JULIANA CHEN

**Pesquisa de Vibrio parahaemolyticus em atum
(Thunnus spp) comercializado na zona sul do município
de São Paulo – SP**

São Paulo

2004

JULIANA CHEN

**Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp)
comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1418
FMVZ

Chen, Juliana
Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp) comercializado na zona sul do município de São Paulo - SP / Juliana Chen. - São Paulo : J. Chen, 2004.
68 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva.

1. *Vibrio parahaemolyticus*. 2. Atum. 3. Pescado (microbiologia).
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp) comercializado na Zona Sul do Município de São Paulo", protocolo nº424/2004, utilizando amostras clínicas, sob a responsabilidade da Profª Drª Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 10 de março de 2004.

(We certify that the Research "*Vibrio parahaemolyticus* research in tuna fish (*Thunnus* spp) sold in south region of San Paolo City - SP" protocol number 424/2004, utilizing clinics sample, under the responsibility of Prof. Dr. Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 03/10/2004 meeting.

São Paulo, 10 de março de 2004

Profª Drª
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: CHEN, Juliana

Título: Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp) comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: __/10/2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado, acreditando, me apoiando e sustentando em todos os projetos da minha vida, com amor, paciência, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, pelas bênçãos derramadas, pela presença constante em minha vida, por ser a minha rocha, refúgio e fortaleza, me proporcionando segurança, confiança e fé. Pelo seu amor incondicional, e principalmente, por ser sua filha.

À Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva, pela oportunidade de estar realizando esse sonho, pela orientação, confiança e amizade que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Bispo e Sandra, pelo apoio, ajuda e amizade.

Ao Dr. Ernesto Hofer do Instituto Oswaldo Cruz pela doação de cepas controle de *Vibrio parahaemolyticus* e ensinamentos que foram fundamentais no desenvolvimento do trabalho.

Ao amigo Esequiel Liuson, pelos conselhos, indicação e auxílio no ingresso do curso de pós-graduação.

A todos os professores, pós-graduandos, funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e

Zootecnia da Universidade de São Paulo que de alguma maneira colaboraram com a concretização deste importante trabalho.

Ao Vinicius Musse Bezerra, por ser o meu maior incentivador, me apoiando em todos os momentos com muito entusiasmo, compreensão, companheirismo e amor.

À FAPESP que financiou esse projeto através do auxílio à pesquisa, processo 02/09720-1, e bolsa de mestrado, processo 02/04539-7.

RESUMO

CHEN, J. **Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus spp*) comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP.** [Study of *Vibrio parahaemolyticus* in tuna (*Thunnus spp*) traded in the south region of the city of São Paulo – SP]. 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Com o objetivo de avaliar a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em atum, foram coletadas 112 amostras, sendo 56 durante o inverno de 2003 (junho a julho) e 56, durante o verão de 2003-2004 (dezembro a janeiro), vendidos em diversos pontos comerciais da zona sul da cidade de São Paulo. Foi determinado o Número Mais Provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus*, comparando a contaminação observada durante os dois períodos. As cepas foram estudadas quanto à produção de urease, ao fenômeno de Kanagawa e à sensibilidade a antibióticos. Apenas 2,68% das amostras foram positivas (3/112). Dessas, duas amostras foram coletadas no verão e uma, no inverno. A amostra positiva obtida no inverno apresentou 3 NMP/g, as outras duas, coletadas durante o verão, apresentaram respectivamente, 3 e 4 NMP/g. Todas as cepas isoladas de *Vibrio parahaemolyticus* foram negativas ao teste de Kanagawa e não produtoras de Urease, não apresentando nenhuma característica patogênica. Todas as cepas foram resistentes a ampicilina, eritromicina, estreptomicina penicilina G, polimixina B e vancomicina. Apresentaram susceptibilidade intermediária a ciprofloxacina, kanamicina e gentamicina, e sensibilidade a ácido nalixídico, cloranfenicol e tetraciclina. Conclui-se que, nas condições desse estudo, o sashimi de atum revelou-se um alimento de baixo risco ao consumidor, no que se refere a infecção (toxigênica) por *Vibrio parahaemolyticus*.

Palavras-chave: *Vibrio parahaemolyticus*. Atum. Pescado (microbiologia).

ABSTRACT

CHEN, J. **Study of *Vibrio parahaemolyticus* in tuna (*Thunnus* spp) traded in the south region of the city of São Paulo – SP.** [Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp) comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP]. 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

In order to evaluate the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in tuna traded in retail stores in the south region of the city of São Paulo, 112 samples were collected, 56 during the winter of 2003 (June and July) and 56, during the summer of 2003-2004 (December to January). Most probable number (MPN) of *Vibrio parahaemolyticus* was determined, comparing the contamination level observed in the two periods. Strains were analyzed in relation to urease production, Kanagawa phenomenon and sensitivity to antibiotics. Only 2.68% of the samples were positive (3/112), two of them collected in the summer, and one of them, in the winter. The positive sample obtained in the winter presented 3 NMP/g, and the other two samples, collected in the summer, presented 3 and 4 NMP/g, respectively. All *Vibrio parahaemolyticus* samples isolated were Kanagawa, urease negative. Therefore, they did not present any pathogenic characteristic. All strains were resistant to ampicillin, erythromycin, streptomycin, penicillin G, polymyxin B and vancomycin. They presented intermediate susceptibility to ciprofloxacin, kanamycin and gentamicin, and sensitivity to nalidixic acid, chloramphenicol and tetracycline. It may be concluded that, in the conditions of this study, tuna sashimi is considered low risk food in relation to toxigenic infection by *Vibrio parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*. Tuna. Fishery (microbiology).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Histórico	16
2.2 Distribuição geográfica.....	16
2.3 Morfologia e Caracterização.....	17
2.4 Fisiologia	18
2.4.1 Exigências quanto ao Cloreto de Sódio.....	18
2.4.2 Temperatura e pH	18
2.4.3 Potencial de Oxido-Redução.....	18
2.5 Características patogênicas	19
2.5.1 Fenômeno Kanagawa	19
2.5.2 Produção de Urease	20
2.5.3 Invasibilidade e Citotoxicidade do <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21
2.6 Atum (<i>Thunnus</i> spp).....	22
2.7 Isolamento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em alimentos.....	23
2.8 Pesquisa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pelo método convencional e molecular.....	26
2.9 Surto e sintomas.....	27
2.10 Resistência a antibióticos	29
2.11 Medidas de Controle	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Obtenção das amostras de atum	33
3.2 Diluições.....	34

3.3	Determinação do número mais provável (NMP) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	34
3.3.1	Semeadura inicial em meio de enriquecimento.....	34
3.3.2	Semeadura em meio seletivo.....	35
3.3.3	Isolamento de colônias típicas e identificação bioquímica preliminar.....	35
3.3.4	Provas adicionais de identificação bioquímica	36
3.3.4.1	Citocromo-Oxidase.....	36
3.3.4.2	Hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina e ornitina	37
3.3.4.3	Prova do halofilismo (crescimento em 0, 6, 8 e 10% de Cloreto de Sódio).....	37
3.3.4.4	Teste de oxidação e fermentação (O/F) da glicose.....	38
3.3.4.5	Crescimento a 42°C	38
3.3.4.6	Prova de Voges-Proskauer	39
3.3.4.7	Fermentação de Carboidratos.....	39
3.3.5	Cálculo do NMP	40
3.4	Testes de patogenicidade:	40
3.4.1	Prova de Kanagawa	40
3.4.2	Prova da Urease	41
3.5	Sensibilidade frente a antimicrobianos.....	41
3.7	Análise estatística	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO.....	57

1 INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de pescado tem crescido a cada dia. Formado de nichos, é suprido tanto por produtos nacionais, como importados sendo os supermercados e feiras livres, os principais distribuidores.

A tendência do aumento gradativo no consumo mundial de peixe se deve, principalmente, à sua composição nutricional, a difusão de culturas e hábitos alimentares, bem como a facilidade de importação e exportação de alimentos, ocorridos em função da globalização.

Atualmente existem inúmeros restaurantes de comida japonesa no município de São Paulo, a difusão do consumo de pratos da culinária japonesa que utilizam pescado cru ou parcialmente cozido, como sashimi e sushi, aumenta o risco de ocorrência de surto de toxinfecção alimentar, já que esse alimentos não passam por nenhum processo capaz de diminuir o número de eventuais microrganismos patogênicos presentes no alimento, por exemplo, cozimento ou fritura.

A pesca do atum é regulamentada pela Comissão Internacional para a Conservação do Atum Atlântico (ICCAT), que fixa a cota máxima anual permitida para captura e desembarque de cada país. Em 1997, a ICCAT estabeleceu cotas baseadas nas capturas realizadas por cada país que possuem frotas operando no Atlântico Sul, coube ao Brasil somente 16% do volume total da produção autorizada (MERCADO DA PESCA, 2004).

Os atuns são peixes de grande valor comercial, pois a sua carne presta-se particularmente à transformação. Esta razão torna-os sobremaneira apetecidos pelas atividades da pesca, até porque a sua procura mundial não cessa de aumentar.

O *Vibrio parahaemolyticus* tem sido o responsável por grande número de casos de gastroenterites associados ao consumo de peixes, moluscos e crustáceos do mar crus ou mal cozidos (ZEN et al., 1965), sendo considerado um importante agente de infecção toxigênica de origem alimentar (HASEGAWA et al., 1999). Os principais sintomas da enfermidade são dores abdominais, diarreia, náusea e vômito, em muitos casos pode apresentar febre, calafrios e cefaléia. Em casos avançados, ocorre disenteria com fezes mucóides e sanguinolentas. A doença causada pelo *Vibrio parahaemolyticus* foi chamada de “Diarreia de Verão Japonesa”, pois há maior incidência nas épocas mais quentes do ano (KODAMA, 1968).

Sabe-se atualmente que a gastroenterite causada pelo *Vibrio parahaemolyticus* é conseqüente à ação da hemolisina termoestável direta (Tdh) e/ou hemolisina termoestável relacionada a Tdh (Trh). A hemolisina Tdh causa beta-hemólise em meio Wagatsuma, fenômeno conhecido como Kanagawa-positivo (KP+), que é empregado como teste para avaliar se uma cepa é produtora dessa hemolisina (FRANCO; LANDGRAF, 1996). O diagnóstico para detecção de bactérias Trh-positiva pode ser realizada através da produção da urease, pois o gene *ure*, responsável pela produção de urease, e o gene *trh* estão geneticamente interligados (LIDA et al., 1998).

