

Revista de Saúde Pública

Journal of Public Health

Estudo da radiosensibilidade ao ^{60}Co do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras Radiosensibility of *Vibrio cholerae* O1 incorporated in oysters, to ^{60}CO

Ivany R de Moraes^{a**}, Nélida L Del Mastro^a, Miyoko Jakabi^b e Dilma S Gelli^b

^aInstituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, SP, Brasil. ^bSeção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

Estudo da radiosensibilidade ao ^{60}Co do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras*

Radiosensibility of *Vibrio cholerae* O1 incorporated in oysters, to ^{60}CO

Ivany R de Moraes^{a**}, Nélida L Del Mastro^a, Miyoko Jakabi^b e Dilma S Gelli^b

^aInstituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, SP, Brasil. ^bSeção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Ostras, microbiologia. *Vibrio cholerae*, efeitos adversos. Tolerância à radiação.

Keywords

Oysters, microbiology. *Vibrio cholerae*, radiation effects. Radiation tolerance.

Resumo

Objetivo

Avaliar a eficiência da radiação ionizante por ^{60}CO na eliminação de *Vibrio cholerae* O₁, El Tor Ogawa, não-toxigênico, incorporados laboratorialmente em ostras vivas da espécie *Crassostrea brasiliana*.

Método

Foram selecionadas amostras de ostras provenientes de Cananéia (litoral sul de São Paulo, Brasil), as quais foram contaminadas com *Vibrio cholerae* e irradiadas com doses de 0,5 kGy e 1,0 kGy.

Resultados

Foram observadas diminuições significativas do número inicial do microrganismo indicado: de $3,4 \cdot 10^7$ para 10^3 e 10^2 , respectivamente. Os valores de D_{10} correspondentes foram de 0,173 a 0,235.

Conclusão

Adotando-se o fator 6 como nível de segurança, conclui-se que a dose de irradiação de 1,41 kGy é necessária para eliminar números elevados de células viáveis de *V. cholerae* em ostras. Os experimentos foram realizados com os controles respectivos.

Abstract

Objective

Evaluate the effect of ionizing irradiation by ^{60}Co on *Vibrio cholerae* O1, El-Tor, Ogawa, non-toxigenic, incorporated in live oysters *Crassostrea brasiliana*.

Methods

Samples of oysters were selected from Cananéia town in the South coast of S. Paulo state, Brazil, contaminated with *Vibrio cholerae* and irradiated with ^{60}Co at 0.5 and 1.0 kGy dosages.

Results

Showed significant reductions of the initial number of *V. cholerae*, ranging from 3.4×10^7 to 10^3 and 10^2 , respectively. The D_{10} values related with the respective doses of irradiation were 0.173 and 0.235.

Conclusion

Considering a 6 value as safety factor, it is concluded that 1.41 kGy irradiation dosage is necessary to eliminate a high number of *V. cholerae* viable cells in oysters. Controls were used in the experiment.

**Aluna de pós-graduação

Correspondência para/Correspondence to:
Dilma S Gelli
Av. Dr. Arnaldo, 355
01246-902 São Paulo, SP, Brasil
e-mail: dilgelli@ial.sp.gov.br

*Trabalho realizado na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz e no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN). Resumo da dissertação de mestrado apresentada ao IPEN/CNEN, 1996. Parte do Contrato de Pesquisa 302D6-BRA-8029 entre a Agência Internacional de Energia Atômica, IPEN-CNEN e Instituto Adolfo Lutz. Apresentado no Congresso de Higienistas de Alimentos, Recife, 1997. Edição subvencionada pela Fapesp (Processo nº 100/01601-8). Recebido em 25/8/1998. Reapresentado em 9/6/1999. Aprovado em 8/7/1999.

INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves, entre os quais as ostras, são organismos “sentinelas” do ambiente aquático. Fixos em substratos, vivem em estuários de rios e costa marítima onde filtram a água para captar alimentos e, dessa forma, concentram e representam a contaminação das mesmas, tanto no aspecto microbiológico como no químico.^{4,5,7,10,12} Devido ao hábito de consumir ostras cruas e ainda vivas, é compreensível a descrição constante de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos por esse produto alimentício. Os agentes que podem ser veiculados são de natureza biológica (bactérias, vírus, parasitos e toxinas de moluscos) e química (metais pesados, resíduos de pesticidas e, mais raramente, de antibióticos, quando se trata de cultivo/criação).^{4,7,17}

