pesquisa, universidades e profissionais de saúde (Wallace et al., 2000).

Tabela 1- Infecções causadas por patógenos bacterianos, reportados pelo Foodnet site, 1997.

Patógenos	CA	CT	GA	MN	OR	Total
<i>Campylobacter</i>	1036	527	499	1175	737	3974
<i>E. coli O157</i>	19	34	8	199	80	340
<i>Listeria</i>	14	12	20	18	13	77
<i>Salmonella</i>	370	417	470	619	329	2205
<i>Shigella</i>	293	78	586	138	177	1273
<i>Vibrio</i>	31	4	2	2	12	51
<i>Yersinia</i>	35	15	43	31	15	139
Total	1798	1088	1628	2182	1363	8059

CA=Califórnia, CT= Connecticut, GA= Gerorgia, MN= Minnessota

OR= Oregon

Fonte: FoodNet, 1997.

No Brasil, essa rede de informações em vigilância alimentar e epidemiológica encontra-se ainda em processo inicial de desenvolvimento e informatização. Entretanto, a falta de recursos e investimentos em saúde pública tem prejudicado os avanços técnico-científicos nesta área. É importante frisar que um programa de vigilância epidemiológica e sanitária de alimentos serve não apenas para quantificar o número de casos reportados (incidência e prevalência), mas também pode ser de utilidade na identificação de patógenos emergentes, além de determinar os fatores que levam ao aumento dos riscos de ocorrência de doenças.

A implementação de um sistema nacional de investigação sobre surtos ocasionados por microrganismos veiculados por alimentos permitiria identificar novos agentes patogênicos, bem como novos veículos de transmissão. Esse sistema, vinculado de forma integrada aos órgãos de vigilância epidemiológica, sanitária e ambiental, nos diferentes níveis de governo (federal, estadual e municipal), auxiliaria positivamente no desenvolvimento de práticas preventivas e de controle das doenças emergentes.

Entretanto, para alcançar tais resultados é preciso estruturar e capacitar os órgãos públicos, de forma que possam atuar com rapidez. A prevenção de surtos depende diretamente da agilidade na identificação do problema, na sua localização e na identificação precoce das pessoas envolvidas (doentes ou não). É de suma importância que os funcionários responsáveis pela investigação sejam orientados quanto à realização de um histórico e registro dos surtos observados, a fim de indicar qual o alimento incriminado e os riscos de contaminação para os seres humanos.

Um outro aspecto a ser considerado é a necessidade de campanhas preventivas e educativas sobre as gastroenterites, direcionadas tanto para os profissionais da saúde quanto para a população geral, dada a enorme frequência de casos não notificados. As subnotificações ocorrem devido às deficiências dos sistemas de saúde, sobretudo em termos de diagnóstico laboratorial ou em consequência do curso de alguns casos de resolução espontânea e, também, devido à prática de automedicação, particularmente em casos de diarreia.

Deve-se levar em consideração que a maioria dos médicos não realizam a coleta de material clínico para isolamento e identificação dos microrganismos causadores das enfermidades diarreicas. Tais fatores associados acabam contribuindo para dificultar a atuação dos serviços de vigilância sanitária e epidemiológica nesses surtos. Para superá-los é preciso conscientizar a população e os profissionais de saúde quanto aos benefícios que certas mudanças de atitude trariam para melhorar a qualidade de vida da sociedade.

5.1- Globalização e Exposição a Patógenos nos Alimentos

Quando analisamos o problema da ocorrência dos surtos gastrentéricos, não podemos admitir que seja pontual, ou simplesmente referir a falta de recursos econômicos e educacionais como únicos responsáveis pela situação da precária higiene alimentar. É preciso estar atento ao fato de que o processo de globalização, observado no mundo contemporâneo, tem estimulado na área gastronômica, o intercâmbio de diversos alimentos de origem aquática, inclusive com a exportação de comidas típicas, o que vem contribuindo para a disseminação de microrganismos patogênicos por todos os continentes, favorecida é claro pelas precárias condições de vida e saneamento (Altekruse & Swerdlow, 1996).

Sob esse contexto, podemos ainda acrescentar o aumento das viagens internacionais, que favorecem que turistas possam contrair doenças exóticas, através do consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos que não são comuns em seu país de origem. Essa característica pode complicar o diagnóstico e tratamento da doença, sobretudo quando os sintomas aparecem somente após o retorno do indivíduo ao seu país.

As modificações sócio-demográficas que ocorrem tanto nas nações industrializadas, quanto em países em desenvolvimento, aumentam a possibilidade da população suscetível de contrair infecção por alimentos e, conseqüentemente, há um maior impacto para a saúde pública relacionado a essas doenças. Indivíduos imunodeprimidos, idosos, crianças e gestantes são grupos populacionais extremamente vulneráveis a esse tipo de infecção, nos quais em geral se manifestam de forma mais grave, recorrente e persistente (Kaferstein & Abdussalam, 1999).

Contribuem também para a disseminação dos agentes patogênicos veiculados por alimentos, os hábitos de consumo alimentar dos indivíduos. Modernamente, as pessoas têm buscado uma dieta balanceada em termos nutritivos e,

de certa forma, mais natural, favorecendo o consumo de alimentos frescos, o que pode aumentar a exposição a diversos patógenos. Algumas preferências alimentares geram riscos para a saúde humana, como é o caso do consumo de ostras *in natura* pois há, neste caso, risco expressivo de transmissão de microrganismos autóctones marinhos e patógenos entéricos provenientes dos despejos sanitários.

Particularmente, patógenos emergentes transmitidos por pescados e moluscos como *Aeromonas hydrophila* são agentes patogênicos de diarreia grave em indivíduos saudáveis, acometendo em especial, crianças e idosos, após consumo de água e alimentos contaminados. Como observado, as complicações podem ocorrer quando o sistema imune do indivíduo está debilitado e então a infecção se agrava necessitando de internação hospitalar e tratamento com antibióticos.

Considerando o risco de resistência ao antimicrobiano usado, o paciente pode ter sérias complicações, podendo ter inclusive, sua vida em risco, pelo simples consumo de alimentos marinhos crus. Essas observações são feitas principalmente, para o microrganismo *Vibrio vulnificus* que é mais perigoso, pois pode causar septicemia e resultar em morte de pacientes portadores de doenças hepáticas ou imunodeprimidos.

Aspectos como modificações nos padrões de consumo de alimentos podem facilitar a emergência de patógenos por eles veiculados. As principais causas de alteração nesses padrões são a industrialização de alimentos e o advento dos restaurantes “fast-food” e “self-service”. A prevenção e controle de doenças alimentares dependem dos ingredientes usados no alimento, da higiene dos manipuladores durante o processamento e preparo do alimento e da forma como este será consumido pelo ser humano. Os agentes patogênicos podem ser introduzidos na cadeia de processamento, desde a obtenção da matéria prima até a chegada do alimento à mesa do consumidor.

O panorama é tão grave que a Organização Mundial de Saúde (OMS), considera as doenças veiculadas por alimentos como um dos problemas sanitários mais globalizados na atualidade. Uma das preocupações dos órgãos de vigilância internacionais está relacionado à “diarreia dos viajantes” que acomete indivíduos principalmente quando em visita a países em desenvolvimento na América Latina,

África e Ásia. Os riscos primários para essas pessoas estão associados ao consumo de alimentos ou água contaminados por material fecal. Alimentos crus, insuficientemente cozidos ou que sofreram contaminação cruzada devido a constante manipulação podem ser fontes de infecção se ingeridos pelo homem (Schludt, 2001).

Outros riscos estão relacionados ao gelo fabricado com água de qualidade duvidosa e aos vendedores ambulantes que não possuem infra-estrutura para ofertar um alimento fresco e refrigerado. Os alimentos não cozidos armazenados à temperatura ambiente por 4 horas (ou mais), ou cozidos e refrigerados à temperatura superior à 4°C, também constituem fatores de risco na aquisição de gastroenterites veiculadas por alimentos. As principais recomendações para os viajantes são beber apenas água mineral, ingerir alimentos cozidos, evitar alimentos crus, em especial as saladas e frutos do mar, lavar bem as frutas e consumi-las sem casca (Armstrong et al., 1996).

De um modo geral, deve-se recomendar como medida de saúde pública a restrição imediata do consumo e comércio de mexilhões e outros moluscos bivalves quando houver registros de Doenças de Transmissão Alimentar, causados pela ingestão dos mesmos, até que se obtenha o resultado das análises microbiológicas da água e do alimento suspeito.

Medidas de controle devem ser instituídas através do tratamento de esgotos, resíduos industriais, monitoramento da qualidade do ecossistema marinho com proibição do consumo e comércio de seus produtos, quando houver confirmação de contaminação por microrganismos patogênicos e/ou metais pesados em níveis acima dos toleráveis. O cultivo de mexilhões deve ser feito apenas em áreas isentas de quaisquer contaminações, e medidas higiênicas rigorosas na manipulação e preparação dos alimentos (cozimento em temperatura e tempo adequados seguido de resfriamento, se o consumo não for imediato) devem ser tomadas como medidas preventivas.

Procedimentos no campo tecnológico de alimentos têm contribuído de forma significativa para a redução de surtos e complicações relacionadas ao consumo de alimentos contaminados. Esses procedimentos incluem, entre outras medidas, a sanitização dos produtos de origem animal, a irradiação de alimentos e o controle tecnológico através do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de

Controle), descrito no capítulo 2, que realiza uma análise integrada dos perigos e pontos críticos de controle, durante todas as fases do processamento dos alimentos permitindo prevenir a contaminação do alimento e identificando os problemas antes que eles ocorram. Tais medidas tecnológicas devem ser adotadas para minimizar os riscos de contaminação dos alimentos trazendo benefícios consideráveis para a saúde pública.

5.2- O aumento da resistência antimicrobiana de patógenos veiculados por alimentos de origem aquática

O enfrentamento dos problemas gerados pelas doenças ditas emergentes ou reemergentes requer esforços integrados das autoridades competentes, de forma abrangente e amplo alcance, articulando ações no campo da saúde pública com medidas de saneamento e preservação ambiental, sendo necessária a participação de equipes multidisciplinares e ação intersetorial. Isto porque no processamento de alimentos, embora importantes, as melhorias tecnológicas não serão suficientes para minimizar os riscos de doenças (Schlundt, 2001).

Um problema importante que merece especial destaque é a resistência dos patógenos às drogas antimicrobianas usadas na clínica humana. Esta resistência vem sendo causada por diversos fatores, principalmente pelo lançamento de esgoto doméstico e industrial, inclusive da área farmacêutica, diretamente no ecossistema aquático, pela deposição de quimioterápicos no lixo comum e também pelo uso indiscriminado de antibióticos, seja pela administração de doses subterapêuticas ou sua utilização como promotores de crescimento em animais de produção. Na década de 70, a maioria dos países europeus banuiu o uso de drogas como a penicilina e a tetraciclina como promotores de crescimento de animais de produção (gado de corte e outros), mas os Estados Unidos e muitos países da América Latina não procederam da mesma maneira o que trouxe inúmeros problemas gerados pela resistência bacteriana a essas drogas (OMS, 2001).

Um estudo realizado pelo National Research Council Committee on Drug Use in Food Animals (1999), concluiu que o uso de antibióticos na terapêutica animal ou como promotores de crescimento elevam as chances de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e sua transferência a patógenos que causam doenças no homem. Através desse estudo, foi possível traçar uma correlação entre a resistência antimicrobiana e o uso de antibióticos na ração animal. As evidências dos riscos para a

saúde humana relacionada ao uso de antibióticos na ração animal são realizados através de estudos epidemiológicos diretos (estudos prospectivos), evidência temporal (emergência de cepas resistentes em animais antes do surgimento dessas cepas resistentes em seres humanos) e evidências circunstanciais, que liguem a resistência antimicrobiana ao uso da droga, na cadeia de produção do alimento (Couper, 1997).