Levando-se em consideração a importância deste agente para a saúde pública, a carência de informações quanto ao grau de contaminação dos pescados e o aumento do consumo de peixes crus, esse estudo teve como objetivos:

- Determinar o Número Mais Provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp) vendidos em diferentes pontos comerciais da zona sul da cidade de São Paulo;

- Interpretar o resultado de NMP/g de *Vibrio parahaemolyticus*, segundo o critério oficial de aprovação para o consumo humano;
- Comparar a contaminação por *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de atum obtidas durante o inverno e o verão;
- Caracterizar as cepas de *Vibrio parahaemolyticus* identificadas quanto à produção de urease e realizar o estudo do fenômeno de Kanagawa e;
- Estudar a sensibilidade do *Vibrio parahaemolyticus* frente a diferentes antibióticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

O primeiro relato da doença causada por esse agente foi em 1950, Osaka, Japão, quando Fujino et al. (1951) isolaram essa bactéria de um alimento chamado “Shirasu”, prato típico japonês à base de sardinha. Esse alimento foi responsável por 272 casos e 20 óbitos.

Essa doença foi chamada de “Diarréia de Verão Japonesa”, pois 50% dos casos de diarreias causados por esse microrganismo, na década de 60, ocorreram na estação de verão, época mais quente do ano, superando o número total dos casos de salmonelose e shigelose no país (KODAMA, 1968).

No Brasil, esse agente foi isolado pela primeira vez em 1983, a partir de um caso de gastroenterite humana (HOFER, 1983).

2.2 Distribuição geográfica

Essa bactéria é encontrada, freqüentemente, em regiões tropicais e subtropicais. Possui distribuição cosmopolita, sendo relatado casos nos Estados Unidos, México, Espanha, Togo, Japão, Taiwan, Golfo Pérsico, Grã-Bretanha (MONSREAL; ABUXAPQUI, 1988) e, no Brasil, diversos estudos evidenciaram a sua presença em águas e animais marinhos (MAGALHÃES et al., 1991).

O *Vibrio parahaemolyticus* é isolado de águas da costa e de estuários, sedimentos, alimentos marinhos como peixes, crustáceos e moluscos, principalmente nos meses mais quentes do ano quando a temperatura da água do mar é mais elevada (ICMSF, 1978).

2.3 Morfologia e Caracterização

O *Vibrio parahaemolyticus* é um bacilo Gram negativo halofílico, reto ou ligeiramente curvo, pleomórfico, móvel, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Vibrionaceae*, não esporulado, medindo 1 a 3µm de comprimento e 0,4 a 0,6µm de diâmetro (SAKAZAKI et al, 1968). Possui um flagelo polar simples quando multiplicam em meio líquido e, quando cultivado em meio sólido, desenvolvem numerosos flagelos laterais em adição ao flagelo polar (COLWELL, 1975).

É encontrado naturalmente em águas costeira e estuarina do mundo inteiro, sua ocorrência é sazonal, sendo encontrada principalmente em períodos de estações mais quentes (COLWELL, 1975). As colônias, após 18-24 horas de incubação em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), apresentam-se com 2 a 5mm de diâmetro, circulares, convexas e lisas, com coloração azul-esverdeada (KODAMA, 1968).

Os *Vibrio parahaemolyticus* apresentam motilidade, não são produtores de H₂S em meio ágar tríplice açúcar ferro, são positivo às reações de oxidase e gelatinase; reduzem o nitrato em nitrito; fermentam os seguintes carboidratos: galactose, glicose, manose, trealose, manitol e não fermentam lactose, sacarose, eritritol, inositol, xilose e sorbitol, apresentam variações quanto a fermentação da celobiose, arabinose e salicina. São Voges-Proskauer (VP) negativo, hidrólise de esculina, amido e caseína positivas e hidrólise de arginina negativa. Fazem a descarboxilação da lisina e da ornitina (SAKAZAKI, 1983). Esse microrganismo apresenta três tipos de antígenos: somático termoestável – O, capsular termolábil – K e o flagelar – H (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A sorotipagem desse agente é baseada nos antígenos O e K reconhecidos. Por ser comum a todas as cepas, o antígeno H não é empregado nessa prova. Atualmente existem 13 grupos

sorológicos do antígeno O e 75 grupos do antígeno K, sendo que 5 dos antígenos K ocorrem em dois diferentes grupos de antígeno O. O diagnóstico sorológico é feito através do método de soro aglutinação rápida, utilizando o kit produzido no Japão, pelo laboratório Denka-Seiken K.K.. Por ser muito cara, essa análise não é realizada em laboratórios de rotina (VIEIRA, 2003).

2.4 Fisiologia

2.4.1 Exigências quanto ao Cloreto de Sódio: crescem em concentrações entre 2 e 8% desse sal, não crescendo na ausência ou concentrações igual ou maior que 10%, sendo a concentração entre 2 e 3% ótima para o crescimento desse microrganismo (SAKAZAKI, 1968).

2.4.2 Temperatura e pH: crescem em temperaturas na faixa de 5 a 44°C, dependendo do pH do meio de cultura, sendo 35°C e pH entre 7,5-8,5 o ideal para crescimento (FRANCO; LANDGRAF, 1996; OPAS, 2001).

2.4.3 Potencial de Oxido-Redução: o *Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria anaeróbia facultativa, possui dois tipos de metabolismo, o respiratório e o fermentativo (BEUCHAT, 1982).

2.5 Características patogênicas

Os fatores de patogenicidade desse agente estão relacionados à capacidade da bactéria de produzir enzimas hemolítica citotóxica denominadas Hemolisina Termoestável Direta (Tdh), Hemolisina Termoestável Relacionada com Tdh (Trh) (HONDA; NI; MIWATANI, 1988) e/ou Urease (SUTHIENKUL et al., 1995). Nem

todos os *Vibrio parahaemolyticus* produzem essas substâncias, podendo produzir todos, alguns ou nenhum, nesse último caso, são considerados apatogênicos.

No entanto, a patogenicidade não é atribuída apenas à produção dessas toxinas, mas também à capacidade de invasão do agente em células epiteliais intestinais (AKEDA et al., 1997).

2.5.1 Fenômeno Kanagawa: a hemolisina termoestável direta (Tdh) é uma enterotoxina citotóxica que atua dentro e fora da célula hospedeiro, induzindo à morte através da apoptose e necrose (NAIM; YANAGIHARA; HONDA, 2001). A Tdh atua diretamente nos eritrócitos de diversas espécies de hospedeiro, levando à hemólise (SAKURAI; MATSUZAKI; MIWATANI, 1973) e aumento da permeabilidade vascular (NISHIBUCHI; ISHIBASHI; KAPER, 1985). Nishibuchi et al. (1992) demonstraram que essa hemolisina induz ao acúmulo de fluido no intestino delgado de coelhos, no entanto, não se sabe muito bem o mecanismo de ação no desencadeamento da diarreia.

A beta-hemólise em meio Wagatsuma, conhecido como fenômeno de Kanagawa (KP) ou Kanagawa-positivo (KP^+), revela a produção de Tdh (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A capacidade de produção de Tdh é considerada o principal fator de virulência, sendo utilizado na classificação do agente quanto a patogenicidade (NISHIBUSHI; KAPER, 1995). O gene *tdh2*, um dos dois genes (*tdh1* e *tdh2*) presentes em cepas Kanagawa-positivo, provavelmente é responsável pela atividade hemolítica da Tdh, a presença isolada do gene *tdh1* não caracteriza o agente como produtor da hemolisina (OKUDA; NISHIBUCHI, 1998). Os autores ressaltam que é possível a ocorrência de mutação genética de cepas que apresentam somente o gene *tdh1*, ou seja, Kanagawa-negativo, que passariam a

apresentar também o gene *tdh2*, alterando assim, sua característica de virulência, tornando-o potencialmente patogênico.

2.5.2 Produção de Urease: antes de identificarem a hemolisina Trh, acreditava-se que apenas as cepas Kanagawa-positivo eram virulentas, no entanto, é grande a incidência de intoxicação alimentar causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa-negativo (3,5 a 11,6% dos casos) (HACKNEY; KLEEMAN; SPECK, 1980). Honda et al. (1987) isolaram cepas de *Vibrio parahaemolyticus* kanagawa-negativo, a partir de fezes de pacientes envolvidos em surtos de gastroenterite na República das Maldivas, essas cepas apresentavam atividade hemolítica. Em 1988, Honda, Ni e Miwatani identificaram essa nova hemolisina, a qual deram nome de Trh (Thermostable Related Hemolysin). Sabe-se atualmente que a gastroenterite acometida pelo consumo de pescados crus pode ser conseqüente à ação da Tdh e/ou Trh.

A proporção de cepas Trh-positivas isoladas de casos clínicos têm aumentado, há uma forte correlação entre a presença do gene *trh* e a produção de urease (MAGALHÃES et al., 1992). Na Tailândia, 489 cepas isoladas de casos clínicos foram examinadas, dessas, 8% eram Urease-positiva. Lida et al. (1998) analisaram a distância entre o gene *ure*, responsável pela produção de urease, e o gene *trh* no cromossomo do *Vibrio parahaemolyticus* e descobriram que ambos estão localizados no mesmo fragmento, a poucos kilobases de distância, sugerindo que os genes *ure* e *trh* estão geneticamente interligados e que a produção de urease pode ser utilizada como diagnóstico para detecção de bactérias Trh-positiva (KELLY; STROH, 1989).

A atividade da urease de várias outras espécies de bactéria tem sido relatada como um importante fator de virulência. Sidebotham e Baron (1990) citam que a urease inibe a síntese de muco na parede intestinal, facilitando a colonização de bactérias e provável formação de úlceras, Hazell e Lee (1986) sugerem que a alta concentração de íons amônia, produto da atividade da urease altera a permeabilidade da mucosa intestinal, além de ser um importante fator patogênico quanto às lesões inflamatórias gastrintestinais.

Magalhães et al. (1991) observaram que 38% das 21 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de casos de gastroenterite humana, em Recife, eram urease positiva, sendo que a maioria dessas cepas eram fenômeno de Kanagawa-negativo.

DePaola et al (2003) detectaram cepas patogênicas de *Vibrio parahaemolyticus* em 21,8% de amostras de ostras (34/156). Observaram que, das cepas patogênicas (KP), 97,4% também eram produtoras de urease e possuíam o gene *trh*.

2.5.3 Invasibilidade e Citotoxicidade do *Vibrio parahaemolyticus*: a capacidade de adesão da célula bacteriana na célula hospedeira está correlacionada com a habilidade de muitas espécies de microrganismo causarem infecção na superfície epitelial do trato intestinal, respiratório, urinário e genital (SMITH, 1977). A patogenicidade do *Vibrio parahaemolyticus* não deve ser atribuída apenas à produção de toxina, mas também à capacidade de invasão em tecido epitelial intestinal, isso foi observado após a invasão de 20% (4/21) das cepas, isoladas de casos clínicos e ambientes, nas células “Caco-2” (*human colon*

carcinoma-derived cell line) , dessas, uma era produtora de hemolisina Tdh e as outras três, de Trh. (AKEDA et al., 1997).

