

Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará¹

Fecal contaminant of the oyster *Crassostrea rhizophorae* commercialized at Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará State

Leyla Maria de Oliveira Barros², Grace Nazareth Diogo Theophilo³, Renata Garcia Costa⁴, Dália dos Prazeres Rodrigues⁵ e Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira⁶

Resumo - Foi estimado o Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes a 45°C, em 60 amostras de ostras, *Crassostrea rhizophorae*, dos pontos de comercialização (A e B) da Praia do Futuro, em Fortaleza-CE, no período de maio de 2002 a fevereiro de 2003. Cada coleta constava de 12 ostras, totalizando 720 animais analisados. O NMP de coliformes termotolerantes a 45°C variou de 4 a 930/g e de 4 a 430/g, nas ostras coletadas em “A” e “B”. Procedeu-se, em seqüência, ao isolamento e subsequente caracterização bioquímica de 70 cepas (86,6%) e 45 (64,3%) de *Escherichia coli*; 7 (8,6%) e 20 (28,5%) de *Enterobacter* spp. e 4 (5%) e 3 (4,2%) de *Citrobacter freundii*, respectivamente para os pontos “A” e “B”, assinalando-se ainda a identificação de 5 cepas (3%) de *Klebsiella* spp. Foi avaliada a suscetibilidade antimicrobiana da totalidade das cepas de *E. coli*, empregando diferentes grupos de drogas. Os resultados apontaram que todas as cepas de *E. coli* isoladas das amostras do ponto “A” apresentaram sensibilidade ao cloranfenicol (CHL) e à tetraciclina (TCY). Resistência à cefalotina (CEP) e à nitrofurantoína (NIT) foi detectada em 6 cepas das barracas “A” e “B”, respectivamente. Nenhum isolado das amostras de ambos os pontos de comercialização pertencia aos grupos enteroinvasivas (EIEC), enteropatogênicas (EPEC) ou ao sorogrupo O157, enterohemorrágico. Não foi detectada a presença de toxinas (ETEC)

Termos para indexação: higiene alimentar, coliformes termotolerantes, contaminação.

Abstract - The Most Probable Number (MPN) of thermotolerant coliforms at 45° C was estimated in 60 samples of oyster (*Crassostrea rhizophorae*), sold at two commercial areas (A and B) of Futuro beach, Fortaleza, Ceara State, Brazil, from January 2002 to February 2003. Each pool was composed of 12 oysters, totaling 720 individuals tested. The MPNs for thermotolerant coliforms at 45°C ranged from 4 g⁻¹ to 930 g⁻¹, and from 4 g⁻¹ to 430 g⁻¹ for the oysters sampled at areas A and B, respectively. Upon isolation of the individuals, chemical characterization of 70 (86,6%) and 45 (64,3%) strains of *Escherichia coli*, 7 (8,6%) and 20 (28,5%) of *Enterobacter* spp., and 4 (5%) and 3 (4,2%) of *Citrobacter freundii* were performed for the areas A and B, respectively. Plus, 5 (3%) strains of *Klebsiella* spp. were identified. The antimicrobial susceptibility of the *E. coli* strains to different groups of drugs was performed. The results showed that the strains isolated from commercial area A were susceptible to chloramphenicol (CHL) and tetracycline (TCY). Resistance to cephalothin (CEP) and nitrofurantoin (NIT) was observed in 6 strains for commercial areas A and B, respectively. Neither of the isolated strains from both commercial areas belonged to the enteroinvasive (EIEC), enteropathogenic (EPEC), or O157 serotype. No enterotoxin (ETEC) was observed throughout trails.

Index terms: food safety, thermotolerant coliforms, contamination.

¹ Recebido para publicação em 22/06/2004; aprovado em 13/05/2005.

Parte de dissertação de mestrado em Ciências Marinhas Tropicais pela Universidade Federal do Ceará

² Eng. de Pesca, M.Sc., Dep. de Engenharia de Pesca, bloco 811, Campus do Pici, CEP: 60.455-970, CE, leyla102000@yahoo.com.br

³ Eng. de Pesca, D.Sc., Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ, gracetheophilo@hotmail.com

⁴ Formação, M.Sc., Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ.

⁵ Bach. Ciências Biológicas, D.Sc., Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ, dália@ioc.fiocruz.br

⁶ Bach. Ciências Biológicas, D.Sc., Instituto de Ciências do Mar/UFC, RJ, regine@labomar.ufc.br

Introdução

O consumo de ostra é responsável por incontáveis surtos epidêmicos, respondendo diretamente por problemas de Saúde Pública, principalmente quando esses moluscos são ingeridos crus ou mal cozidos e a qualidade sanitária do ambiente aquático onde eles são capturados está comprometida (José, 1996).