5.3- Conseqüências da exposição a patógenos resistentes a antimicrobianos para a saúde humana:

O processo de resistência aos agentes antimicrobianos associado à característica de patogenicidade dos microrganismos é um fenômeno extremamente complexo. Em linhas gerais, a microbiota comensal do intestino e das superfícies epiteliais normalmente exerce um efeito protetor contra a colonização e infecção por microrganismos exógenos. Contudo, o tratamento com agentes antimicrobianos resulta na redução dessa microbiota, de forma que os antibióticos usados na terapêutica podem, em determinadas circunstâncias, aumentar os riscos de infecções durante o período de tratamento ou por alguns dias ou semanas após, até que a microbiota normal seja reconstituída. Esse fenômeno pode aumentar o número de pessoas infectadas (Thomasz, 1994).

Um segundo mecanismo potencial pelo qual a resistência a antibióticos pode aumentar a frequência das doenças humanas ocorre devido às modificações e interações genéticas de fatores de resistência ou virulência dos microrganismos. O aumento da virulência do patógeno torna as infecções mais graves e prolongadas. A resistência dos microrganismos a agentes antimicrobianos usados na terapêutica causa inicialmente a ineficácia do tratamento, gerando a necessidade do uso de drogas eventualmente mais tóxicas e caras (Smith & Coast, 1998).

A frequência com a qual os microrganismos resistentes a antimicrobianos têm sido isolados de pacientes hospitalizados, tem alarmado epidemiologistas, microbiologistas e médicos. Para muitos desses casos contribui o consumo de alimentos como pescados e mexilhões contaminados com patógenos resistentes a diversos antimicrobianos. Esses microrganismos têm sua relevância aumentada quando acometem pacientes com defesas imunológicas baixas, e submetidos a novas instrumentações e procedimentos hospitalares. Falhas nos processos de controle das fontes de infecção e inabilidade de alguns métodos

laboratoriais na identificação de novos mecanismos de resistência contribuem para a disseminação de microrganismos resistentes (Levy, 1987).

Cepas que eram suscetíveis a praticamente todos os agentes antimicrobianos durante décadas, atualmente têm se mostrado resistentes não somente aos usados na terapêutica clássica, mas também às novas drogas. Alguns microrganismos desenvolveram resistência a múltiplas drogas, sendo denominados microrganismos multirresistentes. É preciso que os profissionais de saúde se familiarizem com o problema da resistência antimicrobiana, para que ela possa ser prevenida ou minimizada. É importante, também, propor o uso correto dos agentes antimicrobianos, ampliando os conhecimentos sobre todos os eventuais efeitos adversos decorrentes do seu uso.

A resistência antimicrobiana também pode estar relacionada ao aumento do número e variedade de patógenos nos animais e no ambiente. Esse fenômeno causa o aumento de microrganismos resistentes oriundos de produtos de origem animal, bem como na cadeia alimentar criando um reservatório de patógenos resistentes a drogas que pode ser transferido para os seres humanos. Paralelamente, pode ocorrer também a aquisição de resistência por microrganismos não patogênicos, os quais podem transferir essa característica para outros microrganismos ou para o homem, através da cadeia alimentar ou do ambiente (Dupont & Steele, 1987).

Nesta investigação, foi possível observar uma série de bactérias, amplamente distribuídas no ambiente aquático, resistentes a antibióticos. Especula-se que isso seja resultante do aumento e do uso indiscriminado dos antibióticos na medicina veterinária e zootecnia. Além disso, as águas dos rios são um dos principais reservatórios desses poluentes, pois recebem o esgoto de efluentes domésticos. Como os rios são uma das maiores fontes de água usadas direta ou indiretamente para o consumo humano e animal, o consumo de água e alimentos provenientes de ecossistemas aquáticos contaminados pode contribuir para a manutenção e disseminação da resistência antimicrobiana entre as populações humanas e animais.

Demonstrar simplesmente que uma gama enorme de microrganismos patogênicos ou comensais isolados de alimentos podem causar gastroenterites e, paralelamente, possuir resistência a agentes antimicrobianos não é suficiente para

proteger a saúde humana. É necessário demonstrar de que maneira essas resistências microbianas estão tornando as infecções humanas mais incidentes ou mais graves e difíceis de serem tratadas, tornando o tratamento mais oneroso. Para isso, são necessários estudos epidemiológicos que tracem essas associações, de forma relativamente clara e precisa (Howard et al., 2003).

Adicionalmente, investigações sobre a resistência antimicrobiana originada no *habitat* aquático devem ser realizadas e aprimoradas para que as medidas de controle possam ser efetuadas com êxito. Sugerimos a utilização de moluscos bivalves como indicadores da qualidade ambiental, devido principalmente às suas características de filtradores, permitindo que concentrem microrganismos e substâncias químicas de interesse para a ciência e tecnologia atuais (Bryan, 2002; Tauxe, 2002).

Apesar do risco potencial de microrganismos das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae para a saúde pública, a legislação brasileira prevê apenas normas para a ausência de *V. cholerae* e *Salmonella* spp., limitando a presença de *V. parahaemolyticus* em 10^5 UFC/g de alimento de origem marinha pronto para ser consumido. Entretanto, não há em nossa legislação nenhum parâmetro que regule a presença de *V. vulnificus* em alimentos de origem marinha determinando condições de ausência aceitáveis, o que constitui um fato de extrema gravidade pois a dose infectante desse patógeno situa-se abaixo de 100 UFC/ grama de alimento ingerido. A literatura internacional com relação a legislação desse patógeno prevê a ausência de *V. vulnificus* em alimentos e um limite aceitável de *V. parahaemolyticus* entre 10^2 - 10^3 UFC/g de alimento (European Commission Health & Consumer Protection Directorate General, 2001).

Em países com sistemas de vigilância epidemiológica e sanitária desenvolvidos nessa área, além da questão do aprimoramento do sistema legal neste campo, existe ainda a preocupação em alertar a população sobre os riscos do consumo de alimentos marinhos crus ou sem cocção, especialmente os pacientes vulneráveis como imunodeprimidos, idosos gestantes e crianças. Esse alerta é feito através de diversos procedimentos informativos e educativos ao nível local a partir de coletas amostrais permanentes para verificação nas áreas de pesca e restaurantes consumidores. O monitoramento do ambiente aquático é, portanto, constante e

rigoroso e se estende a todos os agentes patogênicos de importância para a saúde pública procurando-se alertar também os profissionais de saúde.

Chama atenção o fato de que no País, as autoridades competentes ainda não deram, nem no plano legal, nem no que diz respeito à promoção da saúde, a devida importância aos novos patógenos que estão sendo veiculados através dos alimentos elevando os riscos de infecção humana. Para modificar essa situação, diversas medidas institucionais e legislativas precisam ser tomadas no âmbito da vigilância sanitária e epidemiológica e também no campo de promoção da saúde, em especial aquelas relacionadas à conscientização e educação da população em todos os níveis sociais. Além disso, a formação nas comunidades de equipes multidisciplinares de saúde como parte de um plano efetivo de combate às gastroenterites veiculadas por alimentos, constitui uma das mudanças mais importantes e necessárias em nossa sociedade. Através da elevação da consciência sanitária, tais estratégias permitiriam transformar o panorama da saúde pública, melhorando a qualidade de vida da população.

6- Considerações Finais e Conclusões:

Centraremos nossas considerações finais nas três questões básicas que permearam a nossa tese: segurança alimentar dos mexilhões estudados; aspectos tecnológicos nas diferentes etapas do processamento e alternativas para a exploração e reaproveitamento de resíduos desses mexilhões; e finalmente a questão ambiental envolvendo as condições do ecossistema aquático da Baía de Guanabara, onde esses mexilhões foram coletados. Foram discutidas também questões relacionadas ao envolvimento da comunidade da EECM (Estação Experimental de Cultivo de Mexilhões)/ALMARJ (Associação Livre de Maricultores de Jurujuba) e seus principais parceiros institucionais neste processo.

Quanto à segurança alimentar, a presente investigação centrou-se na qualidade microbiológica dos mexilhões *in natura* e pré-cozidos extraídos e processados pela referida estação experimental.

Na investigação microbiológica dos mexilhões estudados, realizamos a análise de *Salmonella* spp., um dos principais parâmetros adotados pela Resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 12/01) para assegurar a qualidade higiênico-sanitária de produtos de origem animal. Não encontramos *Salmonella* spp. nem nas amostras de mexilhões *in natura* nem naquelas provenientes do processamento final (mexilhões pré-cozidos). Segundo esse critério, as amostras de mexilhões, por nós avaliadas, encontravam-se em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, sendo consideradas aptas para o consumo humano.

Contudo, apesar de não termos encontrado *Salmonella* spp. nas amostras de mexilhões *in natura* e pré-cozidas estudadas, isolamos e identificamos nestas amostras diversas espécies de patógenos emergentes (*Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*) e outros microrganismos das famílias Vibrionaceae (*Vibrio cholerae* não O1, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*,

V. fluvialis, *V. cincinnatiensis*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. furnisii*, *V. anguillarum*, *V. aestuarinus* e *V. harveyi*) e Aeromonadaceae (*Aeromonas media*, *A. caviae*, *A. veronii* biótipo *veronii*, *A. sobria*, *A. trota*, *A. veronii* biótipo *sobria*, *A. schubertii* e *A. jandaei*) com importantes implicações para a saúde pública pelos riscos de gastroenterites e infecções extra-intestinais causadas por estes agentes patogênicos em seres humanos. Como já foi mostrado, estas espécies encontravam-se largamente disseminadas nos pontos de coleta de mexilhões da Baía de Guanabara explorados pela EECM/ALMARJ. Isto revela um quadro altamente preocupante para a saúde pública, pois embora estes patógenos possam estar presentes na natureza em águas não poluídas, a diminuição de oxigênio causada pela poluição marinha cria condições bastante favoráveis para a rápida proliferação desses agentes patogênicos.

Dentre as espécies isoladas neste estudo, aquelas de maior importância para a saúde pública, dada sua alta patogenicidade para populações humanas, são *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae* não O1, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

Identificamos ainda espécies que, embora de baixa patogenicidade para humanos são de grande importância econômica para a aquicultura por sua alta patogenicidade para pescados e moluscos, como *Vibrio anguillarum*, *V. aestuarinus*, *V. harveyi*, *Aeromonas media* e *A. trota*.

A espécie *Aeromonas hydrophila* foi identificada em 14 pontos de coleta da Baía de Guanabara (Praia de Icaraí, Praia da Boa Viagem, Costão de Niterói, Praia de Botafogo, Praia da Urca, Ilha do Governador, Aeroporto Santos Dumont, Praia do Flamengo, Fortaleza de Santa Cruz, Ilha das Mães, Ilhas Cagarras, Ilha das Palmeiras, Ilha Redonda e Ilha Comprida). Os resultados mostram que essa espécie encontrava-se amplamente distribuída no ecossistema aquático dos mexilhões estudados. Considerando seu importante significado clínico-epidemiológico e sua capacidade de causar doenças oportunistas ou quadros diarreicos graves, após o consumo de mariscos e pescado contaminados ingeridos sob a forma *in natura* ou insuficientemente cozidos, a *A. hydrophila* representa um patógeno emergente de extrema importância para vigilância sanitária de alimentos e saúde pública.