Boutin et al. (1979) pesquisaram a invasibilidade desse microrganismo. Os resultados demonstraram que essa bactéria tem um poder invasor considerável, podendo disseminar pelo organismo através do sistema linfático ou circulatório, causando septicemia.

Merrel, Walker e Joseph (1983) estudaram os efeitos patológicos do *Vibrio parahaemolyticus* sobre células epiteliais humanas, concluíram que a bactéria sem flagelo não adere na célula de tecido normal ou degenerado, já os microrganismos com flagelos, de culturas livres de células, afetam as células epiteliais. Tais resultados indicam que o agente possui um fator citotóxico que altera as células e deve estar associado com organismos viáveis, podendo ser um elemento funcional no processo de aderência do *Vibrio parahaemolyticus* às células epiteliais de mamíferos. Os flagelos são importantes para a locomoção e adesão do agente na célula hospedeira (McCARTER, 2001). Hsieh et al. (2003) verificaram que o antígeno K, composto por cápsula de polissacarídeo também é responsável pela capacidade de aderência do agente.

2.6 Atum (*Thunnus* spp)

O atum (*Thunnus* spp), peixe presente em todo o litoral brasileiro, freqüentam o mar aberto em grandes cardumes, normalmente acompanhados por golfinhos e baleias. É um dos peixes mais consumidos como sashimi e sushi, para preparar esses pratos, devem ser utilizados apenas peixes frescos e de alta qualidade (MILES; SMITH, 1994). O sashimi consiste em fatias de peixes crus que são consumidos com molho de soja e raiz forte, conhecido como Wasabi (*Wasabia*

japonica), o sushi pode ser feito com vários ingredientes, inclusive com peixe cru; o peixe é envolvido por bolinho de arroz com vinagre e folha de alga desidratada (HASEGAWA et al., 1999).

2.7 Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos

A presença de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos tem sido relatada por vários autores, embora pouco se tem registrado sobre a ocorrência do agente em peixes, especialmente em atuns destinados ao consumo cru em pratos como sushi e sashimi.

O primeiro relato sobre isolamento de *Vibrio parahaemolyticus*, no México, foi feito por Recasens, López e Reyes, em 1974, quando pesquisaram a bactéria em 103 amostras de mariscos crus na cidade de Puebla – México, obtendo seis cepas, sendo quatro produtoras de hemólise.

Monsreal e Abuxapqui (1988) analisaram 32 amostras de alimentos provenientes do mar, sendo 18, crus (ostras e peixes) e 14, insuficientemente cozidos (camarões e ostras) e isolaram *Vibrio parahaemolyticus* de 2 amostras de peixe.

Estudando a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em 671 moluscos coletados ao longo da costa atlântica dos Estados Unidos, Cook, Bowers e DePaola (2002) detectaram o agente em 61,4% das amostras enquanto que em 6% do total de amostras foram detectadas cepas Kanagawa-positivo. Ao comparar resultados de plaqueamento direto e enriquecimento, os autores mostraram que o último método é mais sensível na detecção de cepas patogênicas, principalmente, em amostras oriundas de águas com temperaturas baixas.

DePaola et al. (2003), em estudo sobre a microbiota patogênica e total de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas, isolaram cepas patogênicas em 21,8% das amostras (34/156).

Em 2003, Kaufman et al. pesquisaram a variabilidade nos níveis de *Vibrio parahaemolyticus* total e patogênico em ostras imediatamente submetidas à análise (30 amostras) e após 24h estocadas a 26°C (30 amostras). Antes da estocagem, a microbiota total do agente foi detectada em aproximadamente 90% das amostras mas o *Vibrio parahaemolyticus* patogênico foi isolado em 40%, variando entre 10 a 20 UFC/g. Após a estocagem, os níveis do agente aumentaram cerca de 26 vezes e o *Vibrio parahaemolyticus* patogênico chegou a ser detectado em níveis superiores a 10^2 UFC/g.

O único trabalho encontrado sobre isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em sashimi foi realizado por Shih et al. (1997), em Taiwan. Foram analisados 120 amostras de sashimi coletados em pequenos mercados, supermercados e outros estabelecimentos varejistas de Taipei, o *Vibrio parahaemolyticus* foi isolado de 13,3% das amostras.

Cento e dezessete amostras de pescados (100 peixes, 10 camarões e 7 moluscos) foram coletados no mar Adriático, Croácia, para pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, o agente foi isolado de 11 amostras, sendo 4 de peixes, 2 de camarões e 5 de moluscos (JAKSIC et al., 2002).

A ocorrência dos genes *trh* e *tdh* em cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de pescados importados pela França foi registrada em 1,5% (2/130) do total de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* analisadas por Robert-Pillot et al. (2003).

Também no Brasil o agente tem sido pesquisado em alimentos, principalmente em moluscos, como ostras e mexilhões. Existem alguns trabalhos realizados com lagostas e camarões, no entanto, há poucos com peixes.

Em 1991, Magalhães et al., estudaram as características bioquímicas, sorológicas, de produção de hemolisina e resistência às drogas antimicrobianas de 24 linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* obtidas de ostras e verificaram que nenhum dos isolados produziu urease ou hemolisina.

Matté et al. (1994) analisaram ostras originadas na costa sul do estado de São Paulo e isolaram *Vibrio parahaemolyticus* em 77% (20/26) das amostras. Dos 88 isolados obtidos, apenas um (1,1%) foi Kanagawa-positivo e, portanto, considerado potencialmente patogênico.

Analisando a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em 40 amostras de mexilhões, em Palhoça – SC, Archer e Moretto (1994) encontraram o agente em 52,5% das amostras, embora o número registrado tenha sido inferior a 93 NMP/g, abaixo do limite máximo tolerável pela RDC n.12; ressaltaram que todas as cepas foram Kanagawa-negativo.

Landgraf, Leme e Moreno (1996) realizaram um estudo sobre a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em 100 amostras de pescados (56 ostras, 24 camarões e 20 mexilhões) obtidas de estabelecimentos comerciais do município de São Paulo e constataram que 87,5% das amostras de ostras, 4,2% de camarões e 50% de mexilhões eram portadores do agente.

Barboni (2003) estudando *Vibrio* spp potencialmente patogênico em 107 amostras de moluscos bivalves comercializados na Bahia, observou que a maior ocorrência de *Vibrios* por molusco bivalve foi da espécie *Vibrio parahaemolyticus* (35 amostras).

Hofer e Silva (1986) analisaram 82 peixes marinhos de diferentes espécies, provenientes da faixa litorânea entre Bahia e Rio Grande do Sul, e constataram que 54,8% eram portadores de *Vibrio parahaemolyticus*. Os autores obtiveram 71 culturas do agente e nenhuma foi Kanagawa-positivo.

2.8 Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* pelo método convencional e molecular

Recentemente, muitas pesquisas de *Vibrio parahaemolyticus* têm utilizado técnicas moleculares, à semelhança do que acontece em vários outros setores da pesquisa científica.

Em estudo comparativo entre o método microbiológico convencional e a técnica molecular PCR (polimerase chain reaction), Dileep et al., em 2003, analisaram 86 amostras de pescados e obtiveram 28 positivas, segundo o convencional e 53, utilizando a técnica molecular.

Quando a população de *Vibrio parahaemolyticus* é transferida de um meio rico para um meio pobre em nutrientes, ou submetida a baixas temperaturas, algumas células perdem a capacidade de se multiplicar, isto é, mantêm-se viáveis porém não cultiváveis, entretanto podem manter também o potencial patogênico (NISHINO et al, 2003). Este estado, viáveis e não cultiváveis, pode tornar as cepas patogênicas mais resistentes a qualquer procedimento convencional de processamento de alimentos (COLWELL et al., 1985), não sendo, no entanto, detectadas pelas técnicas convencionas de quantificação do agente.

Alam et al. (2002) também realizaram um estudo comparativo entre os métodos tradicional e molecular e constataram 95% de amostras (19/20) positivas para a presença de *Vibrio parahaemolyticus* pelo método PCR, enquanto apenas 40% (8/20), pelo método convencional. Essa diferença foi significativa e atribuída à

possível presença de células viáveis mas não cultiváveis e ao menor limite de detecção do método molecular.

2.9 Surtos e sintomas

Para que ocorra a infecção, o indivíduo saudável deve ingerir alimento contaminado com $10^5 - 10^7$ UFC por grama de alimento (FRANCO; LANDGRAF, 1996). O período de incubação da enfermidade é curto, podendo oscilar entre 2 a 48 horas, sendo mais freqüente 10 a 20 horas. Esse período depende do número de microrganismos ingerido, a forma consumida do alimento e da acidez gástrica. O tempo de multiplicação do *Vibrio parahaemolyticus* é extremamente curto, em torno de 9 a 11 minutos (RECASENS; LÓPEZ; REYES, 1974).

A taxa de morbidade dessa enfermidade é de 5 a 61% e de mortalidade, menor que 1%. Os principais sintomas são dores abdominais (85-96%) e diarreia, associados à náusea (46-63%) e vômito (33-59%) e em muitos casos pode apresentar febre (28-34%), calafrio (45-71%) e cefaléia (33-46%). Em casos avançados, ocorre disenteria com fezes mucóides e sanguinolentas (3-5%). A recuperação completa demora entre 2 a 5 dias (RECASENS; LÓPEZ; REYES, 1974).

O *Vibrio parahaemolyticus* é responsável também por causar lesões não entéricas em pessoas que mantêm ou mantiveram contato com o ambiente marinho. Rodrigues et al. (2001) isolaram o agente em 18% (9/50) dos pescadores examinados no município de Raposa, Maranhão, que apresentavam feridas cutâneas. As lesões predominavam nos membros inferiores, apresentando hiperemia, edema, secreção e dor.

Deve-se levar em consideração as doenças pré-existentes, como insuficiência hepática, diabetes, alcoolismo, problemas gastrintestinais e imunodeficiência, pois estes determinam a ocorrência e severidade da doença (HLADY; KLONTZ, 1996).

No Japão, o *Vibrio parahaemolyticus* é responsável por 75% dos surtos de toxinfecção alimentar ocorridos nos meses de verão (OKABE, 1974). No período entre 1987 e 1996, Cato (1998) registrou a ocorrência de 860 surtos que resultou em mais de 17 mil casos de gastroenterite causados por esse agente.