Em termos de saúde pública, considerando as doenças e surtos de doenças relacionadas com o consumo desse alimento, é importante e necessária a adoção de medidas preventivas para o controle de veiculação de agentes. Essas medidas incluem: a seleção de área de captura desses organismos (área selecionada de águas livres de contaminação); a depuração após captura; o controle de água e algas que as ostras usam como alimento, seguida de depuração. Uma outra medida preventiva possível para controlar contaminação é o processo de irradiação ionizante, com ⁶⁰Co.^{3,6,8,12-14,17} Esse processo de intervenção e controle dos agravos à saúde do consumidor tem despertado interesse e se revelado como efetivo na diminuição de riscos microbianos representados pelos perigos como as *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Escherichia coli* O157:H7 e *Vibrio cholerae* toxigênico, entre outros.¹⁶

Durante a expansão da sétima pandemia de cólera na América Latina e Caribe, o consumo de ostras e pescados crus foi considerado como de alto risco de transmitir essa doença. Produtos crus que entram em contato com águas contaminadas por fezes humanas podem ser veiculadores dessa doença e de outros agentes patogênicos fecais, além da recontaminação de produtos cozidos e da própria água de consumo não tratada.^{10,12,13} Considerando os riscos decorrentes desses agentes, foi estabelecido um grupo de estudos para avaliar medidas de controle e desenvolvido um projeto de pesquisa sobre o “Uso de Irradiação como Medida de Controle de Enfermidades Transmitidas por Alimentos na América Latina e Caribe”, pela FAO, (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), IAEA (Agência Internacional de Energia Atômica) e OPAS (Organização Pan-americana da Saúde). Diferentes estudos têm mostrado que os pescados são produtos alimentícios que podem ser efetivamente descontaminados pelo tratamento de irradiação.^{12,13}

O *Vibrio cholerae* é uma bactéria que pode apresentar toxigenicidade. Mesmo se tratando de cepa epidêmica, a concentração ou número de células viáveis necessário para causar a doença é alta para o consumidor adulto e são (maior ou igual a 10⁶/g ou mL do produto consumido). Em indivíduos sensíveis, que apresentam a barreira da acidez estomacal ausente ou menor, esse número pode ser mais baixo (mínimo de 10³/g ou mL).^{9,16}

A sétima pandemia tem como agente o *Vibrio cholerae* O1, biotipo El-Tor, sorotipos Inaba e Ogawa. As cepas toxigênicas e não-toxigênicas apresentam padrão de resistência e sensibilidade semelhante quanto aos fatores físicos e químicos, como temperatura e ação de desinfetantes.^{16,17}

Os dados constantes da literatura especializada indicam a dose de 1,0 kGy como suficiente para eliminar o *V. cholerae* em ostras.^{3,8,12} O presente trabalho tem por objetivo estabelecer a sensibilidade à irradiação com ⁶⁰Co de *Vibrio cholerae* O1, não-toxigênico, biotipo El Tor, incorporados laboratorialmente em ostras *Crassostrea brasiliana*.

MÉTODOS

Cepa: *Vibrio cholerae* O1, biotipo El Tor, sorotipo Ogawa, não-toxigênico, isolada de água do litoral de São Paulo em 1974 e mantida liofilizada pela Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

Ostras: *Crassostrea brasiliana*, proveniente de Cananéia, litoral sul de São Paulo, depuradas, vivas, mantidas sob resfriamento e acondicionadas em caixas de madeira, cobertas com folhas de samambaia, como são normalmente comercializadas.

Água do mar: recebida em galões plásticos de 20 ml, já tratada por filtração em areia para retirada das sujidades maiores, e diminuição dos contaminantes biológicos.

Irradiador: ⁶⁰Co, modelo Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Limited, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) de São Paulo.

A cepa selecionada foi cultivada em água peptonada alcalina (APA) a 35°C por 18-20 horas.

Em um aquário com capacidade para 60 l foram colocados 40 l de água do mar e 20 ostras. Procedeu-se ao borbulhamento de ozônio por 30 min para movimentar a água e assim oxigená-la e diminuir o número de prováveis contaminantes bacterianos presentes. Após esse procedimento, as ostras se apresentavam visivelmente abertas. Foram retiradas amostras de ostras (5 unidades) e de água (20 ml) para verificar se o *Vibrio cholerae* estava naturalmente presente nas amostras.

A água foi contaminada com a cultura da bactéria teste para a incorporação pelas ostras. Após 24 h, procedeu-se a nova amostragem de água e de ostras, as quais foram separadas em 3 porções de 5 unidades cada, acondicionadas em sacos plásticos transparentes e transportadas ao IPEN/CNEN, para que uma porção fosse usada como controle e as outras irradiadas. As doses de irradiação usadas foram de 0,5 kGy e 1,0 kGy. Para avaliação dos resultados, todos os testes foram realizados em triplicata.