A espécie *Vibrio cholerae* não O1, responsável por causar gastroenterite muito semelhante aquela ocasionada pelo agente da cólera, foi isolado a partir de 11 pontos amostrais da Baía de Guanabara (Ilha da Feiticeira, Ilha do Governador, Praia de Icaraí, Aeroporto Santos Dumont, Praia da Boa Viagem, Praia de Botafogo, Ilha das Mães, Ilha dos Pais, Ilhas Cagarras, Ilha Redonda e Ilha das Palmeiras). O principal veículo de transmissão deste patógeno é a ingestão de alimentos marinhos contaminados, mal-cozidos ou recontaminados após o preparo em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, revelando sua importância para a vigilância sanitária de alimentos oriundos do ecossistema marinho, em especial os mexilhões estudados a partir destes pontos amostrais de coleta.

A espécie *Vibrio alginolyticus* foi isolada a partir de sete pontos amostrais de coleta da Baía de Guanabara (Praia da Boa Viagem, Ilha do Governador, Praia de Icaraí, Ilha dos Cardos, Praia de Botafogo, Praia da Urca e Ilha das Palmeiras). Este patógeno possui importância relacionada ao processamento tecnológico dos mexilhões, uma vez que as valvas destes moluscos podem ocasionar ferimentos durante sua manipulação. Os ferimentos causados podem ser infectados por bactérias dessa espécie, causando uma grave infecção local, o que obriga a imediata retirada do manipulador de alimento da linha de produção até a completa cicatrização do ferimento, para assegurar a qualidade do alimento.

A espécie *Plesiomonas shigelloides* foi isolada a partir de cinco pontos amostrais da Baía de Guanabara (Ilha dos Cargos, Praia da Boa Viagem, Costão de Niterói, Praia de Icaraí e Ilha do Meio). Embora sua frequência de isolamento nesse estudo possa ser considerada baixa tanto em mexilhões *in natura* (0,52%) quanto nos pré-cozidos (1,57%), sua relevância epidemiológica não deve ser desprezada, uma vez que existe a possibilidade de associação a doenças gastrentéricas resultantes da contaminação de alimentos marinhos, além da possibilidade de transmissão através do contato com diversos animais domésticos como cães, gatos, peixes, tartarugas e lagartos. Esse tipo de transmissão torna as crianças, por seu frequente contato com animais domésticos, um grupo muito vulnerável às infecções causadas por este patógeno emergente, exigindo além de um controle rigoroso da higiene alimentar, orientação adequada quanto aos hábitos higiênicos da população que convive com animais domésticos.

Neste estudo, as espécies de *Vibrio parahaemolyticus* foram isoladas a partir de seis pontos amostrais de coleta da região da Baía de Guanabara (Praia de Icaraí, Ilha dos Cargos, Aeroporto Santos Dumont, Praia da Boa Viagem, Praia do Flamengo, Costão de Niterói). Algumas cepas deste patógeno (28,57%) apresentaram perfil de patogenicidade demonstradas através da reação de Kanagawa. Considerando-se que essas cepas podem ser patogênicas aos seres humanos, causando gastroenterites após o consumo de ostras, mexilhões e pescado *in natura* ou submetidos a processo insuficiente de cozimento ou ainda através de contaminação cruzada de outros alimentos preparados inadequadamente, o monitoramento da sua presença em alimentos marinhos é fundamental para a garantia da qualidade microbiológica dos mesmos e conseqüentemente para a prevenção de Doenças de Transmissão Alimentar por eles causadas.

A espécie *Vibrio fluvialis* isolada de cinco pontos amostrais de coleta (Ilha dos Cargos, Praia de Botafogo, Praia da Boa Viagem e Aeroporto Santos Dumont) apresentou uma frequência de isolamento nos mexilhões *in natura* e pré-cozidos que pode ser considerada significativa (5,31%), dada a sua capacidade em ocasionar surtos esporádicos de gastroenterite após consumo de moluscos consumidos *in natura*, em particular em grupos populacionais suscetíveis como crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos, o que aponta para sua relevância epidemiológica e importância para a vigilância sanitária de alimentos.

Sob o aspecto clínico e epidemiológico, a espécie *Vibrio vulnificus* isolada a partir de cinco pontos amostrais de coleta da Baía de Guanabara (Praia de Boa Viagem, Ilha dos Cargos, Aeroporto Santos Dumont, Ilha do Meio e Ilha das Palmeiras) pode ser considerada a mais perigosa dentre todas as isoladas neste estudo. Esse perigo está associado ao risco de ocorrência de casos fatais em apenas 24 horas após a ingestão de alimentos marinhos contaminados e não cozidos. Indivíduos portadores de doenças crônico-degenerativas e grupos populacionais como crianças, grávidas, idosos e imunodeprimidos são mais suscetíveis a desenvolver quadro de septicemia e morte.

É verdade que, segundo os padrões estabelecidos na literatura, boa parte destes patógenos emergentes são vulneráveis às condições de congelamento adotadas pela ALMARJ/EECM. No entanto, é importante ressaltar que, em nosso estudo,

alguns patógenos (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus* e *V. parahaemolyticus*) que persistiram à temperatura de cozimento, podem resistir às temperaturas de congelamento.

Os dados identificados mostram que tanto os mexilhões *in natura* quanto os pré-cozidos analisados estavam contaminados por patógenos emergentes. Mesmo que, como costuma ocorrer com frequência na etapa do processamento, os mexilhões pré-cozidos sejam submetidos ao processo de congelamento, como se recomenda, existem estudos que demonstram que esses microrganismos podem ficar sob um estado de células viáveis mas não cultiváveis, o que significa que nesse estado podem não ser detectados pelos métodos tradicionais de avaliação microbiológica, uma vez que estão sob condições adversas no alimento congelado. Assim, quando este alimento for submetido a processos indevidos de descongelamento como, por exemplo, descongelamento à temperatura ambiente ou imersão em água fria ou quente, há grande possibilidade desses microrganismos remanescentes se multiplicarem. Dependendo das condições higiênico-sanitárias envolvidas no preparo do alimento, os consumidores estarão expostos aos riscos de toxinfecção alimentar.

Portanto, a tecnologia de processamento observada em nosso estudo merece algumas considerações. A ALMARJ/EECM vem adotando, conforme a legislação brasileira em vigor, tecnologia de processamento de mexilhões segundo as seguintes etapas: cozimento a 100° C e congelamento de – 15° a – 20° C. Embora correta em termos legais, existem questionamentos que precisam ser aprofundados no sentido de orientar o consumidor quanto à necessidade do correto descongelamento do produto à temperatura de refrigeração e preparo requerendo um aquecimento de no mínimo 100° C por se tratar de um alimento pré-cozido. Por desinformação, o consumidor desavisado poderia entender que o alimento pré-cozido irá requerer apenas um rápido aquecimento, o que poderá resultar na rápida proliferação dos agentes patogênicos, provocando sérias Doenças de Transmissão Alimentar e outros agravos à saúde. Recomendações, quanto ao procedimento correto de aquecimento em água fervente, devem obrigatoriamente constar no rótulo de embalagem do produto alertando os consumidores e prevenindo os riscos de Doenças de Transmissão Alimentar.

Outro aspecto de grande importância, identificado em nosso estudo, diz respeito à resistência antimicrobiana. O quadro de patogenicidade aqui identificado se mostra ainda mais grave quando se considera o perfil de resistência dos microrganismos estudados aos diversos agentes antimicrobianos avaliados, muitos dos quais ainda são utilizados na terapêutica humana ou consumidos por auto-medicação.

Com relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, a espécie *Aeromonas hydrophila* apresentou resistência para ampicilina (AMP) e multirresistência à nitrofurantoína-ampicilina (F-AMP) e sulfametoxazol-trimetoprim-ampicilina (SXT-AMP). Porém, algumas cepas deste microrganismo apresentaram perfil de sensibilidade ao antimicrobiano ampicilina (38,46%). O achado justifica o referido na literatura nacional e internacional sobre o tema, ou seja, a não recomendação dessa droga para tratamento de gastroenterites e outras infecções causadas por este patógeno e nem mesmo em aquicultura, devido ao elevado índice de resistência da *A. hydrophila* à ampicilina que, nesse estudo, atingiu 61,53% das cepas avaliadas.

No que se refere às cepas de *Vibrio cholerae* não O1 isoladas neste estudo e avaliadas quanto à resistência aos antimicrobianos, essas revelaram-se resistentes ampicilina (AMP) e multirresistentes à pefloxacina-ampicilina (PEF-AMP), tetraciclina-ampicilina (TE-AMP) e nitrofurantoína-pefloxacina (F-PEF).

As espécies *Vibrio fluvialis* e *V. parahaemolyticus* apresentaram perfil de resistência ao antibiótico ampicilina (AMP). Por outro lado, o patógeno *V. vulnificus* apresentou um perfil de resistência semelhante ao *V. parahaemolyticus* quanto à resistência ao antimicrobiano ampicilina (AMP) diferenciando-se pela resistência à nitrofurantoína (F).

Tendo em vista estes resultados, serão necessários, além de políticas voltadas à despoluição da Baía de Guanabara reduzindo as condições que favorecem a rápida proliferação desses patógenos nos pescados e moluscos, criar procedimentos para evitar o consumo pela população de alimentos contendo microrganismos resistentes à diversos antibióticos, que poderão dificultar estratégias terapêuticas de controle de futuras infecções. Medidas urgentes para o controle da resistência dos antimicrobianos incluem:

1. conscientização da população, através de campanhas educacionais que minimizem a prática de automedicação e descarte de medicamentos no lixo doméstico e hospitalar que acabam sendo lançados na rede de esgotos e posteriormente no ecossistema aquático;
2. controle efetivo dos despejos industriais e domésticos contendo traços de antibióticos para evitar a contaminação do ambiente;
3. farmacovigilância ativa que fiscalize o uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais de produção consumidos pela população;
4. controle da resistência antimicrobiana no ambiente hospitalar e também na tecnologia de alimentos.

O isolamento desses microrganismos potencialmente patogênicos para os seres humanos e seu alarmante perfil de resistência aos antimicrobianos, apontam para a necessidade de estudos adicionais referentes a procedimentos integrados de vigilância sanitária e epidemiológica. A presença desses microrganismos em alimentos marinhos representa um importante veículo de transmissão de gastroenterites e infecções extra-intestinais, em especial para pessoas mais suscetíveis como crianças, gestantes, idosos e pacientes imunodeprimidos.

Na literatura internacional sobre o tema, estudos relacionados à incidência e prevalência das Doenças de Transmissão Alimentar causados por microrganismos das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae, objeto de nossa investigação, revelam que esses patógenos vêm acometendo populações humanas numa frequência bastante significativa em diversos países.

Como aponta Heymann (2002), estima-se que em países industrializados, as doenças devidas à contaminação microbiológica dos alimentos correspondam a cerca de 30% da população. De acordo com este autor, a epidemia de cólera no Peru, em 1991, custou 770 milhões de dólares, com elevadas perdas econômicas e sociais. Custos e perdas desta natureza podem afetar duramente as atividades econômicas essenciais, como o turismo e a exportação de alimentos. Ainda segundo este autor, estima-se em 2,1 milhões o número total de mortes no mundo causadas por doenças infecciosas de origem alimentar e de transmissão hídrica nos

países em desenvolvimento, como o Brasil, e a população mais afetada são recém-nascidos e crianças.

Ainda em escala internacional a FAO (Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas) e a OMS (Organização Mundial de Saúde) vêm realizando iniciativas para consolidar estratégias colaborativas entre os países na avaliação dos riscos microbiológicos nos alimentos, o que certamente contribuirá para a definição de parâmetros mais precisos e para a cooperação internacional neste campo, examinando as associações entre alimentos e agentes patogênicos através da consulta a *experts*.