Spite, Brown e Twedt, (1978) analisando ostras cruas suspeitas de estarem envolvidas em um surto de gastroenterite aguda nos Estados Unidos isolaram uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa-positivo. Salientam que esse pode ter sido o primeiro relato de surto causado por esse agente no país.

Entre Julho e Setembro de 1998, foram notificados surtos de infecções pelo *Vibrio parahaemolyticus* associado ao consumo de ostras e outros moluscos em Connecticut, New Jersey e Nova Iorque. Foram acometidas 23 pessoas, os sintomas apareceram 19 horas após o consumo. Estudou-se a história clínica de 19 pessoas, 89% apresentaram gastroenterite e 11%, septicemia com edema nas extremidades. Das pessoas que apresentaram gastroenterite, 100% estavam com diarreia, 94% com dores abdominais, 94% com náusea, 82% com vômito, 47% com febre, 24% com cefaléia e 24% com mialgia. A doença durou, em média, 5 dias (TALAN; MORAN; PINNER, 1999).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos estima que ocorram anualmente 5100 casos de infecções por *Vibrio parahaemolyticus* no país. Verificou-se que os homens eram os mais acometidos (64%); 59% das pessoas apresentaram gastroenterites e, 17%, otite, conjuntivite, peritonite e septicemia, após banho no Golfo do México. A taxa de mortalidade,

entre 1988 e 1997, foi de 4%, sendo que a principal causa *mortis* foi a grave gastroenterite e septicemia. Em todos os casos, isolou-se apenas o *Vibrio parahaemolyticus* sorotipo O3:K6, muito comum nos países asiáticos, mas que até aquele momento, nunca havia sido isolado naquele país (DANIELS et al., 2000).

O primeiro isolamento e identificação de infecção gastrointestinal humana no Brasil foi descrito por Hofer em 1983. O autor relatou que, em meados de junho de 1975, na cidade de Cascavel, Ceará, ocorreu um surto de gastroenterite, atingindo adultos e crianças; a análise das fezes de uma das crianças revelou o *Vibrio parahaemolyticus*.

2.10 Resistência a antibióticos

A determinação da sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos é uma das provas mais solicitadas. A terapêutica depende, muitas vezes, do conhecimento da sensibilidade do microrganismo infectante (MAMIZUKA, 1982). A resistência a antimicrobianos tem determinado impasses de ordem clínica e epidemiológica com repercussão ambiental.

Devido à importância desse fato no tratamento das infecções, Molitoris et al. (1985) testaram a susceptibilidade de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aos seguintes antibióticos: ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); cefalina (30 µg); colimicina (10µg); eritromicina (15µg); gentamicina (10µg); kanamicina (30µg); lincomicina (2µg); metilicina (5µg); nafcilina (1µg); ácido nalidíxico (30µg); neomicina (30µg); penicilina (10U), polimixina B (300U); estreptomicina (10µg); tetraciclina (30 µg), tendo verificado que o *Vibrio parahaemolyticus* foi sensível ao cloranfenicol e resistente à lincomicina, nafcilina, penicilina, polimixina B, colimicina e ampicilina.

Em 1991, Magalhães et al. estudaram a resistência de 24 cepas, obtidas de ostras, às drogas antimicrobianas e registrou que todas as culturas, exceto uma, foram resistentes à ampicilina e susceptíveis à cefalotina, estreptomicina, neomicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, cotrimoxazol, nitrofurantoína e lomefloxacin.

Lozano-León et al. (2003) testaram a sensibilidade de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* frente a diferentes antibióticos, isolados de surtos de gastroenterite aguda que ocorreram em Galícia, Espanha. Todas as cepas foram resistentes a ampicilina, eritromicina, estreptomicina e vancomicina. Apresentaram susceptibilidade intermediária a gentamicina, cefazolina e cefuroxima, e sensibilidade a amoxicilina-clavulín, ceftriaxona, cefatoxima, cefoxitina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetropim.

2.11 Medidas de Controle

O fato de ser necessária uma carga microbiana relativamente alta no alimento para que determine uma infecção no consumidor, de acordo com Franco e Landgraf (1996), explica a normatização pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC n.12, que estabelece limites para *Vibrio parahaemolyticus* e outros microrganismo em pescado. Em pratos prontos como sashimi e sushi, a tolerância máxima de *Vibrio parahaemolyticus* para amostra indicativa é de 10^3 NMP/g e para amostra representativa, de $n=5$, $c=2$, $m=10^2$ NMP/g, $M=10^3$ NMP/g (BRASIL, 2001).

Organizações internacionais, no entanto, estabelecem níveis mais rígidos. A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), por exemplo, recomenda no máximo de 10^2 UFC/g para pescado marinho (ICMSF, 1986).

Assim, as medidas de controle estão baseadas em métodos que reduzam a contaminação, inibam a multiplicação, eliminem os agentes ou os reduzam a níveis aceitáveis; entre esses métodos estão a adequada refrigeração ($\leq 5^{\circ}\text{C}$), congelamento, tratamento térmico adequado ($\geq 75^{\circ}\text{C}$) e a prevenção da contaminação após o tratamento térmico (FRANCO; LANDGRAF, 1996; OPAS, 2001).

Grande quantidade de *Vibrio parahaemolyticus* é inativado em baixas temperaturas (4°C , -18°C e -24°C), o tempo mínimo de exposição para inativar totalmente esse microrganismo depende do número inicial da população e a temperatura à que estava exposto (MUNTADA et al., 1995). Isso também foi verificada por Vasudevan et al (2002), eles concluíram que, apesar do *Vibrio parahaemolyticus* ser capaz de crescer em baixas temperaturas, a refrigeração (4°C) ou congelamento (-20°C) inativa um grande número desse agente. Não obstante, não podem ser considerados como métodos eficazes para a eliminação do agente, já que um pequeno número de sobreviventes pode se multiplicar rapidamente e formar uma grande população, quando o alimento é mantido em refrigeração inadequada, mesmo em meios pobres em nutrientes (JIANG; CHAI, 1996). Magalhães et al. (2000) recuperaram cepas de *Vibrio parahaemolyticus* dois meses após a inoculação do agente em homogeneizados de cauda de lagosta, mantidos nas temperaturas de -25°C e 6°C .

DePaola et al. (2003) verificaram que há uma relação inversa entre a temperatura da água e a prevalência de cepas patogênicas. Os autores explicam que a maior taxa de detecção de *Vibrio parahaemolyticus* patogênicos no inverno poderia ser em função da diminuição da prevalência do *Vibrio parahaemolyticus* total e não a uma maior abundância de cepas patogênicas.

Novas tecnologias, como pasteurização, tratamento em alta pressão e irradiação têm sido empregados para reduzir ou eliminar a contaminação.

Calik et al. (2002) afirma que a inativação pela alta pressão depende do tempo de exposição e pressão a qual o agente é submetido. Para reduzir ou eliminar o *Vibrio parahaemolyticus*, foi necessário uma pressão de 345 MPa por 30 e 90 segundo, respectivamente.

Jakabi et al. (2002), verificaram que a irradiação com dose de 3,0kGy foi eficiente na inativação de *Vibrio parahaemolyticus* presentes em ostras, contaminadas experimentalmente, não acarretando alterações no odor, sabor e aparência do alimento.

Deve-se evitar o consumo de frutos do mar crus, mal cozidos ou preparados em locais com precária higiene de equipamentos, utensílios e manipuladores (LEITÃO, 1988) e, portanto, a promoção de educação sanitária e capacitação dos manipuladores de alimentos é fundamental no controle da transmissão alimentar da doença causada por esse agente (BARBONI, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de atum: foram coletadas de diversos pontos comerciais da zona sul da cidade de São Paulo, como restaurantes, feiras, peixarias e mercados municipais, 112 amostras de atum ($\pm 100\text{g}/\text{amostra}$), sendo 56 durante o inverno de 2003 (junho a julho) e 56, durante o verão de 2003 - 2004 (dezembro a janeiro).

No inverno, foram obtidas 39 amostras de bancas de feiras livres, 04 de peixarias, 02 de supermercados e 11 de restaurantes, já no verão, foram coletadas 37 amostras de bancas de feiras livres, 10 de restaurantes, 08 de peixarias e 01 de supermercado.

Evitou-se a compra de quantidades superiores a duas amostras de um mesmo estabelecimento, num mesmo período. Como as coletas foram feitas em dias diferentes da semana, encontrou-se, mais de uma vez, uma mesma banca em outro endereço, numa mesma semana, nesse caso, não foi efetuada a aquisição. Foram raros os momentos que os supermercados comercializaram atum em filé ou posta, freqüentemente era vendido como peixe inteiro.

As amostras foram mantidas sob refrigeração, até a chegada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Setor de Higiene Alimentar do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram processadas dentro de no máximo 6 horas após a coleta, em condições assépticas.

3.2 Diluições: uma alíquota de 25g de cada amostra foi homogeneizada em 225mL de solução estéril de Cloreto de Sódio a 3%, durante um minuto, em *Stomacker*, em velocidade normal, por um minuto. A partir dessa diluição (10^{-1}), foram feitas três diluições decimais sucessivas em Cloreto de Sódio a 3%.

3.3 Determinação do número mais provável (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus*

Para acompanhamento de todos os testes de identificação bioquímica, utilizou-se uma cultura controle cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz (cepa 17381), Rio de Janeiro-RJ.

3.3.1 Semeadura inicial em meio de enriquecimento: o isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* normalmente envolve a etapa de enriquecimento. A partir das diluições realizadas em Cloreto de Sódio 3%, foi inoculado 1mL de cada diluição em tubos contendo Água Peptonada Alcalina (APSW), em triplicata e incubados durante 18 a 24 horas a 35°C (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

A Água Peptonada Salina Alcalina (APSW) tem apresentado melhor eficiência como meio de enriquecimento, inclusive, no isolamento de bactérias presentes em alimentos refrigerados e/ou congeladas (OLIVER; KAPER, 1997). Dupray e Cormier (1983), verificaram melhor desempenho em relação ao Caldo Glicose Sal Teepol (GSTB), recomendado pelo FDA até 1984, quando o ingrediente Teepol parou de ser comercializado. Conseqüentemente o FDA modificou os procedimentos, substituindo esse meio por Caldo Polimixina B Salina (PBS) e Água Peptonada Salina Alcalina (APSW). Hagen et al. (1994), ao comparar a eficiência entre esses dois meios, constataram, a partir de análises microbiológicas, que a APSW, era capaz de detectar *Vibrio parahaemolyticus* em baixas concentrações

(aproximadamente 1UFC/g), demonstrando maior eficácia na recuperação de células estressadas, comparativamente ao meio PBS, que nas mesmas condições revelou resultado negativo.