As amostras de ostras foram abertas com assepsia e seu interior foi esvaziado e homogeneizado em copo estéril. Do homogeneizado, foram retirados 25 g e acrescentados 225 ml de APA. A partir dessa diluição inicial foram realizadas diluições seriadas em caldo APA, retirando-se 1 ml da diluição precedente e acrescentando 9 ml de APA. A amostra de água foi diluída da mesma forma. As diluições foram incubadas a 35°C por 18-20 h. As sementeiras do material incubado foi em ágar tiosulfato citrato sais biliares sacarose (TCBS). A incubação, o isolamento de colônias características e a identificação foram realizadas conforme a American Public Health Association (APHA) e o Manual do FDA (Food and Drug Administration dos EUA)^{2,9,11,16} observando-se que para o isolamento das colônias foi usado o meio Instituto Adolfo Lutz (IAL) com 1% de NaCl. Os controles (água e ostra, sem contaminação, e ostra contaminada não irradiada) foram analisadas conforme descrito para as amostras-teste.

Para análise estatística dos resultados, foi aplicado o teste “t” de Student, no cálculo das médias de concentração do *Vibrio cholerae*, tendo sido fixado o valor de 0,05 para o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Foi calculado o valor D_{10} relativo aos resultados da concentração da bactéria após a irradiação, aplicando-se a fórmula em que D_{10} corresponde ao valor da Dose, dividido pela diferença entre os valores de $\text{Log}N_0$ e $\text{Log}N$ (N_0 = número inicial da bactéria e N = número da bactéria após irradiação).⁸

RESULTADOS

Os resultados das análises de água e ostras recebidas revelaram ausência de *V. cholerae* antes da contaminação. As amostras de ostra controle contaminadas, que foram levadas ao IPEN/CNEN, porém não irradiadas, revelaram células viáveis demonstrando que não houve perda de viabilidade da cepa usada durante transporte e período de tempo correspondente ao de exposição à irradiação ionizante.

Os dados apresentados na Tabela 1, segundo o teste “t” de Student, indicam que a contaminação inicial é compatível com a concentração necessária de células viáveis para causar doença em adulto são. Os resulta-

dos obtidos após o processo de irradiação revelaram uma diminuição significativa do número de células viáveis e crescentes frente ao aumento da dose de irradiação. O teste “t” de Student, aplicado entre as médias de concentração, foi significativo ao nível de rejeição adotado.

A dose de 1,0 kGy, segundo OPS-OMS/IAEA-FAO-ONU,¹² deve inativar 99,99% das Vibrionaceae patogênicas presentes em moluscos bivalves. Porém, o cálculo em percentagens pode dar uma falsa idéia de segurança, a diminuição deve considerar a base logarítmica e/ou o valor D_{10} .⁷ A redução expressa na Tabela 1, em termos de log na base 10, é de 5, 3 e 2 para 0,5 kGy e de 8, 4 e 3 para 1,0 kGy, respectivamente para os experimentos 1, 2 e 3. Considerando os valores de D_{10} da Tabela 2 e estabelecendo o valor 6 vezes maior ao correspondente a 0,5 kGy de irradiação ionizante com ⁶⁰C, como fator de segurança para a inativação completa do *V. cholerae* em ostras, a irradiação necessária é de 1,038 kGy; enquanto o valor obtido em 1,0 kGy, para o mesmo nível de segurança, requer a dose necessária de 1,41 kGy.

Tabela 1 - Resultados da quantificação do *Vibrio cholerae* O1 não toxigênico, em água do mar e ostras contaminadas laboratorialmente e das ostras contaminadas após irradiação com 0,5 kGy e 1,0 kGy.

	Experimento contaminação inicial		Irradiação (kGy) (ostras contaminadas)	
	Água	Ostra	0,5	1,0
1	10 ⁷ (1)	10 ⁸ (2)	10 ³ (2)	aus(3)
2	10 ⁶ (1)	10 ⁶ (2)	10 ³ (2)	10 ² (2)
3	10 ⁷ (1)	10 ⁵ (2)	10 ³ (2)	10 ² (2)
X+s	(7,0±5,2).10 ⁶	(3,4±0,057).10 ⁷	1,0.10 ³	1,0.10 ²

1-por ml
2-por g
3-ausência em 1 g

Tabela 2 - Valores médios de D_{10} obtidos para o *V. cholerae* O1, não toxigênico, por irradiação ionizante de 0,5 kGy e 1,0 kGy em ostras.