Em nosso País, as estatísticas neste campo ainda são precárias, mostrando que os dados nacionais referentes às doenças causadas por estes patógenos necessitam de urgente aprimoramento e melhor avaliação por parte das autoridades sanitárias, para que seja possível a implementação de medidas preventivas realmente efetivas. Portanto, iniciativas como a criação de uma **Rede Nacional de Vigilância Sanitária Alimentar de Produtos Pesqueiros e Moluscos** poderia certamente contribuir para modificar a situação atual das doenças emergentes transmitidas por estes alimentos que ameaçam a saúde pública nacional.

Essa rede de informações deverá estar voltada, não apenas para o exame da presença dos patógenos nos moluscos, mas sobretudo, numa perspectiva integrada da vigilância sanitária e epidemiológica, para a saúde dos consumidores, sejam eles portadores assintomáticos destes patógenos em suas fezes ou apresentando quadros diarreicos. Além disso, deverá integrar também, todas as intuições universitárias, de pesquisa e saúde no âmbito do SUS (Sistema Único de Saúde).

Esse sistema integrado de vigilância epidemiológica e sanitária articularia redes diversas orientadas para a segurança alimentar de pescados e moluscos: de um lado, redes de pesquisa voltadas à identificação de patógenos, emergentes ou não, presentes nesses alimentos, e ao estudo da resistência antimicrobiana desses patógenos; de outro, redes voltadas ao monitoramento amostral das condições de saúde dos consumidores e dos profissionais que manipulam esses pescados e mexilhões nas diversas etapas do processo de coleta, extração, processamento, produção e comercialização.

Particularmente, com relação aos estudos sobre os patógenos emergentes, isolados e identificados em nosso meio, essa rede nacional de vigilância alimentar poderá fornecer valiosos conhecimentos para a promoção do intercâmbio entre a vigilância epidemiológica e sanitária, permitindo monitorar aspectos clínicos, ambientais e alimentares relacionados à patogenicidade e à resistência antimicrobiana entre outros aspectos. Mediante ações integradas, os surtos gastrointestinais, eventuais ou epidêmicos, poderão ser prontamente circunscritos, de forma a impedir uma eclosão de casos, prevenindo complicações em pacientes suscetíveis o que, sem dúvida, auxiliará na prevenção da introdução de novas doenças no campo da saúde pública. Essa pode ser, no futuro, uma poderosa arma na defesa contra doenças endêmicas e epidêmicas veiculadas por alimentos.

É verdade que muitas mudanças deverão ser realizadas para que a implementação de uma rede como esta seja realmente viável e transformadora do quadro atual da vigilância alimentar em nosso País. Algumas mudanças se referem aos aspectos legais e institucionais, como por exemplo a revisão e atualização do controle da qualidade microbiológica de alimentos marinhos, contemplando os patógenos emergentes.

Dada a elevada patogenicidade de algumas espécies como o *Vibrio vulnificus* e sua capacidade de causar septicemia seguida de morte em pessoas suscetíveis, após consumo de produtos oriundos do mar sob a forma *in natura* ou insuficientemente cozidos, as autoridades sanitárias, juntamente com as instituições de pesquisa, deveriam discutir no plano legal, os parâmetros mais adequados quanto à presença desse microrganismo em alimentos. Esses novos dispositivos legais deveriam, a exemplo do que ocorre com a *Salmonella* spp., impedir que alimentos contaminados com *V. vulnificus* sejam liberados para consumo humano. Tais medidas, de caráter preventivo, certamente contribuirão para minimizar, em nosso País, casos fatais que podem ser causados por esse patógeno, sobretudo em pessoas debilitadas.

Esta rede, que precisa urgentemente ser estruturada e consolidada em nosso País, exigirá importante esforço governamental nas diferentes esferas de atuação (federal, estadual e municipal), para constituir sistema de vigilância em saúde capaz de

integrar a vigilância epidemiológica e sanitária, apoiadas por redes cooperativas de pesquisa.

Finalmente, em apoio a esta rede nacional de vigilância alimentar destacamos a urgência de definição de metodologias que assegurem campanhas educativas capazes de prevenir as doenças bacterianas veiculadas por patógenos emergentes nos alimentos. Este esforço orientado para estratégias de promoção da saúde com efetivo envolvimento das comunidades locais, certamente contribuirá para a consolidação de uma consciência sanitária (Berlinguer, 1979) e ambiental na sociedade brasileira. Isto possibilitará a conquista em nosso País de um ambiente de melhor qualidade, através da adequada proteção dos recursos naturais, da água e dos alimentos contribuindo para o desenvolvimento sustentável da economia brasileira, com produtos competitivos no mercado nacional e internacional.

Quanto à questão tecnológica envolvendo alternativas mais racionais para a exploração e reaproveitamento de resíduos dos mexilhões *in natura* e o envolvimento da comunidade da EECM/ALMARJ e seus principais parceiros institucionais, percebemos que importantes melhorias foram recentemente implantadas. As diversas iniciativas locais que estimularam aquela comunidade de maricultores e seus familiares a repensar suas condições de vida, trabalho e ambiente, acabaram resultando em importantes modificações sociais e organizacionais.

A EECM/ALMARJ possui um plano de modernização e manutenção de suas instalações, que criou condições para que ao longo do período de 2000-2003, ocorresse o aumento do número de manipuladores de alimentos. Hoje, a EECM conta com 38 profissionais e o número de famílias associadas ao projeto “Mexilhão Rio” contempla no momento 120 famílias.

Após a conclusão de nosso estudo de campo, observamos que a parceria da EECM/ALMARJ com as instituições referidas no Capítulo 1 desta tese foi bastante fortalecida com melhoria da infra-estrutura e aquisição de novos equipamentos, facilitando a atividade pesqueira e a comercialização. Estas parcerias institucionais proporcionaram melhorias como a aquisição, com recursos próprios, de dois caminhões com capacidade para transportar 4,5 toneladas de pescado, agilizando a comercialização. Além dessa importante aquisição, em 2001, a Fundação Banco do

Brasil fez a doação de uma embarcação com 11 metros de comprimento. No ano seguinte, a Coppe-UFRJ doou uma embarcação de 7 metros de comprimento para os estudos de gestão ambiental e cultivo e extração de mexilhões, o que favoreceu a ampliação da área de atuação dos maricultores de Jurujuba.

No que se refere especificamente à tecnologia de processamento, estas parcerias também contribuíram para a aquisição de um equipamento transportador helicoidal cozinhador contínuo que cozinha os mexilhões, ainda com as valvas, a temperatura de 100° C e, em seguida, transporta-os diretamente para a sala de desconchamento. Isto permitiu à EECM/ALMARJ elevar a produção para uma média mensal de 18 toneladas de carne de mexilhão. Está prevista também a compra de novas mesas de aço inoxidável com sistema de lavagem dos mexilhões em água corrente, o que facilitará o processo de desconchamento, tornando-o mais ágil e higiênico.

Com o objetivo de melhorar a qualidade dos mexilhões processados foi incluída no processo tecnológico a etapa de banho de imersão dos mexilhões em ácido láctico, após devidamente desconchados. O ácido láctico é um aditivo amplamente utilizado em tecnologia de alimentos com o objetivo de reduzir o pH do produto alimentício e com a vantagem de ser uma substância atóxica, considerada um sanitizante natural com alto poder antimicrobiano (Dikson & Anderson, 1992).

No momento, a EECM está se adequando às exigências da legislação brasileira, que dispõe sobre a implementação do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) em todas as indústrias de alimentos no País (Portaria 1428/1993). Ações adequadas nas diferentes etapas dos processos de extração, processamento produtivo, comercialização e consumo, baseados no sistema APPCC, aprimoram consideravelmente a indústria de alimentos, com reflexos importantes na melhoria da qualidade de vida e saúde da população. Dessa maneira, seria fundamental realizar esforços para assegurar a definitiva implementação desse sistema na indústria de pescado e moluscos no País.

Finalmente, quanto à questão ambiental, observamos a necessidade urgente de criação de instrumentos legais e institucionais que assegurem finalmente o início da despoluição da Baía de Guanabara, o que possibilitará de um lado, evitar as

condições que favoreçam a rápida proliferação dos agentes patogênicos aqui identificados e sua resistência antimicrobiana e, de outro, com base nos conceitos de preservação ambiental e sustentabilidade, estimular práticas de cultivo experimental de pescados e mexilhões, como a pretendida pela EECM.

O projeto “Mexilhão Rio” encontra-se na fase de implantação das sementes de mexilhões e a primeira produção é esperada para daqui a 6 ou 8 meses. Esta etapa do projeto está sendo coordenada pela Coppe-UFRJ e financiada pela Petrobras como medida indenizatória pelo acidente ocorrido no ano 2000 na Baía de Guanabara.

A recente autorização legal definitiva para exploração da área próxima à Fortaleza de Santa Cruz, concedida pelos órgãos militares à EECM foi certamente um passo decisivo para implantação de seu sistema de cultivo de mexilhões. No entanto, como observamos no Capítulo 1, esta área da Fortaleza de Santa Cruz, considerada de baixa poluição no período de nosso estudo, foi recentemente identificada por Pinheiro Jr. et al. (2002), como já tendo cerca de 60% de áreas proibidas para exploração de moluscos. Portanto, esta autorização, embora da maior importância será, a longo prazo, ao que tudo indica, inócua se não for acompanhada da urgente implantação do PDBG (Programa de Despoluição da Baía de Guanabara).

Neste Programa de Despoluição da Baía de Guanabara, a busca de condições ambientais, sociais e institucionais adequadas para a atividade pesqueira deverá ser uma prioridade. Experiências institucionais e legais, no plano internacional, como a canadense, poderiam ser discutidas e eventualmente incorporadas pelas autoridades nacionais. No Canadá operam de forma integrada o Canadian Shellfish Sanitation Programme (CSSP), Department of Fisheries and Oceans (DFO), Canadian Food Inspection Agency (CFIA) e Environment Canada (EC). A integração desses órgãos possibilita naquele país, a existência de um programa de classificação das áreas de cultivo e extração de moluscos denominado “Shellfish Growing Area Classification Program” que proíbe a extração ou cultivo de moluscos em áreas altamente poluídas através de mapas que demonstram o monitoramento das regiões livres, limitadas e proibidas. Essas informações são amplamente divulgadas para os pescadores, maricultores e consumidores, num processo claro e transparente de segurança ambiental.

Os maricultores da EECM têm plena consciência da importância da implantação do PDBG evidenciada na sua visão de desenvolvimento sustentável e preservação do ambiente, o que fica claro no seu comportamento com relação às sementes de mexilhões utilizadas no sistema de cultivo. Essas sementes são retiradas dos bancos mexilhoneiros utilizando um sistema autosustentável, ou seja, que permite a repovoação dos bancos naturais e evita a predação excessiva, o que a longo prazo, certamente levaria à diminuição da quantidade de mexilhões no ecossistema aquático da Baía de Guanabara.

Além da preocupação com a implantação das sementes dos mexilhões nos bancos naturais da Baía de Guanabara, os pescadores da ALMARJ também estão atentos quanto aos problemas ambientais e de saúde gerados pelo excessivo acúmulo das valvas dos mexilhões na região junto à praia de Jurujuba. Após a visita de técnicos da Secretaria de Ambiente de Niterói, os pescadores foram alertados quanto ao avançado processo de assoreamento da enseada de Jurujuba resultante do acúmulo das valvas dos mexilhões.