Segundo Henriques et al. (2000), entre os animais marinhos que vivem em ambientes contaminados por microrganismos, os moluscos bivalves são os que oferecem maiores riscos à Saúde Pública, por serem filtradores e bioacumuladores. Por essa razão, os bivalves, sobretudo ostras e mexilhões, são utilizados mundialmente como indicadores de poluição marinha.

Muitos países que comercializam ostras desenvolveram um conjunto de normas próprias, baseadas em análises microbiológicas da água de seu cultivo e/ou da sua carne. A maioria desses padrões normativos está baseada na pesquisa de coliformes, pois esse grupo é indicador de contaminação fecal (Machado et al., 2001). Nesses países, a obrigatoriedade de se proceder à purificação ou depuração dos bivalves depende da classificação da área de origem (National Shellfish Sanitation Program, 1997). Quando provenientes de áreas aprovadas, estes podem ser enviados diretamente para comercialização, mas, quando oriundos de áreas restritas, a depuração é obrigatória, sendo vedada a extração de bivalves em áreas proibidas ou não classificadas. Segundo Jacobi (2000), apesar destes procedimentos terem sido adotados internacionalmente, ainda não são observados no Brasil.

José (1996), estudando a relação entre os bivalves e a segurança do consumidor no Estado de São Paulo, constatou que não existem mecanismos legais ou políticos que permitam o conhecimento de sua área de origem, com exceção daqueles oriundos de cultivo. Entretanto, a produção de moluscos bivalves no Brasil através do cultivo, ainda é incipiente, quando comparada a da extração (FIPERJ e IP-SP, 1989; Pereira et al., 1991).

Assim, o consumo destes moluscos em nosso meio, sem cocção prévia, pode ser responsável pela ocorrência de surtos de doenças de transmissão alimentar, tendo em vista sua capacidade filtrante de cinco litros de água/hora acarretando a retenção, no manto, de 75% das espécies bacterianas presentes no seu ambiente.

O Nordeste, particularmente a Praia do Futuro (Fortaleza-CE), é uma das áreas de maior consumo destes bivalves. Entretanto, sob o ponto de vista microbiológico, a qualidade do marisco é duvidosa e a comercialização é efetivada em barracas cujo controle sanitário mostra-se precário, apontando para a necessidade de investigação sob o ponto de vista sanitário.

Tomando-se por base tais aspectos, foi efetuada, na presente avaliação, a análise no sentido de se estimar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes a 45°C, em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas em duas barracas da Praia do Futuro e, entre as cepas identificadas, como *Escherichia coli*, determinar a suscetibilidade a diferentes antimicrobianos, avaliar antígenicamente à presença de sorogrupos reconhecidos como EPEC e EIEC, assim como a produção de toxinas (ETEC).

Material e Métodos

Foram coletadas 60 amostras de ostra (*Crassostrea rhizophorae*), provenientes de dois pontos de comercialização (30 da Barraca A e 30 da Barraca B) da Praia do Futuro, em Fortaleza-Ceará. Tendo em vista a homogeneidade no tamanho dos animais, cada amostra apresentou-se constituída de 12 exemplares, representando um total de 720 indivíduos analisados. Tomou-se por base a coleta dos espécimes fechados, os quais foram mantidos sob refrigeração durante o transporte, realizado em caixas isotérmicas, até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizadas as análises bacteriológicas.

Imediatamente após a chegada ao laboratório, as ostras passaram por escovação e lavagem externa; em seguida, foram abertas assepticamente e delas retirado todo o conteúdo corpóreo e a água intervalvar.

Após a maceração em gral e pistilo, foi pesado o quantitativo de 50 g, o qual foi diluído em 450 mL de solução salina a 3% NaCl e homogeneizado, durante 2 minutos, em Waring Blender, obtendo-se primeiramente a diluição na concentração de 10^{-1} e, em seqüência, através de diluições sucessivas, a concentração de 10^{-6} .

Para a determinação do NMP de coliformes termotolerantes a 45°C, empregou-se a técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo Feng et al. (2002).

O volume de 1mL, proveniente de cada uma das diluições previamente obtidas (10^{-1} a 10^{-6}), foi inoculado em séries de três tubos contendo Caldo Lauryl Sulfato – CLS (Difco), com tubos de Durham. Em seqüência, foram incubados a 35°C por 48 horas. Após esse período, os tubos turvos com produção de gás foram considerados positivos e deles foram retiradas alíquotas, as quais foram transferidas para tubos de caldo EC (Difco), incubados a 45°C em banho-maria por 24 horas. A determinação do NMP de coliformes termotolerantes a 45°C foi efetuada segundo a orientação de Garthright (2001).