Dose de irradiação em kGy	Valores médios de D_{10}
0,5	0,173
1,0	0,235

DISCUSSÃO

Dados da literatura indicam a aplicação de 1,0 kGy, para a eliminação de Vibrionaceae patogênica em ostras, incluindo o *V. cholerae*, porém sem considerar o número inicial das mesmas.³ Os resultados obtidos no presente trabalho, com níveis de contaminação mais altos (10⁸/g, experimento 1) e os demais resultados da Tabela 1, indicam que a dose de 1,0 kGy não foi eficiente para eliminar completamente o microrganismo teste,

embora seja eficiente para a eliminação do risco de contrair doença, mesmo em consumidores sensíveis: o número de células viáveis do *V. cholerae* diminuiu até níveis iguais ou menores que 10^2 /g. Entretanto, é possível a multiplicação dessa bactéria em ostras vivas, antes do consumo.¹ Por isso, deve ser aplicado um fator de segurança; o fator 6, adotado no presente trabalho, que indica a dose de 1,41 kGy, próxima de 1,5 kGy, pode ser suficiente para a eliminação. Considerando a possibilidade de presença de *V. cholerae* quando da aplicação de 1,0 kGy, os cuidados de transporte e conservação desse produto devem ser realizados de forma a prevenir a multiplicação dessa bactéria nas ostras.^{1,15}

Após a irradiação, as ostras analisadas apresentaram-se como as não irradiadas, ou seja, com as conchas firmemente fechadas e, portanto, viáveis. Essa observação, associada aos demais resultados obtidos, é de interesse na aplicação prática da irradiação como medida de intervenção aos riscos de saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Cook DW, Ruple AD. Indicator bacteria and Vibrionacea multiplication in postharvest shellstock oysters. *J Food Protect* 1986;52:343-9.
2. Elliot EL, Kaysner CA, Tamplin ML. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and others *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*, 7th ed. Arlington: AOAC International; 1992.
3. Eyles MJ, Davey GR. Microbiology of the commercial depuration on the Sydney Rock Oyster *Crassostrea commercialis*. *J Food Protect* 1984;47:703-6.
4. Falconer IR, editor. *Algae toxins in seafood and drinking water*. San Diego: Academic Press; 1993.
5. Fayer R, Gamble HR, Lichtenfels JR, Bier JW. Waterborne and foodborne parasites. In: Vanderzant C, Splittstoesser D, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3th ed. Washington (DC): APHA; 1992. Chap 41.
6. [ICMSF] International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbial ecology of foods. *Factors affecting life and death of microorganisms*. London: Academic Press; 1980. v. 1.
7. Institute of Medicine. Committee on Evaluation of the Safety of Fishery Products. *Seafood safety*. Washington (DC): National Academic Press; 1991. Chap 2, 3, 4 e 6.
8. Jay JM. Radiation preservation of foods and nature of microbial resistance. In: *Modern food microbiology*. 4th ed. New York: Chapman & Hall; 1992. Chap 12.
9. Kaysner AC, Tamplin ML, Twedt RM. *Vibrio*. In: Vanderzant C, Splittstoesser D, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): APHA; 1992. Chap 28.
10. Madden J, Mc Cardell BA, Reed R. *Vibrio cholerae* in shellfish from US coastal waters. *Food Techn* 1982;36:93-6.
11. Miescier JJ, Hunt DA, Redman J, Salinger A, Lucas JP. Molluscan shellfish: oysters, mussels, and clams. In: Vanderzant C, Splittstoesser D, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): APHA; 1992. Chap 48.
12. OPS-OMS/IAEA/FAO/ONU. *Consulta técnica conjunta sobre el uso de irradiación como medida de intervención de salud pública para el control de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Latino América y el Caribe*; 1992 Oct 19-21. Washington (DC); 1992.
13. PAHO/IAEA/FAO/WHO. *Final report of the 2nd Meeting of the IAEA/FAO/PAHO/WHO. Coordinated Research Project on Use of Irradiation as a Public Health Intervention Measure to Control Foodborne Disease in Latin America and the Caribbean*; 1997 April 1-5; Tampa, FL. Washington (DC): Pan American Health Organization; 1997.
14. Richards GP. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *J Food Protect* 1988;51:218-51.
15. Sang FC, Hugh-Jones ME, Hagstad V. Viability of *Vibrio cholerae* O1 on frog legs under frozen and refrigerated conditions and low dose radiation treatment. *J Food Protect* 1987;50:662-4.
16. Varnam AH, Evans MG. *Foodborne pathogens: an illustrated text*. London: Wolfe Publishing; 1991. p. 176-7.
17. Wood PC. The principles and methods employed for the sanitary control of molluscan shellfish. In: *Technical Conference on Marine Pollution and Its Effect on Living Resources and Fishing*. Rome: FAO/WHO; 1970. (MP/70/R-12).