3.3.2 Semeadura em meio seletivo: de cada tubo que apresentou turvação, foi coletada, com alça, sem agitar o tubo, uma alíquota do material da superfície do meio, onde se concentra a massa de células. Essa alíquota foi semeada em estrias na superfície de Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), e incubada por 18 a 24 horas a 35°C (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

3.3.3 Isolamento de colônias típicas e identificação bioquímica preliminar: de cada placa de Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) que apresentou colônias suspeitas (circulares, de 2 a 3mm de diâmetro, de coloração azul-esverdeada, mostrando-se, portanto, não fermentadoras de sacarose), selecionou-se 3 colônias que foram submetidas às provas bioquímicas iniciais. Cada uma dessas colônias foi repicada simultaneamente, em profundidade, utilizando alça de níquel-cromo agulha, nos ágares: TSA (Tryptic Soy Agar), SIM (Sulfide, Indole and motility) e TSI (Triple Sugar Iron), todos contendo 3% de Cloreto de Sódio e incubados por 18 a 24 horas a 35°C.

A partir do ágar TSA foram pesquisadas as características tintorial (Gram) e morfológica da colônia. Dos ágares TSI e SIM realizou-se as provas bioquímicas de triagem; foram consideradas suspeitas as colônias, cujas células mostraram-se como bacilos Gram-negativos, polimorfos; que no TSI apresentaram tubo com o fundo ácido (amarelo) e bisel alcalino (vermelho), sem produção de gás (ausência de bolhas e deslocamento do ágar) e sem produção de H₂S (ausência de precipitado

enegrecido) e no meio SIM apresentaram-se móveis e produtoras de Indol, revelado pelo reagente Kovac's.

As colônias suspeitas foram, então, submetidas às provas adicionais de identificação bioquímica (FISHBEIN; WENTZ, 1973).

3.3.4 Provas adicionais de identificação bioquímica: as provas utilizadas para identificação e confirmação do agente foram citocromo-oxidase, hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina e ornitina; prova do halofilismo, teste de oxidação e fermentação (O/F) da glicose, do crescimento a 42°C, de Voges-Proskauer e a prova de fermentação dos carboidratos: manose, lactose, manitol, trealose, arabinose e celobiose. Os procedimentos e interpretação dessas provas estão descritos a seguir.

3.3.4.1 Citocromo-Oxidase: foi colocado um disco de papel de filtro no interior de uma placa de Petri estéril, em seguida, esse papel foi umedecido com o reativo de oxidase (Tetrametil p-fenilenodiamino 1%) e secado em temperatura ambiente.

Porções do crescimento das cepas provenientes do TSA 3% NaCl, incubadas durante 24 horas a 35°C, foram colhidos com palito de madeira estéril e estendidos sobre a área reagente do papel, visando produzir um pequeno risco (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

As colônias que possuem atividade de citocromo oxidase desenvolvem a cor azul no sítio de inoculação dentro de 10 segundos. O não desenvolvimento da cor azul nesse intervalo indica teste negativo. O *Vibrio parahaemolyticus* é positivo para esse teste.

3.3.4.2 Hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina e ornitina:

cada cultura em TSA 3% NaCl a ser analisada, foi transferida para 4 tubos contendo respectivamente Arginina, Lisina, Ornitina e um tubo contendo apenas o Caldo Púrpura Bromocresol 3% NaCl (controle). Após a inoculação, a superfície do meio de cada tubo foi coberta com uma camada de aproximadamente 1cm de vaselina líquida estéril. Estes tubos foram incubados por 4 dias a 35°C e as leituras realizadas diariamente (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

As provas de hidrólise da arginina, descarboxilação da lisina e ornitina são consideradas positivas quando o meio, após 4 dias de incubação, se revelar na cor azul-púrpura e, negativas quando estiver amarela. As cepas de *Vibrio parahaemolyticus* descarboxilam a lisina e a ornitina, mas não hidrolisam a arginina.

3.3.4.3 Prova do halofilismo (crescimento em 0, 6, 8 e 10% de Cloreto de Sódio) : a partir das culturas em Caldo Trypticase Soja (TSB) com 3% NaCl, inoculou-se uma alçada em tubos de caldo Triptona contendo 0, 6, 8 e 10% NaCl. Os tubos foram incubados por um período entre 18 e 24 horas a 35°C.

As cepas de *Vibrio parahaemolyticus* crescem bem em 6% e 8% de NaCl, não se multiplicando na ausência e nem em concentração de 10% desse sal.

3.3.4.4 Teste de oxidação e fermentação (O/F) da glicose: foram preparados 2 tubos de Meio Oxidação/Fermentação (OF) suplementados com 1% de glicose para cada cultura a ser testada. Os meios foram semeados com picada profunda, sendo que um deles foi vedado com vaselina líquida para o teste em anaerobiose. Os tubos foram incubados por 48 horas a 35°C (HUGH; LEIFSON, 1953).

O meio OF de Hugh Leifson mostra alta sensibilidade, mesmo de quantidades mínimas de ácido, fenômeno comum entre os microrganismos de metabolismo aeróbio. Baseia-se, no oferecimento do carboidrato ao microrganismo em dois tubos, um de ambiente aeróbio, outro de ambiente anaeróbio. A produção do ácido é detectada pela mudança ou viragem da cor do meio verde para o amarelo (resultado positivo), a partir do indicador de pH Azul de Bromotimol. Deve-se interpretar os dois tubos inoculados, a acidificação do meio no tubo aberto, indica metabolismo oxidativo da glicose e no tubo vedado, metabolismo fermentativo. As cepas de *Vibrio parahaemolyticus* são anaeróbias facultativas, apresentam metabolismo oxidativo e fermentativo, portanto é considerado suspeito quando ambos os tubos apresentarem coloração amarela.

3.3.4.5 Crescimento a 42°C: cada cultura em TSB 3% NaCl a ser analisada, foi inoculada com uma alça em um Erlenmeyer contendo 100mL desse mesmo meio e incubados em banho-maria com agitação por 24 horas a 42°C. O *Vibrio parahaemolyticus* cresce bem a 42°C (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

3.3.4.6 Prova de Voges-Proskauer: as cepas suspeitas no TSA 3% NaCl, foram também inoculadas, com alça, em tubos contendo Caldo MRVP (Methyl Red Voges Proskauer) suplementado com 3% NaCl e incubados por 48 horas a 35°C. Após a incubação, foram transferidos alíquotas de 1ml de cada cultura para tubos estéreis e adicionados 0,6mL de Solução Alcoólica de Alfa-naftol a 5% e 0,2mL de Solução Aquosa de Hidróxido de Potássio a 40%, agitando sempre após a inclusão de cada solução, os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos, em seguida foram realizadas as leituras (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

O Ácido Pirúvico que é o principal produto formado a partir da fermentação da glicose, é metabolizado através de várias vias enzimáticas, dependendo da espécie bacteriana. Uma destas vias resulta na formação de Acetoína (ácido acetil-metil-carbinol) um subproduto inativo, que reage com o Hidróxido de Potássio e o Alfa-naftol, apresentando uma cor vermelha, indicando que o teste é positivo; se não houver alteração de cor, o teste é negativo. As cepas de *Vibrio parahaemolyticus* são VP negativo.

3.3.4.7 Fermentação de Carboidratos: as cepas suspeitas, incubadas em TSA 3% NaCl por 24 horas a 35°C, foram inoculadas com alça em tubos contendo Caldo Púrpura Bromocresol, previamente acrescido dos carboidratos a serem testados (lactose, arabinose, celobiose, manitol, manose e trealose). Após a inoculação, os meios foram vedados com uma camada de vaselina líquida estéril e em seguida, incubados durante uma semana a 35°C, observando diariamente se ocorreu a fermentação, que

determina alteração de cor do meio (produção de ácido) (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004), que o deixa na cor amarela.

Vibrio parahaemolyticus fermenta a maltose, trealose e o manitol, não fermenta lactose, celobiose e arabinose, podendo variar para esses dois últimos carboidratos.

3.3.5 Cálculo do NMP: após o isolamento e identificação das cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, foi determinado o Número Mais Provável (NMP) da bactéria por grama de amostra, empregando a tabela de NMP, quando se analisam três tubos por diluição (BLODGETT, 2001).

3.4 Testes de patogenicidade: esses testes têm o objetivo de avaliar e classificar as cepas de *Vibrio parahaemolyticus* quanto a sua patogenicidade. A capacidade da bactéria em produzir Tdh e/ou hidrolizar a uréia é considerado importante fator de virulência.

3.4.1 Prova de Kanagawa: as cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas foram submetidas ao estudo do fenômeno de Kanagawa (KP). A partir dos tubos de TSB 3% NaCl, cada cepa foi semeada em placa contendo Ágar Wagatsuma. Essas placas foram incubadas durante 18 a 24 horas a 35°C, em seguida verificou-se a ocorrência ou não da formação de um halo claro de beta-hemólise ao redor do crescimento bacteriano, característico de teste positivo (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

3.4.2 Prova da Urease: a partir do cultivo em TSA 3% NaCl as cepas isoladas foram semeadas em estrias na superfície do Ágar Christensen's Urea com 2% de Cloreto de Sódio e incubadas por 24 horas a 35°C. Se a cepa for capaz de hidrolizar a uréia, urease positiva, o meio se torna vermelho. As cepas patogênicas são urease positivas (ELLIOT; KAYSNER; TAMPLIN, 2004).

3.5 Sensibilidade frente a antimicrobianos: as culturas do meio TSB com 3% de NaCl, incubadas por 24 horas a 35°C, foram testadas quanto a sensibilidade a antibióticos pelo método de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). As colônias foram suspensas em solução fisiológica estéril até se obter uma turvação igual o grau 0,5 da escala Mac Farland e semeadas em Ágar Mueller-Hinton com 2% de NaCl. Discos impregnados com antibióticos foram distribuídos no meio e incubados por 18 horas a 35°C. Após a incubação, mediu-se o halo de inibição de cada antibiótico e realizou-se análise quanto a sensibilidade aos antibióticos testados.

Trabalhou-se com a marca Cecon® porque, segundo Sejas et al. (2003), essa marca apresentou melhor desempenho, com 89,6% de concordância, apesar de nenhuma das marcas estudadas apresentarem desempenho satisfatório. Por esse motivo, realizou-se o controle de qualidade dos discos-difusão, utilizando cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 (beta-lactamase negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, vendidos comercialmente.

Foram testadas 12 drogas: ácido nalixídico (30µg), ampicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), estreptomicina (10µg), kanamicina (30µg), gentamicina (10µg), penicilina G (10U), polimixina B (300U), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg).

Ressalta-se que o teste de sensibilidade aos antibióticos foi realizado em todas as cepas isoladas, independentemente de apresentarem as características de patogenicidade, porque segundo Okuda e Nishibuchi (1998), cepas apatogênicas podem adquirir gene (*tdh2*), através de mutação, responsável pela produção da hemolisina Tdh, e se tornar patogênicas.

