

# Enumeração e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* em lulas frescas comercializadas no município de Niterói RJ Brasil

(Enumeration and identification of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh squids commercialized at Niterói, Rio de Janeiro State, Brazil)

LIMA, Francisco Carlos de\*, OLIVEIRA, Luiz Antônio Trindade de\*\* e MANO, Sergio Borges\*\*\*

## Resumo

Com o objetivo de verificar as condições higiênico-sanitárias do pescado comercializado no município de Niterói, efetuou-se um estudo sobre a enumeração e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* em lulas frescas. Foram utilizadas 50 amostras de lulas frescas, identificadas como pertencentes à espécie *Dorytheutis brasiliensis* Blainville, 1823. A identificação e enumeração do *V. parahaemolyticus* foram baseadas nos métodos descritos pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF (1983). A classificação de Heiberg (1936) foi utilizada como teste complementar. O *V. parahaemolyticus* foi identificado em três (6%) amostras, sendo que, em uma o vibrio se desenvolveu em meio com concentração salina a 10%, na prova de halofillismo. O *V. parahaemolyticus* apresentou os NMPs (Número Mais Provável) com média de 19,3 bactérias/g. As três amostras de *V. parahaemolyticus* submetidas à classificação de Heiberg apresentaram perfil compatível com o grupo VII (Sacarose -, Manose + e Arabinose +). Concluiu-se que, mesmo sob comercialização inadequada, com manipulação e resfriamento precários, as amostras analisadas apresentaram o *V. parahaemolyticus* com frequências e NMPs baixos.

Palavras-chave: Vibrios marinhos, *Vibrio parahaemolyticus*

## Introdução

O primeiro isolamento do *Vibrio parahaemolyticus* foi efetuado por Fungino *et al.*, em 1951, no Japão, em material de necropsia de um surto de gastroenterite que envolveu 272 pessoas, com 20 óbitos. Este agente foi também isolado de amostras de "shirasu" (sardinhas jovens semi-

dessecadas e cozidas), considerado o veículo da toxinfecção.

O *V. parahaemolyticus* é uma bactéria Gram negativa, em forma de bastão curto, exibindo pleomorfismo, em que são freqüentes as formas curvas e cocóides (Bartley e Slanetz, 1971; Vanderzant e Nickelson, 1972; Nelson e Potter, 1976). É móvel, apresentando somente flagelo polar quando em meio líquido. É anaeróbio facultativo (Fishbein e Wentz, 1973; Nelson e Potter, 1976), mostrando tendência à coloração bipolar (Wanderzant e Nickelson, 1972), e desenvolvendo-se melhor em pH alcalino entre 7,5 e 8,5 e temperaturas entre 35 e 37°C (Sakazaki *et al.*, 1963). É um microrganismo halófilo, necessitando para o seu isolamento e identificação o mínimo de um por cento de NaCl (Johnson *et al.*, 1971). Distribui-se amplamente no ambiente marinho, principalmente em águas costeiras e estuarinas temperadas (Covert e Woodburn, 1972; Thompson *et al.*, 1976; Kaysner, 1981; Shinoda *et al.*, 1983).

No Japão, de todas as possíveis causas de surtos de gastroenterites, o *V. parahaemolyticus* tem sido responsabilizado pela maioria dos casos (Sakazaki *et al.*, 1963; Fishbein e Wentz, 1973). Somente durante o período de 1952 a 1955, ocorreram neste país, segundo Kawabata *et al.* (1957), 866 surtos de toxinfecções alimentares envolvendo aproximadamente 5.000 pessoas. Destas, 758 tinham como veículo a ingestão de cefalópodes. As características epidemiológicas, na maioria dos casos, apontavam o *V. parahaemolyticus* como agente nosológico. Zen-Yoji *et al.* (1965), constataram que, de 2.073 pacientes com toxinfecções alimentares, 606 (29,2%) eram devido ao *V. parahaemolyticus*.

\* Professor Adjunto IV

\*\* Professor Titular

\*\*\* Professor Assistente I

A presença e o desenvolvimento sazonal do *V. parahaemolyticus* em água e pescado marinhos são sempre um risco potencial para a Saúde Pública. Quantidades relativamente baixas, em torno de 11.000 bactérias/g de amostra, podem dar início à toxinfecção (Thompson Jr. *et al.*, 1976).

Esta pesquisa tem por objetivo a enumeração e identificação do *V. parahaemolyticus*, para maior conhecimento das características microbiológicas relacionadas com o estado higiênico-sanitário do pescado comercializado no município de Niterói (Rio de Janeiro).

### Material e Métodos

No experimento foram utilizadas 50 amostras de lulas frescas, obtidas no mercado varejista do município de Niterói-RJ, no período de março a dezembro de 1988. Estas eram colocadas em sacos plásticos pelos próprios vendedores, com a finalidade de retratar as características reais do produto oferecido ao consumidor, e imediatamente levadas em isopor com gelo para o Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF). Com os cuidados normais de assepsia, as partes comestíveis (manto e tentáculos) eram fragmentadas e, a seguir, homogeneizadas em liquidificador, por dois minutos, em rotação média.

Para a enumeração e identificação do *V. parahaemolyticus*, tomou-se como base a metodologia prescrita pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) de 1983, com algumas modificações, descritas a seguir:

a) Usou-se para o Número Mais Prévavel (NMP) o meio GSTB (Akiyama e Takizawa, 1963, segundo Barros, 1977) ao invés de caldo polimixina.

b) Na prova de Voges-Proskauer foi usada a temperatura de 35-37°C/24-48 horas, segundo MacFaddin (1985), ao invés de 27-29°/18 horas.

c) Na formulação do GSTB usou-se o Tween 80 (Merck. Art. 822187) em substituição ao teepol. Ambas as substâncias têm a função de aumentar a tensão superficial do meio, dificultando a motilidade, o que evita a formação do "swarming" ou espalhamento de determinados grupos de vibrios, conferindo-se com isso maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas.