Na tentativa de solucionar esse problema tecnológico e ambiental, especulou-se quanto à possibilidade de venda dessas valvas para uma fábrica de botões em São Paulo. No entanto, algumas experiências revelaram que as valvas dos mexilhões não ofereciam a resistência necessária para a fabricação industrial de botões. Diante desse quadro, foram realizados estudos junto ao Ministério do Meio Ambiente (MMA) com objetivo de criar alternativas para a utilização dessas valvas. A experiência mais satisfatória foi a de reaproveitamento das valvas na produção de tijolo refratário. A EECM está aguardando alocação de verba para a compra de equipamentos que permitam a produção de tijolos refratários a partir das valvas dos mexilhões. Enquanto isso não ocorre, as valvas estão sendo utilizadas pela PMN (Prefeitura Municipal de Niterói) na redução da acidez do solo pela CLIN (Companhia de Limpeza de Niterói).

Considerando que diversos pontos de coleta de mexilhões na Baía de Guanabara estão atingidos por elevados níveis de contaminação fecal, uma medida paliativa para a questão das áreas atingidas pelo esgotamento doméstico e industrial consistiria na adoção de tecnologias de depuração para moluscos.

No entanto, quanto à possibilidade de se incluir tanques depuradores no processamento tecnológico dos mexilhões da EECM, é importante lembrar que, de acordo com a Informação DIPES nº 097/88, do então Ministério da Agricultura (MA) a depuração de mexilhões somente poderá ser feita em áreas ainda não totalmente poluídas (“áreas limitadas”).

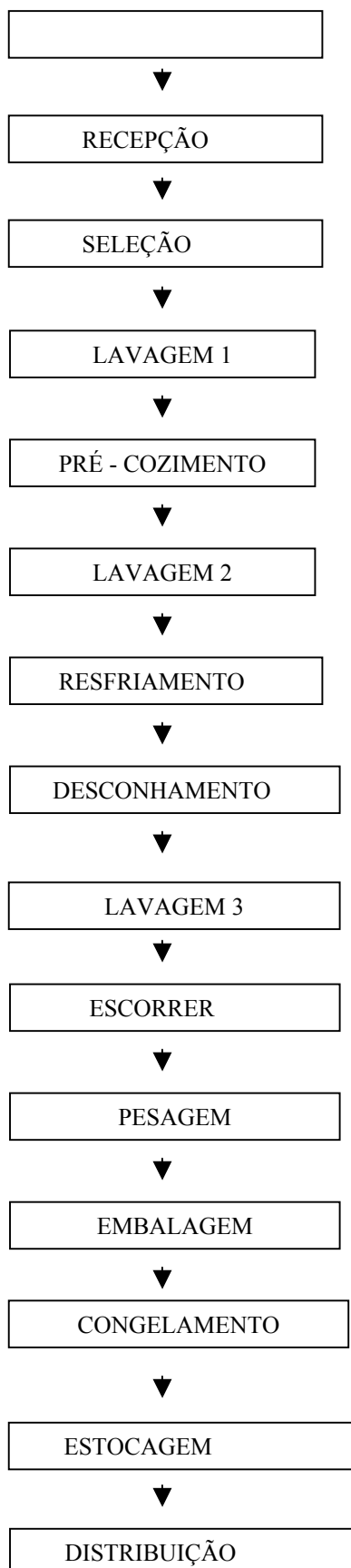
Portanto, para que se possa deliberar quanto à viabilidade na EECM de utilização de tanques depuradores e quanto à sua complexidade e custo, serão necessárias informações básicas como, entre outras, o mapeamento preciso da Baía quanto às áreas livres, limitadas e proibidas. Uma vez de posse dessas informações (que deverão ser permanentemente atualizadas) quanto às áreas definidas como limitadas e passíveis de depuração, os maricultores da EECM/ALMARJ poderão avaliar juntamente com seus parceiros institucionais, a viabilidade econômica desta tecnologia.

No entanto, é importante destacar que esta tecnologia não poderá ser aplicada se a degradação da Baía de Guanabara prosseguir no seu ritmo atual. Se isto ocorrer, a região próxima à Fortaleza de Santa Cruz acabará em pouco tempo poluída como os demais pontos de extração de mexilhões da Baía, tornando-se área totalmente proibida e os mexilhões dela extraídos não poderão mais ser submetidos à depuração, conforme a legislação em vigor.

Da mesma forma, todas as demais estratégias até aqui apontadas para enfrentamento do problema da segurança alimentar e da qualidade dos mexilhões nos seus diferentes níveis serão inócuas se o Programa de Despoluição da Baía de Guanabara não for priorizado pela sociedade brasileira e definitivamente implementado pelas autoridades.

ANEXOS

**FLUXOGRAMA RECOMENDADO NO PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE MEXILHÕES (ICMSF, 1997)**



APPCC na Indústria de Mexilhões**Recepção****Riscos:**

- Perda da qualidade por decomposição bacteriana e /ou contaminação química;
- Animais mortos ou com as valvas quebradas devem ser desprezados.;
- Água de abastecimento fora dos padrões da Legislação.

Medidas Preventivas:

- Inspeção rigorosa quanto as condições de vivacidade dos Mexilhões;
- Esclarecimento ao pessoal da recepção quanto as características dos Mexilhões;
- Monitoramento da qualidade físico-química e microbiológica da água de abastecimento;
- Análise sensorial do produto à temperatura ambiente para rejeição da matéria prima em decomposição ou contaminada;
- Utilização de equipamentos ou utensílios limpos e higienizados;
- Uso de gelo na proporção recomendada;
- Manutenção do produto à temperatura em torno de 0 a 5° C;
- Controle do tempo X temperatura, através da manutenção de um fluxo rápido e contínuo das operações;
- Qualificação do pessoal no uso da fita de Merck (pH).

Limites Críticos:

- Toda matéria prima contaminada ou em decomposição será rejeitada;
- Água de abastecimento fora dos padrões não será aceita;
- O uso incorreto de utensílios e equipamentos não será aceito;
- Manutenção da temperatura do produto até no máximo 5° C.

Ações Corretivas:

- Toda matéria prima contaminada ou em decomposição será descartada;
- Proceder cloração da água de abastecimento;
- Restabelecimento imediato da proporção de gelo recomendada;
- Resfriamento com gelo de qualquer produto acima de 5° C;
- Recapacitação de pessoal ou substituição daqueles que não cumprirem a determinações.

Monitoramento:

- Fazer inspeção visual rigorosa dos exemplares recebidos;
- Verificar nível de cloro ativo da água a cada duas horas;
- Observação da eficiência do pessoal envolvido no processo;
- Verificação do cumprimento das análises sensoriais do produto;
- Monitoramento da temperatura e utilização de gelo na proporção recomendada;
- Observação do uso da fita de Merck (pH).

Registro:

- Anotar todos os dados nos mapas de recebimentos diários relativos a entrada dos mexilhões, inclusive com a indicação do local de coleta.

Verificação:

- Estabelecer procedimentos de verificação para confirmar se todo o processo está sendo executado;
- Detectar possíveis falhas no sistema;
- Redimensionar falhas ocasionalmente encontradas.

Pré-cozimento**Riscos:**

- Perda de qualidade por descontrole do fator tempo X temperatura.

Medidas preventivas:

- Controle do tempo, através de relógio e da temperatura de ebulição, de acordo com o produto;
- Antes de proceder o pré-cozimento, classificar o produto por uniformidade de tamanho.

Limites Críticos:

- Obrigatoriedade do uso do relógio para monitorar o tempo de pré-cozimento;
- A temperatura de pré-cozimento deve ser de ebulição da água;
- Obrigatoriedade do registro de controle da temperatura.

Ações Corretivas:

- Observação visual do uso correto do relógio;
- Inspeção visual da classificação por tamanho, antes do pré-cozimento;
- Checar as anotações dos mapas de pré-cozimento;
- Estabelecer um plano de amostragem que inclua a inspeção visual e avaliação sensorial dos produtos pré-cozidos.

Registro:

- Todas as ocorrências deverão ser anotadas em mapas próprios.

Verificação:

- Realizar procedimento de checagem de todas as etapas desenvolvidas;
- Corrigir as falhas ocasionais.

Classificação e Pesagem

Riscos:

- Fraude econômica;
- Pesagem comprometendo e gerando problemas para a empresa e seus clientes;

Medidas Preventivas:

- Aferir balanças utilizadas no processo de pesagem;
- Reconferir os pesos indicados nas embalagens.

Limite Crítico:

- Somente aceitar o peso indicado na embalagem.

Ações Corretivas:

- Todas as embalagens que se apresentarem fora do especificado serão repesadas;
- Calibração da balanças por empresas habilitadas.

Registros:

- Fazer constar nos mapas de registros todas as anotações de classificação e pesagem.

Verificação:

- Verificar se todos os dados apresentados atestam a veracidade do processo.

Resfriamento

Risco:

- Perda da qualidade, através da contaminação cruzada do produto.

Medidas Preventivas:

- Utilização de fluxos contínuos para controlar o tempo X temperatura;
- Seguir rigorosamente as boas práticas de manipulação e fabricação;
- Usar água hiperclorada (5 ppm) e gelo de boa qualidade;
- Manter equipamentos limpos e higienizados.

Limites Críticos:

- Não aceitar pessoal desqualificado;
- Não aceitar equipamentos inadequados e sujos;
- Permitir o uso de água hiperclorada a 5 ppm de cloro residual livre.

Ações Corretivas:

- Treinar, reciclar ou substituir pessoal sem qualificação;
- Restabelecer a correta dosagem de cloro na água;
- Providenciar gelo suficiente para resfriamento.

Monitoramento:

- Observar o cumprimento das normas operacionais;
- Checar a higiene do local;
- Checar a cloração da água.

Registro:

- Todas as ocorrências deverão ser anotadas em mapas próprios.

Verificação:

- Restabelecer os procedimentos de verificação para determinar se todo o processo está sendo cumprido;
- Redirecionar falhas ocasionais do processo.

Estocagem**Riscos:**

- Perda da qualidade por desidratação ou contaminação por amônia.

Medidas Preventivas:

- Manutenção do sistema de frio por profissionais habilitados;
- Instalação de termômetro de fácil leitura;
- Uso de cortinas de ar para evitar variações de temperatura;
- Estocar os produtos através do sistema “first in first out”.

Limites Críticos:

- Não aceitar produtos contaminados por amônia;
- A temperatura de estocagem deverá ser de -18°C por seis meses ou de -25 a -30°C por doze meses;
- Não aceitar desligamento do sistema de frio.

Ações Corretivas:

- Em caso de problemas reparar de imediato o sistema de frio;
- Substituir os termômetros defeituosos;
- Qualquer suspeita da perda de qualidade por falta de energia elétrica, proceder a transferência do produto para outro sistema de frio.

Monitoramento:

- Checar o sistema de frio através de inspeção visual;
- Observar a existência de vazamento de amônia;
- Conferir a temperatura e a data da embalagem;
- Checar o grau de fidelidade dos termômetros;
- Observar a disposição “first in first out”.

Registro:

- Todas as ocorrências serão anotadas devidamente no mapa de estocagem do produto.

Verificação:

- Verificar se estão corretas, as determinações do processo de estocagem;
- Observar as falhas eventuais do processo.

Fonte: ITAL, 1995

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AKERMAN, M, MENDES, R., BÓGUS, C.M., WESTPHAE, M.F., BICHIR, A. PEDROSO, M.L. 2002. Avaliação em promoção da saúde: foco no município saudável. *Revista de Saúde Pública*, 36:638-46.

ALAM, M.J., TOMOCHIKA, KI, MIYOSHI, SI, SHINODA, S. 2002. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the seto-inland sea, Japan, FEMS, Microbiology Letters, 20883-87.