3.7 Análise estatística: a análise dos resultados foi descritiva, utilizando-se o cálculo de proporção dos resultados de *Vibrio parahaemolyticus*, fatores relacionados à patogenicidade (fenômeno de Kanagawa e produção de urease) e resistência a antibióticos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre número de amostras positivas para *Vibrio parahaemolyticus* em função da estação de colheita. No inverno e verão foram registrados, respectivamente, 1,79% (1/56) e 3,57% (2/56) de amostras positivas para o agente (Tab.1). Esses resultados estão abaixo dos encontrados por Shih et al. (1997), que registraram 13,3% (16/120) de amostras positivas de sashimi, em Taiwan, bem como dos encontrados por Hofer e Silva (1986), Brasil, que detectaram o agente em 54,8% (45/82) de amostras de peixes marinhos .

Tabela 1 – Resultados positivo e negativo para a pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, em amostras de atum, coletados durante o inverno de 2003 e verão de 2003 – 2004, São Paulo.

Presença de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	INVERNO		VERÃO	
	2003 (junho a julho)		2003 – 2004 (dezembro a janeiro)	
	Nº de amostras	% de amostras	Nº de amostras	% de amostras
Negativa	55	98,21	54	96,43
Positiva	01	1,79	02	3,57
Total	56	100,00	56	100,00

Das três amostras positivas, foram isoladas cinco colônias, sendo que duas colônias foram provenientes da amostra obtida durante o inverno de 2003 enquanto que uma das amostras obtidas durante o verão resultou em duas colônias e a outra apresentou uma única colônia.

Todas as colônias de *Vibrio parahaemolyticus* foram isoladas de amostras de atum coletadas de bancas de feiras-livres. A maior proporção de amostras obtidas nesses estabelecimentos (77,86%, ou seja, 76/112), somada à maior probabilidade de falha manipulação e na refrigeração do produto, em função das características desse tipo de comércio, podem explicar tal ocorrência. Vale ressaltar que as medidas de controle do agente, incluem a manutenção do pescado fora da zona de multiplicação do microrganismo (5 e 44°C), tratamento pelo calor e boas práticas de higiene para evitar a (re)contaminação do produto (OPAS, 2001).

Observou-se durante as coletas das amostras que as condições higiênico-sanitárias das bancas de feiras-livres eram variáveis. Era comum a utilização dos mesmos utensílios na evisceração e no preparo do sashimi em vários estabelecimentos, enquanto que, em outros havia utensílios próprios e funcionários destinados somente ao preparo desse prato. Durante a análise microbiológica, observou-se, sem ter sido documentado, que as amostras adquiridas desse tipo de estabelecimento possuíam alto grau de contaminação concomitante; o fato foi constatado pela ampla variedade de tipos de colônias bacterianas nas placas de Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), além da turvação do meio de enriquecimento, diluição 10^{-4} . Por não ser o objetivo do trabalho, essas colônias não foram identificadas.

As amostras obtidas em restaurantes foram as que apresentaram menor grau de contaminação geral. Isso pode ser em decorrência de que o sashimi e o sushi são, normalmente, preparados imediatamente antes do consumo, diante do consumidor, com produtos frescos e de alta qualidade, por manipuladores treinados, refletindo numa melhor condição higiênico-sanitária do produto, comparado às bancas de feiras-livres.

A amostra positiva obtida no inverno, apresentou 3 NMP/g, as outras duas amostras positivas, coletadas durante o verão apresentaram, respectivamente, 3 e 4 NMP/g, estando abaixo do limite de tolerância para amostra indicativa, definida pela RDC n.12 (BRASIL, 2001), que é de 10^3 NMP/g; assim, não representava risco para a saúde pública. Segundo a legislação, a aprovação do produto para o consumo humano deve incluir, além do *Vibrio parahaemolyticus*, a pesquisa de outros agentes como coliformes fecais, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. Por não ser o escopo do presente trabalho, esses agentes não foram pesquisados.

Vale ressaltar que a frequência e o número de *Vibrio parahaemolyticus* encontrado nesta pesquisa pode estar sub-avaliado, tendo em vista a possibilidade de haver células viáveis e não cultiváveis que, em condições de temperatura adequada pode se multiplicar e alcançar níveis que represente risco à saúde do consumidor. A presença de célula viável e não cultivável foi descrita por Nishino et al. (2003). Colwell et al. (1985) relatam que esse estado celular pode tornar as cepas patogênicas mais resistentes aos métodos convencionais de processamento de alimentos.

Assim, a não detecção do agente, nessa pesquisa, em amostras oriundas de peixarias, restaurantes e supermercados pode ser em decorrência da presença de células viáveis e não cultiváveis, que só seriam detectadas através de técnicas de biologia molecular, por terem maior sensibilidade, quando comparadas as técnicas convencionais, pois amplificam inúmeras vezes o material genético do agente. Esses dois aspectos explicam as diferenças de resultados obtidos quando se compara ambas as técnicas.

Isso foi registrado por Dileep et al., em 2003, que obtiveram 28 amostras positivas para *Vibrio parahaemolyticus* com o método tradicional e 53 com a técnica molecular PCR (polimerase chain reaction), ao analisarem 86 amostras de pescados. Também Alam et al. (2002) constataram 95% de amostras positivas pelo método PCR, enquanto apenas 40%, pelo método convencional, de 20 amostras analisadas.

Há que se pensar, no entanto, quando da escolha do método de análise, que o método molecular, *per se*, não diferencia DNA de célula viva daquele da célula morta (esta, não implica em risco à saúde pública), bem como não quantifica a carga microbiana presente. Portanto, para um agente que é fundamental o conhecimento do nível de contaminação para se avaliar o risco para o consumidor, ainda a microbiologia tradicional é um forte aliado, talvez, insubstituível pelos métodos atualmente disponíveis. Vale lembrar que os métodos moleculares são os recursos de eleição, atualmente, para estudos de caráter epidemiológico, entre outros.

Todas as cepas isoladas de *Vibrio parahaemolyticus* foram negativas ao teste de Kanagawa e não produtoras de urease, demonstrando, portanto, que não são patogênicas. Estes resultados estão em concordância com as informações de SAKAZAKI et al. (1968), que afirmaram que a maioria dos *Vibrio parahaemolyticus* isolados de alimentos e meio ambiente são Kanagawa-negativo. A baixa frequência de cepas patogênicas originadas de pescados também foi relatada por Hofer e Silva (1986); Magalhães et al. (1991); Archer e Moretto (1994) e Robert-Pillot et al. (2003).

Apesar das cepas não apresentarem características patogênicas, foi realizado estudo de sensibilidade frente a diversos antimicrobianos, devido ao relato de Okuda e Nishibuchi (1998) de que é possível ocorrer a mutação do agente apatogênico, comprovado experimentalmente, tornando-se patogênico.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos do trabalho realizado por Lozano-León et al., em 2003, que encontraram todas as cepas resistentes a ampicilina, eritromicina, estreptomicina penicilina G, polimixina B e vancomicina. Apresentaram sensibilidade intermediária a ciprofloxacina, kanamicina e gentamicina, e sensibilidade ao ácido nalixídico, cloranfenicol e tetraciclina. Também Janda, Abbott e Brenden (1997) verificaram que a maioria das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* eram sensíveis à cloranfenicol, tetraciclina e ácido nalixídico.

5 CONCLUSÕES

- Nenhuma amostra pesquisada revelou contaminação por *Vibrio parahaemolyticus* acima do padrão vigente, estabelecido na RDC n.12/2001;
- Não houve diferença significativa entre a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras obtidas durante o inverno e o verão;
- Nenhuma cepa isolada revelou-se patogênica, mostrando-se negativo ao estudo do fenômeno de Kanagawa e prova de Urease;
- Todas as cepas isoladas foram resistentes à ampicilina, eritromicina, estreptomicina penicilina G, polimixina B e vancomicina; apresentaram sensibilidade intermediária a ciprofloxacina, kanamicina e gentamicina, e foram sensíveis ao ácido nalixídico, cloranfenicol e tetraciclina e;
- Nas condições do estudo, as amostras de sashimi de atum (*Thunnus* spp) analisadas revelaram-se um alimento de baixo risco ao consumidor, no que se refere ao *Vibrio parahaemolyticus*.

REFERÊNCIAS

- AKEDA, Y.; NAGAYAMA, K.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T. Invasive Phenotype of *Vibrio parahaemolyticus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 822-824, 1997.
- ALAM, M. J.; TOMOCHIKA, K. I.; MIYOSHI, S. I.; SHINODA, S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 83-87, 2002.
- ARCHER, R. M. B.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de banco natural do litoral do município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, n. 3, p. 379-386, 1994.
- BARBONI, S. A. V. Ocorrência de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos de 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia – Brasil. 2003. f. 134-135. **Tese**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Prática de Saúde Pública, 2003.
- BAUER, A.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BEUCHAT, L. R. Interacting effects of pH, temperature, and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Technology**, p. 80-84, 1982.
- BLODGETT, R. Most Probable Number from Serial Dilutions. In **Bacteriological Analytical Manual Online**, Appendix 2, 8th ed. US FDA Centre for Food Safety and Applied Nutrition, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html#author>>. Acesso em 01 de agosto de 2004.
- BOUTIN, B. K.; TOWNSEND, S. F.; SCARPINO, P. V.; TWEDT, R. M. Demonstration of invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in adult rabbits by immunofluorescence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 647-653, 1979.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001.
- CALIK, H.; MORRISSEY, M. T.; RENO, P. W.; AN, H. Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and pacific oysters. **Food Microbiology and Safety**, v. 67, n. 4, p. 1506-1510, 2002.

CATO, J. C. Seafood safety: economics of hazard analysis and critical control point (HACCP) programmes. **FAO Fisheries Technical Paper** 381, 1998.

COLWELL, R. R. Occurrence and biology of *Vibrio parahaemolyticus*. **American Society for Microbiology**, p. 230-240, 1975.

COLWELL, R. R.; BRAYTON, P. R.; GRIMES, D. J.; ROSZAK, D. B.; HUQ, S. A.; PALMER, L. M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. **Biology and Technology**, v. 3, p. 817-820, 1985.

COOK, D. W.; BOWERS, J. C.; DePAOLA, A. Density of total and pathogenic (tdh+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf Coast molluscan shellfish at harvest. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 12, p. 1873-1880, 2002.

DANIELS, N. A.; MACKINNON, L.; BISHOP, R.; ALTEKRUSE, S.; RAY, B.; HAMMOND, R. M.; THOMPSON, S.; WILSON, S.; BEAN, N. H.; GRIFFIN, P. M.; SLUTSKER, L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1661-1666, 2000.