A partir dos tubos que apresentaram resultados positivos no Caldo EC, indicados pela presença de gás, foram retiradas alíquotas para semeadura por estriamento, sobre a superfície do meio ágar Eosina Azul de Metileno-EMB (Difco) e incubação a 37°C, por 24 horas. Após este período, foram isoladas duas a três colônias típicas de *E. coli* para o meio Agar Triptona de Soja-TSA (Difco), cujo crescimento foi empregado para avaliar a produção de indol em meio de SIM, via metabolismo de utilização da glicose, pela reação de Vermelho de Metila e produção de acetoina pelo teste de Voges Proskauer, e capacidade de utilização do Citrato como fonte única de carbono, de acordo com Feng et al. (2002).

Na caracterização antigênica dos sorotipos reconhecidos como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC), foram empregados antissoros polivalentes e monovalentes específicos. Para tal, primeiramente é efetivado o aquecimento da suspensão bacteriana a 100°C/60 minutos e em seqüência é efetivado o ensaio através do método de soroaglutinação rápida em lâmina. Resultados positivos orientam para a identificação dos sorotipos específicos, através da aglutinação lenta, em tubo, com os antissoros específicos, de acordo com cada antissoro polivalente.

Para a determinação das toxinas termolábil (LT) e toxina termoestável (ST), foram empregados os kits VET-RPLA (OXOID) específicos, seguindo as orientações do fabricante.

Para verificação da suscetibilidade das amostras, foram utilizados os seguintes antimicrobianos da marca OXOID: Tetraciclina-TCY (30 mg), Ampicilina-AMP (10 mg), Ácido Nalidíxico-NAL (30 mg), Cloranfenicol-CHO (30 mg), Sulfametoxazol-trimetoprim-SXT (30 mg), Nitrofurantoína-NIT (300 mg), Cefalotina-CEP (30 mg), Cefoxitina-FOX (30 mg), Ceftriaxone-CRO (30 mg), Gentamicina-GEN (10 mg), Ciprofloxacina-CIP (5 mg), Imipenem-IPM (10 mg), seguindo a orientação técnica ditada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) e a padronização do inóculo através de espectrofotômetro (Vitek) e medição dos halos de inibição pelo uso de paquímetro. As cepas padrão empregadas para controle são: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Resultados e Discussão

O NMP de coliformes termotolerantes a 45°C, nas amostras de ostras dos pontos de comercialização A e B, variou de 4 a 930/g e 4 a 430/g, respectivamente. De um

total de 60 amostras de ostras analisadas (Tabela 1), 70% se apresentaram fora dos padrões estabelecidos pela Resolução 12 da ANVISA (Brasil, 2001), no seu Artigo 7º, alínea b, o qual estabelece limites de 5 x 10 coliformes termotolerantes a 45°C/g, para moluscos bivalves cozidos, industrializados, resfriados ou congelados.

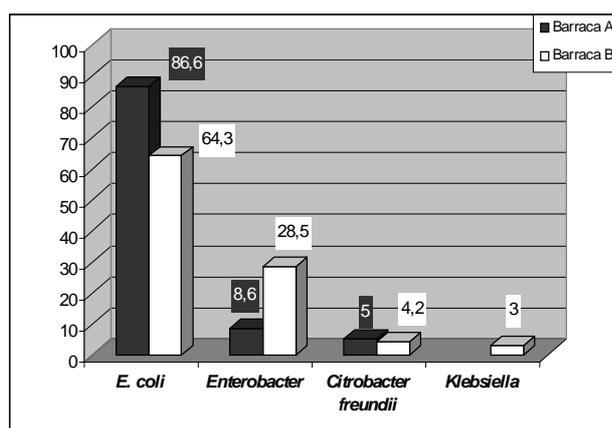
A enumeração de coliformes termotolerantes a 45°C/g visa a caracterizar as condições higiênico-sanitárias dos alimentos. Diversos autores (Germano et al., 1993; Rippey, 1994) têm relatado que a presença destes microrganismos em pescado é originada principalmente pelo lançamento de esgotos próximos aos locais de captura, ou devido à manipulação inadequada, a qual pode ocorrer durante as etapas de transporte, beneficiamento e comercialização do produto.