ALMEIDA, V.C. & NUNES, M.P. 1995. Prevalence of *Aeromonas trota* in aquatic environment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90: 449.

ALLEN, D.A., AUSTIN, B., COLWELL, R.R. 1983. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33:599-604.

ALTEKRUSE, S.F. & SWERDLOW, D.L. 1996. The changing epidemiology of foodborne disease. *American Journal of Medicine Science*, 311:23-9.

ALVES, D.C.C., 2000. *Caracterização de Vibrio e Aeromonas em peixes comercializados em feiras livres, no município do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

AMADOR, E.S. 1996. *Baía de Guanabara e Ecossistemas Periféricos: Homem e Natureza*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ARAÚJO, V.S. 2001. *Estudo de marcadores de virulência em cepas de Aeromonas isoladas de alimentos*. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

ARCHER, R.M.B. & MORETTO, E. 1994. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) from a natural bed of the municipal of Palhoça, SC. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28: 143-50.

ARIAS. C.R., MACIÁN, M.C., AZNAR, R., GARAY, E., PUJALTE, M.J. 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among vibrio isolates from sea water and shellfish of western mediterranean coast. *Journal of Applied Microbiology*, 86:125-34.

ARMSTRONG, G.L., HOLLINGSWORTH, J., MORRIS, J.G.Jr. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiology Review*, 18:29-51.

ARROYO, H.V. & CERQUEIRA, M.T. (eds). 1997. *La promoción de la salud y la educación para la salud en America Latina: Una análisis sectorial*. San Juan: Porto Rico, Editorial de la Universidad de Puerto Rico.

BARBIERI, E., FALZANO, L., FIORENTINI, C. PIANETTI, A., BAFFONE, W., FABBRI, A., MATARRESE, P., CASIERE, A., LATOULI, M., KUHN, I, MÖLBY, R., BRUSCOLINI, F, DONELLIG. 1999. Occurrence, diversity and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2748-53.

BARROS, G.C. de; 1977. *Vibrio parahaemolyticus: isolamento e identificação em crustáceos e moluscos da Baía de Sepetiba*. Dissertação de Mestrado, Niterói: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

BAUMANN, P., FURNISS, A.L., LEE, J.V. 1984. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411. In: KREIG, N.R., HOLT, J.G. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, p.518-38.

BEAUCHAT, L.R. 1977. Evaluation of enrichment broths for enumerating *Vibrio parahaemolyticus* in chilled and frozen crab meat. *Journal of Food Protection*, 40: 595-9.

BELLA, S.W., HO, M., TAM, T.Y. 2000. Natural depuration of shellfish for human consumption: a note of caution. *Water Research*, 34:1401-06.

BERLINGUER, G. 1979. *Medicina e Política*. CEBES/HUCITEC: São Paulo.

BINTA, M.G.; NYAGA, P.N. 1982 The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* serotypes in Kenyan seafish, shellfish, marine water and sediments. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 497-9.

BLACKSTOM, G.M., NORDSTROM, J.L., VICKERY, M.C.L., BOWEN, M.D., MEYER, R.F., DePAOLA, A. 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53:149-55.

BRASIL, 1981. Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação e dá outras providências. (<http://www.lei.adv.br/6938-81.htm>).

BRASIL, 1983. Decreto no 88.351, de 01 de junho de 1983. Regulamenta a Lei no 6.938, de 31 de agosto de 1981, e a Lei no 6.902, de 27 de abril de 1981, que dispõem, respectivamente, sobre a Política Nacional do Meio Ambiente e sobre a criação de Estações Ecológicas e Áreas de Proteção Ambiental e dá outras providências (<http://www.lei.adv.br/88351-83.htm>).

BRASIL, 1986. Resolução do CONAMA, nº 001, de 23 de janeiro de 1986). Estabelece as definições, as responsabilidades, os critérios básicos e diretrizes gerais para uso e implementação da avaliação de impacto ambiental como um dos instrumentos de Política Nacional do Meio Ambiente (<http://www.lei.adv.br/001-86.htm>).

BRASIL, 1988. Constituição da República Federativa do Brasil. (<http://www.planalto.gov.br>)

BRASIL, 1993. Portaria nº 1.428, de 26 de novembro de 1993. Dispõe sobre a implementação do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) nas indústrias de alimentos e dá outras providências.

BRASIL. 1997. Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950, aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelo decreto nº 1.225, de 25 de junho de 1962. Alterado pelo Decreto nº 2.244 de 4 de junho de 1997. Dispõe sobre o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), Ministério da Agricultura (MA) (<http://www.agricultura.gov.br>).

BRASIL, 1988. Informação DIPES nº 097/88, dispõe sobre os níveis de coliformes fecais permitidos para áreas de cultivo de mexilhões. Serviço de Inspeção de Produtos Animais- SERPA-SC., Ministério da Agricultura (MA), Brasília-DF.

BRASIL, 2000. Lei nº 9.66, de 28 de abril de 2000. Dispõe sobre a prevenção, controle e fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional e dá outras providências (<http://www.planalto.gov.br>).

BRASIL, 2001. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária; Divisão Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 22 de setembro de 1997. Revogada pela RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (<http://www.anvisa.gov.br>).

BRAVO, L. MONTÉ, R., SILVA, M., RAMIREZ, M, GARCIA, B., FERNANDEZ, A., ROSSOLINI, G., GUGGLIELMETTI, P. 1998. Acute diarrhea associated with heat stable enterotoxin producing strains of *Vibrio cholerae* non O1: First report from Cuba. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93:255-56.

BRENDEN, R.A., MILLER, M.A., JANDA, J.M. Clinical disease spectrum and pathogenesis factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. *Review of Infectious Diseases*, 10:303-16, 1988.

BRYAN, F.L. 2002. Reflections on a career in public health: evolving foodborne pathogens, environmental health, and food safety programs. *Journal of Environmental Health*, 65: 14-24.

BRYAN, P.J., STEFFAN, R.J., DePAOLA, A., FOSTER, J.W., BEJ, A.K. 1999. Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Current Microbiology*, 38:168-75.

BUSSANI, M. 1983. *Guia pratica de cultivo del mejillon*. Zaragoza:Acribia.

CANDEIAS, N.M.F. 1997. Conceitos de educação e promoção em saúde: mudanças individuais e mudanças organizacionais. *Revista de Saúde Pública*, 31:209-13.

CARNAHAN, A.M.; FANNING, G.R.; JOSEPH, S.W. 1991. *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose negative species isolated from clinical specimens. *Journal Clinical Microbiology*, 29: 560-64.

CARNAHAN, A.M.; HARDING, J. WASTKY, D.; HANSMAN, S. 1994 Identification of *Vibrio hollisae* associated with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1805-6.

CATTANEO, C.A.M. 1990. *Estudo comparativo entre métodos bacteriológicos e físico-químicos utilizados na avaliação do estudo de frescor dos moluscos bivalves*. Dissertação de Mestrado, Niterói: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

CAVALLO, R.A. & STABILI, L. 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, 36:3719-26.

- CHAKRABORTY, S., NAIR, G.B., SHINODA, S. 1997. Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. *Review in Environmental Health* 12:63-80.
- CHIEN, J.Y., SHIH, J.T.H., SUEH, P.R., YANG, P.C., LUH, K.T. 2002. *Vibrio alginolyticus* as the cause of pleural empyema and bacteremia in an immunocompromised patient. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 21:401-3.
- COOK, D.W. 1994. Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in Postharvest Gulf Coast Shellstock oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3483-4.
- COOK, D.W. 1997. Refrigeration of oyster shellstock conditions which minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Food Protection*, 60:349-352.
- COLWELL, R.R. 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*, 274:2025-31.
- COLWELL, R.R. & KAPER, J. 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science*: 198: 394-6.
- COLWELL, R.R., MacDONELL, M.R., DEBEY, J. 1986. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36:473-77.
- COSTA, T. 1994. *Marisqueiro cultiva esperança, caranguejeiro vive de lembrança*. In: LIMA, E.P.(ed). Retratos da Baía. Rio de Janeiro: FAPERJ.
- COUPER, M.R. 1997. Strategies for the rational use of antimicrobials. *Clinical of Infectious Diseases*, 24:154-56.
- CROCI, L., TOTI, L., MEDICI, D., LOREDANA, C. 1994. Diarrhetic shellfish poison in mussels: comparison of effectiveness of depuration. *International Journal of Food Microbiology*, 24:337-42.

CZERESNIA, D. 1999. The concept of health and the difference between prevention and promotion. *Cadernos de Saúde Pública*, 15:701-9.

DALSGAARD, A., FRIMODT-MOLLER, N., BRUNN, B., HOI, L., LARSENS, J.L. 1996. Clinical manifestation and molecular epidemiology of *Vibrio vulnificus* infection in Denmark. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 15:227-32.

DANIELS, N.A., RAY, B., EASTON, A., MARANO, W., KAHAN, E., MCSHAN, A.L. 2nd., DEL ROSARIO, L., BALDWIN, T., KINGSLEY, M.A., PUHN, N.D., WELLS, J.G., ANGULO, F.J. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. *JAMA, The Journal American Medical Association*, 284:1541-5.

DAVIES, A.R., CAPELL, C., JEHANNO, D., NUCHAS, G.J.E., KIRBY, R.M. 2001. Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*, 12:67-71.

DESMOND, E., JANDA, J.M. 1986. Growth of *Aeromonas* species on enteric agars. *Journal of Clinical Microbiology*, 23: 10-65-67.

DePAOLA, A.; HOPKINS, L.M.; PEELER, T.; WENTS, B. McPEARSON, R. M. 1990. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. Coastal waters and oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2299-309.

DePAOLA, A., CAPER, G.M., ALEXANDER, D. 1994. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from de U.S. Gulf Coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:984-88.

DePAOLA, A., NORDTROM, J.L., BOWERS, J.C., WELLS, J.G., COOK, D.W. 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied Environmental Microbiology*, 69:1521-6.

DIKSON, J.S. & ANDERSON, M.E. 1992. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. *Journal of Food Protection*, 55:144-140.

DOWDY, L.M., KHAN, F, REGALADO, J., TZAKIS, A.G. 1999. *Primary Vibrio vulnificus bacteremia in a liver transplant recipient after ingestion of raw oysters: caveat emptor. Transplantation*, 68:1061-63.

DOYLE, M.P. 1992 A new generation of foodborne pathogens. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 12: 490-3.

DOYLE, M.P. 1994. The emergence of new agents of foodborne disease in 1980s. *Food Research International*, 27: 219-26.

DUPONT, H.L. & STEELE, J.H.1987. Use of antimicrobial agents in animals feeds: implications for human health. *Review of Infectious Disease*, 9:447-60.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. 2001. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood) Directorate C-Scientific Opinions, 19-20 September.

FAO/OMS, 1978. *Código Internacional Recomendado de Práticas de Higiene para Mariscos Moluscos*. Codex Alimentarius.

FEEMA, 1988. *Projeto de Recuperação Gradual do Ecossistema da Baía de Guanabara*. Governo do Estado do Rio de Janeiro, Secretaria de Estado de Meio Ambiente, Fundação Estadual do Meio Ambiente, Rio de Janeiro (Relatório Técnico).

FEEMA, 2002. PDGB- *Projeto de Despoluição da Baía de Guanabara*. <http://www.feema.gov.br>

FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. 1993. *Microbiologia de los Alimentos* Zaragoza: Acribia.

FDA, 1995. *Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* spp. (<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>).

FOUZ, B. & AMARO, C. 2003. Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels culture in fresh waters farms. *Aquaculture*, 217:677-82.