DANIELS, N. A.; RAY, B.; EASTON, A.; MARANI, N.; KAHN, E.; McSHAN, A.; ROSÁRIO, L. D.; LAMUELS, B.; BALDWIN, T.; KINGSLEY, M. A.; PUHR, N. D.; WELLS, J. G.; ANGULO, F. J. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotypes in raw oysters: a prevention quandary. **The Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 12, p. 1541-1545, 2000.

DePAOLA, A.; NORDSTROM, J. L.; BOWERS, J. C.; WELLS, J. G.; COOK, D. W. Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1521-1526, 2003.

DILEEP, V.; KUMAR, H. S.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 423-427, 2003.

DUPRAY, E.; CORMIER, M. Optimal enrichment time for isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1234-1235, 1983.

ELLIOT, E. L.; KAYSNER, A. C.; TAMPLIN, M. L. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**, Chapter 9, 9th ed. US FDA Centre for Food Safety and Applied Nutrition, 2004. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>>. Acesso em 01/08/2004.

FISHBEIN, M.; WENTZ, B. *Vibrio parahaemolyticus* methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. **Journal of Milk Food Technology**, v. 36, p. 118-123, 1973.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Vibrio parahaemolyticus*. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo. Atheneu, 1996, p. 68-71.

FUJINO, T.; OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAY, K.; MUKAY, T.; UEKO, T. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. **Journal of Japanese Association Infection Diseases**, v. 35, p. 11, 1951.

GHOSH, A. R.; SEHGAL, S. C. Detection of *tdh* and *trh* genes in a Urea-hydrolysing environmental isolate of *Vibrio parahaemolyticus* from the Andamans. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 16, n. 2, p. 87-90, 1998.

HACKNEY, C. R.; KLEEMAN, B. R.; SPECK, L. Adherence as a method for differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 652-658, 1980.

HAGEN, J. C.; SLOAN, E. M.; LANCETTE, G. A.; PEELER, J. T.; SOFOS, J. N. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* and in *Vibrio vulnificus* in various seafoods with two enrichment broths. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 5, p. 403-409, 1994.

HASEGAWA, N.; MATSUMOTO, Y.; HOSHINO, A.; IWASHITA, K. Comparison of effects of *Wasabia japonica* and allyl isothiocyanate on the growth of four strains of *Vibrio parahaemolyticus* in lean and fatty tuna meat suspensions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 27-34, 1999.

HAZELL, S. L.; LEE, A. *Campylobacter pylori*, urease, hydrogen ion back diffusion and gastric ulcers. **Lancet**, v. 11, p. 15-17, 1986.

HLADY, W. G.; KLONTZ, K. C. The epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Florida. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 5, p. 1176-1183, 1996.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, v. 14, n. 3, p. 174-175, 1983.

HOFER, E.; SILVA, C. H. D. Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no litoral brasileiro. **Revista de Microbiologia**, v. 17, n. 4, p. 327-331, 1986.

HONDA, S.; GOTO, I.; MINEMATSU, I.; IKEDA, N.; ASANO, N.; ISHIBASHI, M.; KINOSHITA, Y.; NISHIBUCHI, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. **Lancet**, v. 7, p. 331-332, 1987.

HONDA, T.; NI, Y.; MIWATANI, T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 961-965, 1988.

HSIEH, Y. C.; LIANG, S. M.; TSAI, W. L.; CHEN, Y. H.; LIU, T. Y.; LIANG, C. M. Study of Capsular Polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3329-3336, 2003.

HUGH, R.; LEIFSON, E. The taxonomy significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 66, p. 24-26, 1953.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in food: 1.** Their significance and methods of enumerations. Japan. 1978. 2 ed. Toronto, University of Toronto Press, p. 201-207, 287-350.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in food: 2.** Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. Japan. 1986. 2 ed. Toronto, University of Toronto Press, p. 181-196.

JAKABI, M.; GELLI, D. S.; TORRE, J. C. M. D.; RODAS, M. A. B.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M. Inactivation by ionizing radiation of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis, and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea brasiliana*). **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 6, p. 1025-1029, 2003.

JAKSIC, S.; UHITIL, S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYI, L. G. Occurrence of *Vibrio* spp. In sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, v. 13, p. 491-493, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L.; BRENDEN, R. A. Overview of the etiology of wound infections with particular emphasis on community-acquired illnesses. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, p. 189-201, 1997.

JIANG, X.; CHAI, T. J. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1300-1305, 1996.

KAUFMAN, G. E.; BEJ, A. K.; BOWERS, J.; DePAOLA. Oyster-to-Oyster variability in levels of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 1, p. 125-129, 2003.

KELLY, M. T.; STROH, E. M. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2820-2822, 1989.

KODAMA, T. *Vibrio parahaemolyticus* and the Kanagawa Phenomenon. **Clinical Nutrition**, v. 33, p. 137-141, 1968.

LANDGRAF, M.; LEME, K. B. P.; MORENO, M. L. G. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio* spp in seafood consumed in São Paulo city, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 126-130, 1996.

LEITÃO, M. F. F. Microbiologia de alimentos. In: **Tratado de microbiologia**. Manole, 1996, p. 1-84.

LIDA, T.; PARK, K. S.; SUTHIENKUL, O.; KOZAWA, J.; YAMAICHI, Y.; YAMAMOTO, K.; HONDA, T. Close proximity of the Tdh, Trh and Ure genes on the cromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiology**, v. 144, p. 2517-2523, 1998.

LOZANO-LEÓN, A.; TORRES, J.; OSORIO, C. R.; MARTÍNEZ-URTAZA, J. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, p. 281-284, 2003.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M. G.; TATENO, S. Isolation of urease-positve *Vibrio parahaemolyticus* from diarrheal patients in northeast, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 263-265, 1991.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M. G.; TATENO, S. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de humanos e de ostras no Recife, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 2, p. 83-88. 1991.

MAGALHÃES, M.; TAKEDA, Y.; MAGALHÃES, V.; TATENO, S. Brazilian urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* carry genetic potential to produce the TDH-related hemolysin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 167-168, 1992.

MAGALHÃES, T. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; FAÇANHA, S. H. F.; HOFER, E.; MARTIN, A. M. Growth of *Vibrio parahaemolyticus* in lobster homogenates at different temperatures. **Food Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2000.

MAMIZUKA, E. M. Controle de qualidade da prova de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos. 1982. f. 1, **Dissertação**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento Análises Clínicas e Toxicológicas, 1982.

MATTÉ, R.; MATTÉ, M. H.; RIVERA, I. G.; MARTINS, M. T. Distribution of potentially pathogenic *Vibrios* in oysters from a tropical region. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 10, p. 870-873, 1994.

McCARTER, L. L. Polar Flagellar Motility of the *Vibrionaceae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 3, p. 445–462, 2001.

MERCADO DA PESCA. Histórico da pesca de atuns e afins no Brasil. Disponível em: <www.mercadodapesca.com.br/cadeias_atuns.php?pag=historia>. Acesso em: 08 de agosto de 2004.

MERREL, B. R.; WALKER, R. I.; JOSEPH, S. W. In vitro and in vivo pathologic effects of *Vibrio parahaemolyticus* on human epithelial cells. **Canadian Journal Microbiology**, v. 30, p. 381-388, 1983.

MILES, K. A.; SMITH, K. L. C. Captive grown yellow tuna – a preliminary marketing investigation. **Brisbane**. dep. Primary Industries, p. 15, 1994.

MOLITORIS, E.; JOSEPH, S. W.; KRICHEVSKY, M. I.; SINDHUHARDJA, W.; COLWELL, R. R. Characterization and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1388-1394, 1985.

MONSREAL, J. F.; ABUXAPQUI, J. J. F. Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en productos marinos y en heces de manipuladores de alimentos. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 30, p. 223-227, 1988.

MUNTADA, G. J. M.; RODRIGUEZ, J. J. J.; LOPEZ, S. E. I.; MORA, V. M. T. Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 225-227, 1995.

NAIM, R.; YANAGIHARA, T. I.; HONDA, T. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin can induce an apoptotic cell death in Rat-1 cells from inside and outside of the cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p. 237-244, 2001.

NISHIBUCHI, M.; ISHIBASHI, Y. T.; KAPER, J. B. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences by the DNA colony hybridization test. **Infection and Immunity**, v. 49, p. 481-486, 1985.

NISHIBUCHI, M.; FASANO, A.; RUSSEL, R. G.; KAPER, J. B. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 3539-3545, 1992.

NISHIBUCHI, M.; KAPER, J. B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 2093–2099, 1995.

NISHINO, T.; NAYAK, B. B.; KOGURE, K. Density-Dependent Sorting of Physiologically Different Cells of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3569-3572, 2003.

OKABE, D. Statistical review of food poisoning in Japan – especially that by *Vibrio parahaemolyticus*. In: **International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus***. Japan. 1974. Saiko Publishing Co., Ltd. Tokyo, p. 5-8.

OKUDA, J.; NISHIBUCHI, M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 499-511, 1998.

OLIVER, J. D.; KAPER, J. B. *Vibrio* species. In **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. 1997. p.228-264.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. Análise de perigos e pontos críticos de controle (HACCP). In **HACCP: Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos**. 2001. OPAS/INPPAZ, p. 157-161.

RECASENS, M. E. G.; LÓPEZ, A. M. P.; REYES, G. R. Aislamento de *Vibrio parahaemolyticus* en casos de gastroenteritis y en mariscos crudos en la ciudad de Puebla. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 16, p. 85-88, 1974.

ROBERT-PILLOT, A.; GUEDOLÉ, A.; LESNE, J.; DELESMONT, R.; FOURNIER, J. M.; QUILICI, M. L. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. **International Journal of Food Microbiology**, 2003. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em 01 de agosto de 2004.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M.; OLIVEIRA, E. G.; HOFER, E. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa – MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 407-411, 2001.

SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAMI, S.; HOBBO, K. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal Medical Science Biology**, v. 21, p. 325-331, 1968.

SAKAZAKI, R. *Vibrio parahaemolyticus* as a food-spoilage organism. In: **The Microbiological Safety of Foods**. London. 1983. Academic Press, p.225-241.

SAKURAI, J.; MATSUZAKI, A.; MIWATANI, T. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, v. 8, p. 775-780, 1973.

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para teste de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SHIH, Y. C.; LAI, C. L.; HUNG, S. S.; WANG, J. Y. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from sashimi in the Taipei area. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 5, n. 3, p. 225-232, 1997.

SIDEBOTHAM, R. L.; BARON, J. H. Hypothesis, *Helicobacter pylori*, urease, mucus and gastric ulcer. **Lancet**, v. 335, p. 193-195, 1990.