A colimetria de águas, provenientes das áreas onde são coletados bivalves destinados ao consumo humano, constitui-se sempre em subsídio científico útil para as autoridades sanitárias envolvidas na fiscalização e no controle da qualidade deste alimento (Wood, 1996). Contudo, Cerrutti e Barbosa (1991), estudando amostras de águas e de ostras, não observaram relação na quantidade de enterobactérias entre ambas. Esses autores afirmaram que a amostra de água fornece resultados no momento da coleta, enquanto a oriunda de ostras aponta a integração do molusco às condições ambientais da água, antes da coleta, refletindo um período maior. Esta assertiva é concordante com as observações de Machado et al. (2001), em termos de padrões de normatização do cultivo e determinação de coliformes termotolerantes a 45°C nos tecidos moles e líquido intervalvar, visando a avaliar a qualidade dos moluscos, a qual apresenta maior relevância do que a análise da água das áreas produtivas.

Do total de 81 cepas isoladas das amostras do ponto de comercialização "A", identificou-se 70 cepas (86,6%) de *E. coli*, 7 (8,6%) de *Enterobacter* spp. e 4 (5%) de *Citrobacter freundii*, enquanto das 70 cepas oriundas do ponto de comercialização "B", foram 45 (64,3%) de *E. coli*, 20 (28,5%) de *Enterobacter* spp., 3 (4,2%) de *Citrobacter freundii* e 5 (3%) de *Klebsiella* spp. (Figura 1). Estes resultados confirmaram elevados percentuais de *E. coli* nas ostras obtidas a partir dos dois pontos de comercialização, confirmando a baixa qualidade microbiológica destes moluscos e, indiretamente, o elevado nível de contaminação por coliformes termotolerantes a 45°C, do ambiente aquático, onde são capturados esses bivalves. Acrescenta-se que falhas quanto ao transporte, manutenção e manuseio do pescado, não podem ser esquecidas, tendo em vista representarem pontos fundamentais e de forte influência na manutenção da qualidade do pescado e, em particular, destes moluscos os quais, usualmente, são consumidos sem nenhum processo de cocção.

Tabela 1 - Número Mais Provável (NMP)/g de coliformes termotolerantes a 45°C, obtidos de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas nos pontos de comercialização A e B da Praia do Futuro, em Fortaleza-CE.

Coletas	Coliformes termotolerantes a 45°C		Coletas	Coliformes termotolerantes a 45°C	
	Barraca A	Barraca B		Barraca A	Barraca B
1 ^a	430	230	16 ^a	280	43
2 ^a	150	93	17 ^a	430	280
3 ^a	120	430	18 ^a	120	93
4 ^a	210	43	19 ^a	210	150
5 ^a	230	150	20 ^a	210	150
6 ^a	280	43	21 ^a	150	15
7 ^a	750	430	22 ^a	43	15
8 ^a	93	430	23 ^a	93	43
9 ^a	150	90	24 ^a	120	40
10 ^a	930	430	25 ^a	150	28
11 ^a	230	150	26 ^a	15	9
12 ^a	75	4	27 ^a	93	15
13 ^a	390	430	28 ^a	93	23
14 ^a	230	120	29 ^a	4	7
15 ^a	230	430	30 ^a	64	40

**Figura 1** - Percentual de cepas de coliformes termotolerantes a 45°C isoladas de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas nas Barracas A e B da Praia do Futuro, em Fortaleza-CE.

A elevada ocorrência de *E. coli* é relatada particularmente em infecções gastrointestinais, tanto em indivíduos imunocomprometidos, como naqueles saudáveis. Outro aspecto a se considerar, é que a presença deste microrganismo é reconhecida como indicador de outros patógenos, tanto de natureza bacteriana, quanto viral ou parasitária, cujos prejuízos à população são amplamente reconhecidos (Brasil, 2001). Este fato se torna óbvio nesta avaliação, onde, além de *E. coli*, também foram encontradas nas amostras de ostras, outras bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes: *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, sendo este último, particularmente, relatado em quadros gastrointestinais humanos.

Das 60 cepas de *E. coli* (30 do ponto de comercialização “A” e 30 do “B”) testadas quanto à sensibilidade a

antimicrobianos, a totalidade oriunda do ponto “A” mostrou sensibilidade ao cloranfenicol e tetraciclina. Nas oriundas do ponto “B”, os resultados obtidos quanto à sensibilidade a estes dois fármacos foram de 90 e 86,7%, respectivamente. A resistência à cefalotina foi de 13% em “A” e “3% em “B” e quanto à nitrofurantoína, 6 cepas de cada um dos diferentes pontos de comercialização apresentaram resistência. Apesar do perfil detectado acima, deve-se considerar a influência ambiental, a qual pode apresentar, em outros momentos, perfis determinantes de condições de riscos à saúde dos consumidores devido à circulação de genes de resistência nos meios de onde as ostras procedem.