FUNASA, 2003. Fundação Nacional de Saúde. Guia de doenças. Cólera. Situação atual da doença. (<http://www.funasa.gov.br>).

GARCIA-MORENO, M.L & LANDGRAF, M. 1997. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, SBCTA, 17:177-80.

GENESTE, C., DAB, W., CABANES, P.A., VAILLANT, V., QUILICI, M.C., FOURNIER, J.M. 2000. Les vibrioses non-cholériques en France: cas identifiés de 1995 à 1998 par Le Centre National de Référence. *Bulletin Environmental Health*, 9:38-40.

GHINSBERG, R.C., DROR, R., NITZAN, Y. 1999. Isolation of *Vibrio vulnificus* from sea water and sand along the Dan region coast of mediterranean. *Microbios*, 97: 7-17.

GONÇALVES, E.G.R. 2001. *Vibrio cholerae: estudo da associação com o zooplankton de águas estuarinas da Baía de São Marcos- São Luís (MA)*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

GOOCH, J.A., DePAOLA, A., BOWERS, J. MARSHALL, D.L. 2002. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest american oysters. *Journal of Food Protection* 65: 970-4.

GRANUM, P.E., O'SULLIVAN, K., TOMÁS, J.M., ORMEN, O.1998. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 21:131-37.

HACKNEY, C.R.; KLEEMAN, E.G.; RAY, B; SPECK, M.L. 1980. Adherence as a method of differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40: 652-58.

HACKNEY, C.R. & DICHARRY. 1988. A. seafood-borne bacterial pathogens of marine origin. *Food Technology*, 42: 104-9.

HADLY, W.G. 1997. *Vibrio* infections associated with raw oyster consumption in Florida, 1981-1994. *Journal of Food Protection*, 60: 353-7.

HANNINEN, M.L., OIVANEN, P., HIRVELA, K.V. 1997. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs. Shrimp and freshwater. *International Journal of Food Microbiology*, 34: 17-26.

HANSEN, W., FRENEY, J., BENYAGOUB, H., LETOUZEY, M.N., GIGI, J., WAUTERS, G. 1993. Severe human infections caused by *Vibrio metschnikovii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2529-30.

HEIDELBERG, J.F., HEIDELBERG, K.B., COLWELL, R.R. 2002. Bacteria of the gamma-subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied Environmental Microbiology*, 68:5498-507.

HEELAY, J.S.. 2002. A fatal case of *Vibrio vulnificus* infection in an alcoholic male. *Clinical Microbiology Newsletter*, 23:18.

HEYMANN, M.D. 2002. *Exposé présenté à la séance d'ouverture. Forum Mondial FAO/OMS des Responsables de la Sécurité Sanitaire des Aliments. ACTES DU FORUM*, 28-30 janvier, Marrakech, Maroc.

HICKMAN, F.W.B.; FANNING, G.R.; ARDUINO, M.J.; BRENNER, D.J.; FARMER III, J.J. 1988. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol negative species found in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1561-64.

HIGASHIRARA, S.; KANENAKA, B.; CHING, M.L.; EFFLER, P.; AKIYAMA, D.; SUGI, M.; PON, E.; SHARIFZADEM, K.; WASKIIEWICZ, R.; RIDLEY, N.; HOHMANN, W.; HIGSON, W.; SOBSEY, M.; WAIT, D. 1991 Gastroenteritis associated with consumption of raw shellfish, Hawaii, 1991. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 40: 303-5.

HODGE, T.W.Jr., LEVY, C.S., SMITH, M.A. 1995. Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* infection in a patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 30:331-6.

HOLLIS, D.G., WEAVER, R.E., BAKER, C.N., THORNSBERRY, C. 1976. Halophilic *vibrio* species isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 3: 425-31.

HOLMBERG, S.P. & FARMER J.J.III. 1984. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infection. *Review of Infectious Diseases*, 6:633-39.

HOMMA, A., SCHATZMAYR, H.G., FRIAS, A.M., MESQUITA, J.A. 1975. Viral Pollution evaluation of the Guanabara Bay. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 17:140-5.

HONDA, S.; MATSUMOTO, S.; MIWATANI, T.; HONDA, T. 1992. A survey of urease positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhea, sea water and imported frozen seafoods. *European Journal of Epidemiology*, 8: 861-4.

HOWARD, D.H., SCOTT R.D. 2nd., PACKARD, R. JONES, D. 2003. The global impact of drug resistance. *Clinical of Infectious Diseases*, 36S:4-10.

IBGE, 2002. *Censo populacional do Estado do Rio de Janeiro (período 1980-1991)*. <http://www.ibge.gov.br>

ICMSF, 1997. Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos. *APPCC- na qualidade e segurança microbiológica dos alimentos*. Varela: São Paulo.

ISONHOOD, J.H. & DRAKE, M. 2002. *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection* 65: 575-82.

ITAL, 1995. INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. *Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos, Manual Técnico*. São Paulo.

IVERSEN, E. S., 1982. *Cultivo marinos*. Acribia:Zaragoza.

JACKSON, J.K., MURPHREE, R.L., TAMPLIN, M.L. 1997. Evidence that mortality from *Vibrio vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous populations in shellfish. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2098-2101.

JANDA, J.M., ABBOT, S.L., KHASHE, S, KELLOG, G.H., SHIMADA, T. 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of genus *Aeromonas*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:1939-33.

JAKSIĆ, S., UHITIL,S., PETRAK, T., BAZULIC, D., KAROLYI, L.G. 2002. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. *Food Control*, 13: 491-93.

JEGATHESAN, M. & PARAMAVISAM, T. 1976. Emergence of *Vibrio parahaemolyticus* as an important cause of diarrhea in Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25: 201-2.

JOHNSON, R.W., & ARNETT, F.C. 2001. A fatal case of *Vibrio vulnificus* presenting as septic arthritis. *Archives of Internal Medicine* 161:2616-8.

KAFERSTEIN & ABDUSSALAM, M. 1999. Food safety in the 21st century. *Bulletin of World Health Organization*, 77:347-51.

KEHRIG, H.A., COSTA, M., MOREIRA, I., MALM, O. 2002. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. *Marine Pollution Bulletin*, 44:1018-23.

KELLY, K.A., KOEHLER, M, ASHDOWN, L.R. 1993. Spectrum of extraintestinal disease due to *Aeromonas* species in tropical Queensland, Australia. *Clinical of Infectious Diseases*, 16:574-79.

KIROV, S.M., ARDESTANI, E.K. & HAYWARD, L.J. 1993. The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 20:159-68.

KUEH, C.S. & CHAN, K.Y. 1985. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology*, 59:41-7.

KUMATE, J., SEPULVEDA, J., GUTIÉRREZ, G. 1998. Cholera epidemiology in Latin America and perspectives for eradication. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 96: 217-26.

LABENT, 2003. Laboratório de Enterobactérias, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Banco de dados do período de 1996-2002. Comunicação pessoal.

LAMEGO, A.R. 1964. *O homem e a Guanabara*. Rio de Janeiro: Biblioteca Geográfica Brasileira, IBGE.

LANDGRAF, M., LEME, K.P.B., MORENO, M.L.G. 1996. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio* spp. in seafood consumed in São Paulo City, Brazil. *Revista de Microbiologia* 27:126-30.

LANDGRAF, M. 1997. Novos patógenos de interesse em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31: 5-7.

LESMANA, M., SUBEKTI, D.S, TJANIADI, P., SIMANJUNTAK, C.H., PEENJALOI, N.H., CAMPBELL, J.R., OYOJO, B.A. 2002. Spectrum of vibrio species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 43:91-97.

LEVY, S.B. 1987. Antibiotic use for growth promotion in animals: ecological and public health consequences. *Journal of Food Protection*, 50:616-20.

LIMA, F.C. de.; OLIVEIRA, L.A.T de.; MANO, S.B. 1994. Enumeração e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* em lulas frescas comercializadas no município de Niterói, R.J., Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 1: 7-11.

LINKOUS, D.A. & OLIVER, J.D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters* 174: 207-14.

LIRA, A. de A. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife. Dissertação de Mestrado, Recife, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco.

LOPES, C. M.; RABADAO, E. M.; VENTURA, C.; CUNHA, S. da; CORTE, R. R. MELICO, A. A. S. 1993. A case of *Vibrio alginolyticus* bacteremia and probable sphenoiditis following a dive in the sea. *Clinical Infectious Diseases*, 17: 299-300.

LOPES, G.I.S.L. 2001. *Depuração de ostras (Crassostrea brasiliiana) contaminada artificialmente com Vibrio cholerae não O1, Vibrio parahaemolyticus e Salmonella Enteritidis*. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Universidade de São Paulo.

MACHADO, W., MOSCATELLI, M., RESENDE, L.G., LACERDA, L.D. 2002. Mercury, zinc, and copper accumulation in mangrove sediments surrounding a large landfill in southeast, Brazil. *Environmental Pollution*, 120:455-61.

MACIÁN, M.C., ARIAS, C.R., AZNAR, R., GARAY, E., PUJALTE, M.J. 2000. Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *International Microbiology*, 3:51-53.

MAGALHÃES, V.; CASTELLO, A. F.; MAGALHÃES, M.; GOMES, T. T. 1993. Laboratory evaluation on pathogenic potentialities of *Vibrio furnissii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 593-97.

MARTINS, L.M., MARQUEZ, R.F., YANO, T. 2002. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. *FEMS Immunology Medical Association* 32:237-42.

MARTINS, M.T., SANCHEZ, P.S., SATO, M.I.Z., BRAYTON, P.R., COLWELL, R.R. 1993. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment in Brazil

employing direct immunofluorescence microscopy. *World Journal of Microbiology and Biothechnology*, 9: 390-2.

MASCOLA, L.; TORMEY, M. DASSEY, D.; KILMAN, L.; HARVEY, S.; MEDINA, A.; TILZER, A. WATERMAN, S.1986. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters. *Journal of the American Association*, 276: 937-8.

MASSAD, G. & OLIVER, J.D. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Applied of Environmental Microbiology*, 53:2262-64.

MATTÉ,G.R., MATTÉ, M.H., SATO. M.I.Z., SANCHEZ, P.S., RIVERA, I.G., MARTINS, M.T. 1994. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the atlantic coast of Brazil. *Journal of Applied Bacteriology*, 77:281-7.

MATTICK, K.L., DONOVAN, T.J. 1998. The risk to public health of *Aeromonas* in ready-to eat salad products. *Communicable Disease Public Health* 1: 267:70.

MAUGERI, T.L., CACCAMO, D., GUGLIANDOLO, C. 2000. Potentially pathogenic *Vibrios* in brackish waters and mussels. *Journal of Applied Microbiology* 89:261-6.

MELO, M.A.B.C. & COSTA, N.R. 1994. Desenvolvimento sustentável, ajuste estrutural e política social: as estratégias da OMS/OPS e do Banco Mundial para a atenção à saúde. *Planejamento e Políticas Públicas*, 11:49-108.

MÉNARD, G., BRISON, P. MUZELLEC, Y. 2002. Fasciite nécrosante à *Aeromonas hydrophila*: à propos d'un cas. *Medicine de Maladie Infectieuse*, 32: 252-53.

MENG, J. & DOYLE, M.P. 1998. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 96:151-63.

MOTES, M., DePAOLA, A., GINKEL, S.Z.V., McPEARSON, M. 1994. Occurrence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in oysters in Mobile Bay, Alabama: an ecological investigation. *Journal of Food Protection*, 57:975-80.