SMITH, H. Microbial surfaces in relation to pathogenicity. **Bacteriology Review**, v. 41, p. 475-500, 1977.

SPITE, G. T.; BROWN, D. F.; TWEDT, R. M. Isolation of an enteropathogenic, Kanagawa-positive strain of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood implicated in acute gastroenteritis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1226-1227, 1978.

SUTHIENKUL, O.; ISHIBASHI, M.; IIDA, T.; NETTIP, N.; SUPAVEJ, S.; EAMPOKALAP, B. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. **Journal of Infection Diseases**, v. 172, p. 1405-1408, 1995.

TALAN, D. A.; MORAN, G. J.; PINNER, R. W. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oyster and clams harvested from Long Island Sound, Connecticut, New Jersey e New York. **Annals of Emergency Medicine**, v. 34, n. 5, p. 679-680, 1999.

VASUDEVAN, P.; MAREK, P.; DAIGLE, S.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, S. K. Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish fillets. **Journal of Food Safety**, v. 22, p. 209-217, 2002.

VIEIRA, R. H. S. F. *Vibrio parahaemolyticus*. In: **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo. 2003. Varela, p.141-149.

ZEN, Y. H.; SAKAI, S.; TERAYAMA, T.; KUDO, Y.; ITO, T.; BENOKI, M.; NAGASAKI, M. Epidemiology, enteropathogenicity and classification of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Infection Diseases**, v. 115, p. 436-444, 1965.

ANEXO

MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

1 SOLUÇÃO SALINA 3%

Aplicação: solução utilizada para realizar as diluições.

Fórmula:

Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	30g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver 30 gramas de Cloreto de sódio em 1000 mL de água destilada, distribuir 9mL por tubo, esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

2 ÁGUA PEPTONADA ALCALINA 3% NaCl

Aplicação: meio para determinação do NMP de *Vibrio parahaemolyticus*.

Fórmula:

Água peptonada – Merck 1072280500	20g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	25g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver os ingrediente em 1000 mL de água destilada, ajustar o pH em 8,4 a 8,6, distribuir 9mL por tubo, esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

3 ÁGAR TIOSSULFATO CITRATO BILE SACAROSE (TCBS) – Oxoid CM333

Aplicação: meio seletivo para isolamento de vibrios patogênicos.

Modo de preparo: suspender 88 gramas de TCBS em 1000 mL de água destilada, ferver até a dissolução completa do meio, aguardar o meio atingir a temperatura de 45-50°C para ajustar o pH em 8,4 a 8,6. Em seguida, distribuir em placas de Petri, sem aquecimento adicional. Essas placas devem ser utilizadas em até 03 dias após o preparo.

4 ÁGAR SOJA TRIPTONA 3% NaCl (TSA)

Aplicação: meio de cultivo utilizado na manutenção do agente.

Fórmula:

Ágar soja triptona – Oxoid CM131	40g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	25g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada, ferver até a completa dissolução, distribuir em tubos braquelites, esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Logo após a esterilização, manter os tubos inclinados em temperatura ambiente até a solidificação do ágar.

5 MEIO SIM 3% NaCl

Aplicação: meio de triagem, baseado na produção de sulfeto de hidrogênio, Indol e motilidade.

Fórmula:

Meio SIM – BBL 211578	30g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	30g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes em 01000 mL de água destilada, ferver até a completa dissolução, distribuir em tubos e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

6 ÁGAR TRÍPLICE AÇÚCAR FERRO 3% NaCl

Aplicação: meio de triagem, baseado na fermentação de 3 açúcares (sacarose, lactose e glicose) e produção de sulfeto de hidrogênio.

Fórmula:

Ágar tríplice açúcar ferro – Merck 1039150500	65g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	25g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada, ferver até a completa dissolução, distribuir em tubos, esterilizar por autoclavação a 121°C

por 15 minutos. Logo após a esterilização, manter os tubos inclinados em temperatura ambiente até a solidificação do ágar.

7 CALDO SOJA TRIPTONA 3% NaCl

Aplicação: meio de enriquecimento e teste de crescimento a 42°C.

Fórmula:

Caldo soja triptona – Oxoid CM129	30g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	25g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes em 1000 mL de água destilada, ajustar o pH em 8,4 a 8,6, distribuir 10 mL por tubo e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

8 CALDO TRIPTONA (0, 6, 8 e 10% NaCl)

Aplicação: meio utilizado para a prova de halofilismo.

Fórmula:

Triptona – Oxoid LP042	10g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes em 1000 mL de água destilada, ajustar o pH em 8,4 a 8,6, dividir em 04 volumes de 250mL, adicionar 15g, 20g e 25g de Cloreto de sódio P.A. (Synth C1060.01.AH) nos respectivos volumes, obtendo dessa

forma as concentrações 0, 6, 8 e 10 % de NaCl, distribuir 10 mL por tubo e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

9 MEIO DE ARGININA 3% NaCl, LISINA 3% NaCl e ORNITINA 3% NaCl

Aplicação: meio utilizado para prova de lisina e ornitina descarboxilase e arginina deidrolase.

MEIO BASAL

Fórmula:

Peptona bacteriológica – Oxoid L037	5g
Extrato de levedura – Oxoid LP021	3g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	30g
Glicose Anidra – Synth G1008.01.AH	1g
Púrpura de Bromocresol – Vetec 206	0,02g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes em 1000 mL de água destilada, ajustar o pH em 6,8. Dividir essa solução em 4 partes iguais e acrescentar à primeira parte, 1,25g de L-arginina (Vetec 171), à segunda parte, 1,25 g de L-lisina (Vetec 174), à terceira parte, 1,25 g de L-ornitina (Vetec 175). A quarta parte é a solução controle. Distribuir 03 mL por tubo e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

10 REAGENTE TETRAMETIL P-FENILENODIAMINO

Aplicação: reagente utilizado na prova de citocromo oxidase.

Fórmula:

Tetrametil p-fenilenodiamino – Merck 8211010005	0,2g
Água destilada estéril	20mL

Modo de preparo: dissolver o reagente na água destilada e mantê-lo em vidro escuro no congelador.

11 CALDO PÚRPURA BROMOCRESOL 3% NaCl

Aplicação: meio utilizado para prova de fermentação de carboidratos: arabinose (Vetec 815), manitol (Synth M1003.02.BJ), celobiose (Vetec 1366), manose (Vetec 1291), d-trealose (Vetec 1264) e lactose (Synth L1005.01.AG) .

MEIO BASAL

Fórmula:

Triptona – Oxoid LP042	10g
Extrato de carne – Oxoid CM017	3g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	30g
Púrpura de Bromocresol – Vetec 206	0,04g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes em 1000 mL de água destilada, ajustar o pH em 6,8 e dividir essa solução em 6 partes de 150 mL. Acrescentar 1,5g de cada

carboidrato (arabinose, manitol, celobiose, manose, trealose e lactose) em 150 ml de meio basal, distribuir 3 mL por tubo e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

12 MEIO PARA FERMENTAÇÃO E OXIDAÇÃO (O/F) DA GLICOSE 3% NaCl

Aplicação: meio utilizado para prova de fermentação e oxidação da glicose.

Fórmula:

Meio Basal OF – Difco 268820	94g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	30g
Água destilada	1000 mL
Solução aquosa 10% de glicose	100mL

Modo de preparo: dissolver 94g de meio basal OF e 30 g de NaCl em 1000 mL de água destilada, ajustar o pH em 7,3 e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Em seguida, após o meio atingir a temperatura de 45-50°C, adicione 100 ml de solução aquosa 10% de glicose, já esterilizado por filtração em filtro “Millipore Millex” (Código JBR 6.100.31 / JBR 6.100.31) e distribua assepticamente em tubos estéreis (5mL/tubo).

13 MEIO MRVP 3% NaCl

Aplicação: meio utilizado para prova de Voges Proskauer.

Fórmula:

Meio MRVP – Merck 1057120500	17g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	30g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes em 1000 mL de água destilada, distribuir 5 ml por tubo e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

14 SOLUÇÃO 5% DE ALFA – NAFTOL

Aplicação: reagente para prova bioquímica, teste de Voges Proskauer.

Fórmula:

Alfa-naftol – Merck 6223	5g
Etanol absoluto – Nuclear 0377	100mL

Modo de preparo: dissolver o alfa-naftol em 100mL de etanol absoluto, estocar em geladeira.

15 SOLUÇÃO 40% DE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO

Aplicação: reagente para prova bioquímica, teste de Voges Proskauer.

Fórmula:

Hidróxido de potássio – Merck 5033	40g
Água destilada	100mL

Modo de preparo: dissolver o hidróxido de potássio em 100mL de água destilada, estocar em geladeira.

16 ÁGAR URÉIA DE CHRISTENSEN 3% NaCl

Aplicação: meio utilizado para detecção da atividade de urease.

Fórmula:

Agar Uréia – Oxoid CM053	2,4g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	2g
Água destilada	95mL
Solução estéril 40% de uréia – Oxoid SR020K	5mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes, exceto a solução estéril 40% de uréia, em 95mL de água destilada e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Aguardar o meio atingir a temperatura de 45-50°C e adicionar assepticamente 5mL de solução estéril 40% de uréia. Distribuir o meio em tubos estéreis. Mantenha os tubos inclinados até a solidificação do agar.

17 ÁGAR WAGATSUMA

Aplicação: meio utilizado no estudo do fenômeno de Kanagawa.

Fórmula:

Peptona bacteriológica – Oxoid L037	10g
Extrato de levedura – Oxoid LP021	3g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	70g
Manitol P.A. – Synth M1001.01.AE	10g
Cristal violeta – Merck 1408	0,001g
Fosfato dipotássico – Synth F1029.01.AG	5g
Agar – Merck 1016141000	15g
Água destilada	1000 mL
Sangue humano	20mL

Modo de preparo: dissolver os ingredientes, exceto o sangue humano, em 1000 mL de água destilada e aquecer até a completa fusão. Após o meio atingir a temperatura de 45-50°C, ajustar o pH em 8,0, adicionar e homogeneizar 20mL de sangue desfibrinado no meio e distribuí-lo assepticamente em placas estéreis.

18 ÁGAR MUELLER HINTON 3% NaCl

Aplicação: meio utilizado na prova de sensibilidade a antibióticos.

Fórmula:

Agar Mueller Hinton – Oxoid CM337	38g
Cloreto de sódio P.A. – Synth C1060.01.AH	30g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada, ferver até a completa dissolução e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Logo após a esterilização, distribuir assepticamente em placas de Petri estéril e manter em temperatura ambiente até a completa solidificação do ágar.