Morelli et al. (2003) avaliaram a suscetibilidade em cepas *E. coli* isoladas de ostras, também comercializadas na Praia do Futuro (CE), a diferentes antibióticos e observaram que as maiores sensibilidades apresentadas pelas cepas foram detectadas para esses mesmos antimicrobianos.

Segundo Cooke (1985), coliformes resistentes a antimicrobianos constituem um importante dado para saúde pública, não só por sua potencialidade de patogênese, mas por transmitir resistência a outras bactérias patogênicas.

Quanto à avaliação antigênica, a totalidade das cepas não apresentou aglutinação frente aos antissoros dos grupos EIEC e EPEC e o sorogrupo O157. Do mesmo modo, aponta-se ausência das toxinas LT e ST com base na avaliação efetuada. Contudo, tais resultados não devem ser avaliados como indicativos de qualidade. Devemos lembrar que *E. coli* indica contaminação fecal, havendo, portanto, a necessidade de se promover medidas efetivas de

proteção às áreas de captura das ostras, a fim de se prevenir a contaminação das mesmas por coliformes de origem fecal, bem como maior rigor na fiscalização por parte das autoridades competentes, em relação às práticas adequadas de transporte, manipulação e comercialização desses moluscos.

Conclusões

Os moluscos estão contaminados com bactérias fecais e podem ser prejudiciais ao consumidor. Além do mais, algumas cepas de *Escherichia coli*, isoladas das ostras, são resistentes a antimicrobianos, constituindo-se num importante dado para saúde pública e indicando a circulação de genes resistentes no meio ambiente.

Referências Bibliográficas

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC N° 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção I.
- CERUTTI, R. L.; BARBOSA, T. C. P. Flora bacteriana heterotrófica em ostras *Crassostrea rhizophorae* e águas da Baía Norte, ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v.22, p.330-334, 1991.
- COOKE, E. M. *Escherichia coli* – an overview. **Journal of Hygiene**, v.95, p.523-530, 1985.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. In: **FDA bacteriological analytical manual online, sep.** 2002. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebem/bam-4a.html>> Acesso em 28 jan.2003.
- FIPERJ; IP-SP. **Apoio ao Desenvolvimento de Cultivo de Moluscos Bivalves no Brasil.** (Relatório técnico), Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro, 181 p., 1989.
- GARTHRIGHT, W. E. Appendix 2: most probable number from serial dilutions, In: **FDA bacteriological analytical manual online**, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>>. Acesso em: 10 jun.2002.
- GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O.; GERMANO, M. I. S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v.7, n.27, p.6-11, 1993.
- HENRIQUES, M. B.; ZAMARIOLI, L. A.; PEREIRA, O. M.; FAUSTINO, J. S. Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (LINAEUS, 1758), nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista, Estado de São Paulo. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.33, p.69-76, 2000.
- JACOBI, P. R. **Ciência Ambiental: Os desafios da interdisciplinaridade.** São Paulo: Annablume-Fapesp, 2000. 388p.
- JOSÉ, V. F. **Bivalves e a segurança do consumidor.** 1996. 182f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Instituto Oceanográfico – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- MACHADO, I. C.; KOGA, S. M.; WOIOECHOVSKY, E.; GELLI, D. S. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia-SP, Brasil, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliiana*). 2 – Análise da ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). **Higiene Alimentar**, v.15, n.83, p.44-48, 2001.
- MORELLI, A. M. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; REIS, C. M. F.; RODRIGUES, D. P.; FONTELES-FILHO, A. A. Indicadores de contaminação fecal para ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p.81-88, 2003.
- NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM. Dep.of Health and Human Serv., Public Health Serv. **Guide for the control of Molluscan shellfish** (rev). Washington, 1997. 406p.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh Informational Supplement 11 M100.** Washington: NCCLS. 2001. v.1, n.1, p.123.
- PEREIRA, O. M.; SCORVO, J. D.; MARQUES, H. L. A.; OSTINI, S.; BASTOS, A.; MAGNAVITA, O.; FLORES, R. **Estudo sobre os moluscos bivalves distribuídos na costa do litoral brasileiro de importância comercial.** FAO/Instituto de Pesca/FIPERJ, 1991. 194p.
- RIPPEY, S. R. Infections diseases associated with Molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p.419-425, 1994.
- WOOD, P. C. **Manual de higiene de los mariscos.** Zaragoza: Acribia, 1996. 83p.