MOUTELLA, A.C. de C. 2001. *Evolução temporal da contaminação por metais pesados utilizando o modelo de atenuação de concentração*. Dissertação de Mestrado, Niterói: Universidade Federal Fluminense.

MUNIAINI-MUJICA, R., GIRONES, G., TOFIÑO-QUESADA, M. CALVO, L.L. 2002. Depuration dynamics of viruses in shellfish. *International Journal of Food Microbiology* 77:125-133.

MURPHREE, R.L. & TAMPLIN, M.L. 1995. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3656-60.

NASCIMENTO, S.M.M.do, VIEIRA, R.H. S dos F., THEOPHILO, G.N.D., RODRIGUES, D.P., VIEIRA, G.H.F. 2001. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 43: 263-6.

NEVES, M.S., FREITAS, A.C., NUNES, M.P., & RICCIARDI, I.D. 1992. Incidence of motile *Aeromonas* species in aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*, 55: 728-30.

NCCLS, 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, NCCLS, Wayne, PA.

NEVES, E. & TOSTES, A. 1992. *Meio ambiente: a lei em suas mãos*. Petrópolis:Vozes.

NEYTSK, K. HUYS, G. UYTENDAELE, M., SWINGS, J. DEBEVERE, J. 2000. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Letters in Applied Microbiology* 31: 359-63.

NICOLAS, J.L., BASUYAX, O. MAZURIE, J., THEBAULT, A. 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases Aquatic Organisms*, 50:35-43.

NISHIKAWA, Y. & KISHI, T.1988. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. *Epidemiology and Infection*,101: 213-23.

NOGUEIRA, J.M.R., RODRIGUES, D. P., HOFER, E. 2002. Viabilidade de *Vibrio cholerae* O1 em diferentes tipos de água em condições experimentais. *Cadernos de Saúde Pública*, 18:1139-45.

NOTERSMAN, S. HOOGENBOOM, V.A. 1992. Existing and emerging foodborne diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 15: 197-205.

OLIVEIRA, L.P.H. & KRAU, L. 1976. Estudos aplicados à recuperação ambiental da Baía de Guanabara. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 74:99-145.

OLIVER, J.D.; WARNER, R.A.; CLELAND, D.R. 1983. Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose fermenting marine vibrios in coastal waters of Southeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 1406-14.

OLIVER, J.D. & KAPER, J.B. 1997. *Vibrio* species. In: DOYLE, M.P., BEAUCHAT, L.R., MONTIVILLE, T.J. (Eds.) Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers, ASM Press Washington, D.C. p.228-264.

OMS, 1975. *Higiene del pescado y de los mariscos.Cronica de la OMS*.

OMS, 2001. *Estratégia mundial de la oms para contener la resistência a los antimicrobianos*, Geneve, OMS.

PARANHOS, R., NASCIMENTO, S.M. & MAYR, L.M. 1995. On the faecal pollution in Guanabara Bay, Brazil. *Frenesius Environmental Bulletin*, 4:352-57.

PEDROSO, D.M.M., IARIA, S.T. CERQUEIRA-CAMPOS, M.L., HELDTMANN, S., RALL, V.L.M. PIMENTA, F., & SAAD, S.M.I. 1997. Virulence factors in motile *Aeromonas* spp. isolated from vegetables. *Revista de Microbiologia*, 28:49-54.

PEEFERS, A.S.R.; BAILEY, J.; BARROW, GI; HOBBS, B.C. 1973. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis and international air travel. *Lancet*, 1: 143-5.

PEREIRA, C.S. 1998. *Isolamento de Vibrio sp. e enumeração de Vibrio parahaemolyticus a partir de moluscos bivalves marinhos comercializados in natura em restaurantes da cidade do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Niterói:Universidade Federal Fluminense.

PERESI, J.T.M., ALMEIDA, I.A.Z.C., LIMA, SI., MARQUES, D.F., RODRIGUES, E.C.A., FERNANDES, S.A., GELLI, D.S., IRINO, K. 1998. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Revista de Saúde Pública*, 32:477-483.

PETERSEN, A & DALSGAARD, A. 2003. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture*, 219:71-82.

PINHEIRO JR., A.A., OLIVEIRA, L.A.T., FRANCO, R.M., CARVALHO, J.C.A.P. 2002. Colimetria de água marinha em áreas de cultivo e extrativismo de mexilhões no município de Niterói, Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 54: 432-40.

POWELL, J.L. 1999. *Vibrio* species. *Clinical Laboratory Medicine* 19: 537-52.

RADU, S., AHMAD, N., LING, F.H., REEZAL, A. 2003. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, 81:261-66.

RALL, V.L.M., IARIA, S.T., HEIDTMANN, S., PIMENTA, F.C., GAMBA, R.C., & PEDROSO, D.M.M. 1998. *Aeromonas* species isolated from Pintado fish

(*Pseudoplatystoma* spp.): virulence factors and drug susceptibility. *Revista de Microbiologia*, 29:222-27.

REIDHARDT, J.F. & GEROGE, W.L. 1985. *Plesiomonas shigelloides* associated diarrhea. *Journal of American Medical Association*, 253:3294-95.

RIBEIRO, C.A.B. 2000. *Avaliação da presença de metais pesados como contaminadores em águas de poços de uma região agrícola no município de Seropédica, RJ*. Dissertação de Mestrado, Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RIPPEY, S.R. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Review*, 7:419-25.

RODRIGUES, D.P. & HOFER, E. 1986. *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista de Microbiologia*, 4: 332-8.

RODRIGUES, D.P., RIBEIRO, R.V. & HOFER, E. 1994. Enterobactérias patogênicas no solo de áreas de recreação da cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 16:256-59.

RODRIGUES, J.A.D., SAMPAIO, K de L., KASDORF, J. 1996. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC): Aplicação a uma Planta-Piloto de Esterilização Contínua. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos* 26: 189-198.

ROLSTON, K.V.I., HOPFER, R.L. 1984. Diarrhea due to *Plesiomonas shigelloides* in cancer patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 20:597-98.

RUBIN, A. 2000. *Pesquisa de Vibrio cholerae na água do mar e zooplankton na região costeira de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Universidade de São Paulo.

SÁ, P.G. da S. 1999. *Contaminação do ambiente marinho por metais pesados e suas implicações sobre comunidades de pescadores artesanais*. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

SANTOS, E., 1982. *Moluscos do Brasil*. Itatiaia:Belo Horizonte.

SANTOS, R.L., TSOLIS, R.M, BÄUMLER, A.J., ADAMS, L.G. 2003. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36:3-12.

SANYAL, S.C., SARASWATHI, B., SHARMA, P. 1980. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Journal of Medicine Microbiology*, 13:401-9.

SAKAZAKI, R.; IWANAMI, S.; FUKUMI, H. 1963. Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 16: 161-88.

SARKAR, B.L., KUMAR, R., DE, S.P., PAL, S.C. 1987. Hemolytic activity of and lethal toxin production by environmental strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2696-8.

SCHLUNDT, J. 2001. Emerging foodborne pathogens. *Biomedical Environmental Science*, 14:44-52.

SCOGGIO, M.E., DIPIETRO, A., PICERNO, F., DELIA, S, MAURO, A, LAGANA, P. 2001. Virulence factors in vibrios and aeromonads isolated from seafood. *New Microbiology*, 24:273-80.

SILVA, C.H.D. 1977. Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* de diferentes espécies de peixes do litoral Atlântico no período de 1873-1976. In: Anais do VII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

SILVA JR, J.A.D. 1995. *Manual de Controle Higiênico Sanitário em Alimentos*. Varela:São Paulo.

SISSINO, C.L. & MOREIRA, J.C. 1996. Evaluation of environmental contamination and pollution at the area under the influence of the Morro do Ceu landfill dump in Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 12:515-23.

SMITH, R.D. & COAST, J. 1998 Controlling antimicrobial resistance: a proposed transferable permit market. *Health Policy*, 43:219-32.

STROM, M.S & PARANJYPE, A. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 2:177-88.

SUNNER, J., & ROSS, T. 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 77:55-59.

TAMPLIN, M.L. 2001. Coastal vibrios: identifying relationships between environmental condition and human disease. *Human and Ecological Risk Assessment*, 7:1437-45.

TANG, W.M., WONG, J. 1999. Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio damsela*. *Orthopedics*, 22:443-4.

TAUXE, R.V. 2002. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 78: 31-41.

TEOPHILO, G.N.D. & VIEIRA, R.H.S dos F. 1994. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in raw and commercially cooked crab from Praia do Futuro (Fortaleza, CE., Brazil). *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28: 134-42.

THOMASZ, A. 1994. Multiple antibiotic resistant pathogenic bacteria: a report on the Rockefeller University Workshop. *New England Journal Medicine*, 300: 1247-51.

TORRES, A.M.P. 1983. *Distribuição da população de mexilhões (Perna perna (Linnaeus, 1758) na Baía de Guanabara, RJ*. Monografia de Bacharelado em Biologia Marinha: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

URDACI, M.C., MARCHAND, M. GRIMONT, P.A. 1988. Espèces du genre *Vibrio* associées aux produits marins du bassin d'Arcachon. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologique*, 139:351-62.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association: Washington.

VARGHESE, M.R., FAR, R.W., WAX, M.K., CHAJIN, B.J., OWENA, R.M. 1996 *Vibrio fluvialis* wound infection associated with medicinal leech therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 22: 709-10.

VENKAT, R., MINNAGANTI, M.D., PANKAJ, J., PATEL, M.D. , DANFANCER, M.P, SCHOCH, P.E., CUNHA, B.A.2000. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. *Hearth & Lung: The Journal of Acute and Critical Care*, 29: 306-308.

VIEIRA, R.H.S.dos F, RODRIGUES, D.P., MENEZES, E.A., EVANGELISTA, N.S. de S., REIS, E.M.F., BARRETO, L.M., GONÇALVES, F.A. 2001. Microbial contamination of sand from a major beaches in Fortaleza, Ceara State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:77-80.

VIVEKANANDHAN, G., SAVITHAMANI, K., HATHA, A.A.M, LAKSHMANAPERUMASLDAMY, P. 2002. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *International Journal of Food Microbiology*, 76:165-68.

WALLACE, D.J., VanGILDER, T., SHALLOW, S. FIORENTINO, T., SEGLER, S.D., SMITH, K.E., SHIFERAW, B., ETZEL, R. GARTHRIGHT, W.E., ANGULO, F.J. 2000. Incidence of foodborne illness reported by a foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group. *Journal of Food Protection* 63:807-9.

WALNE, P.R., 1975. *Cultivo de Moluscos Bivalvos*. Acribia:Zaragoza.

WANG, J.T., FANG, C.T., HSUEH, P.R., CHANG, S.C., LUH, K.T. 2000. Spontaneous bacterial empyema caused by *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 37:271-273.

WANG, C. & SILVA, J.L. 1999. Prevalence and characteristics of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. *Journal of Food Protection*, 62: 30-4.

WEST, P.A. 1989. The human pathogenic vibrios-A public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection*, 103: 1-34.

WHO, 1986. *Health Promotion- The Ottawa Charter*. Geneva:WHO.

WHO, 1988. *Health Public Policy- Adelaide Recommendations*. Geneva:WHO.

WONG, H.C., LIV, S.H., KU, L.W., LEE, I.Y., WANG, T.K., LEE, C.L., KUO, L.P., SHIH, D.Y.C. 2000. Characterization of *Vibrio parahemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 63:900-06.

WOOD, P.C. 1976. *Manual de Higiene de los mariscos*. Zaragoza:Acibia.

YU, K.C., YANG, T.I., LEE, K.K. 1997. Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers *Epinephelus coioides*. *Current Microbiology*, 35:109-15.