Como teste auxiliar para a identificação do *V. parahaemolyticus* utilizou-se a classificação de Heiberg (1936), que é baseada nas respostas à fermentação dos açúcares manose, sacarose e arabinose. Por esta classificação o *V. parahaemolyticus* pode pertencer a três grupos distintos: o V (manose +/- sacarose -/ arabinose -); o VII (manose +/- sacarose -/ arabinose +); e o VIII (manose -/ sacarose -/ arabinose +) (Chatterjee, 1974)

### Resultados

A pesquisa mostrou que as 50 amostras inoculadas em meio GSTB apresentaram crescimento. Quando inoculados em agar TCBS (Thiosulfate-citrate-biliar salts), em 28 (56%)

**Tabela I - Enumeração de vibrios totais e *V. parahaemolyticus* em amostras de lulas.**

Nº	Vibrios Totais NMP bact./g	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NMP bact./g
01	15	-
02	4	-
03	15	-
04	93	-
05	43	43
06	23	-
07	460	-
08	15	-
09	4	-
10	4	-
11	4	-
12	11	-
13	3	-
14	23	-
15	7	-
16	150	-
17	21	-
18	15	4
19	93	-
20	11	11
21	21	-
22	75	-
23	460	-
24	39	-
25	9	-
26	1.100	-
27	28	-
28	>2.400	-

**Tabela II - Perfil bioquímico do *V. parahaemolyticus*, isolado de amostras de lulas.**

Provas	<i>V. parahaemolyticus</i>
Citocromo oxidase	+
VP	-
Crescimento a 42°C	+
Lisina	+
Arginina	-
Halofilismo	-
0%	-
6%	+
8%	+
10%	1+/-
Glicose	+
Sacarose	-
Manitol	+

(+) = amostra positiva

(-) = amostra negativa

amostras evidenciou-se a formação de UFCs sacarose positivas, de tamanhos variados, com tendência a grandes, e destas, em três (6%), foi verificado o desenvolvimento concomitante de UFCs verde-azuladas, pequenas, caracterís-

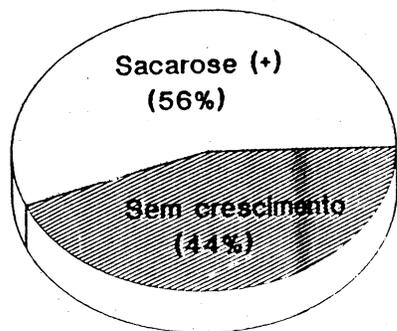


Gráfico 1 - Percentual de frequência de bactérias sacarose positivas em 50 amostras de lulas

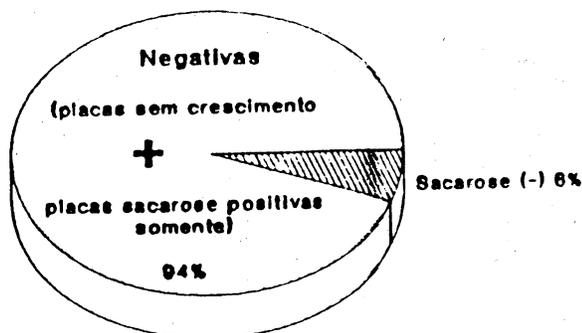


Gráfico 2 - Percentual de frequência de bactérias sacarose negativas em 50 amostras de lulas

ticas do *V. parahaemolyticus* (Gráficos 1 e 2). O maior número de UFCs verdes encontradas foi de quatro por placa.

O exame morfológico evidenciou que todas as UFCs (verdes e amarelas) eram formadas por bactérias Gram negativas, pleomórficas, porém com número significativo de organismos em forma de bastões curvos.

Excluindo-se do somatório a amostra com NMP > 2.400/g (Tabela I), a média dos NMPs foi de 86,5 bactérias/g e, com 20 (71,4%) destas amostras apresentando seus NMPs abaixo do índice médio

As bactérias oriundas das UFCs verde-azuladas apresentaram-se móveis no agar motilidade e cresceram melhor em caldo tripticase soja que no agar correspondente. Nas sementeiras em TSI, produziram acidificação da base e alcalinização do bisel, sem formação de gás ou H<sub>2</sub>S.

Os testes bioquímicos evidenciaram uma grande semelhança com o perfil bioquímico do *Vibrio parahaemolyticus* (Tabela II), embora uma das amostras tenha se desenvolvido em concentração salina a 10%, na prova do halofilismo.

As três amostras de *V. parahaemolyticus* submetidos à classificação de Heiberg, apresentaram perfil compatível com o grupo VII (sacarose -/ manose +/- arabinose +).

### Discussão

Em amostras de mercado, os níveis percentuais de isolamento do *V. parahaemolyticus* podem sofrer oscilações consideráveis, sobretudo em face do grau de resfriamento

aplicado. Kampelmacher *et al.*, (1970) observaram um nível de contaminação, pelo *V. parahaemolyticus*, de somente 0,3% em peixes e bivalves nos mercados da Holanda, enquanto Bockemuhl e Triemer (1974) reportaram em Lomé (África), um índice de positividade de 44,2%. Em peixes capturados em alto mar, o índice chegava a 14,3% (após estar com apenas 0,5% no momento da captura), e 67,3% em pescado de águas costeiras, que já apresentava percentuais bastante altos na captura (em torno de 47%).

Não sendo filtradoras, não possuindo hábitos bentônicos e tendo predileção por águas não poluídas, as lulas teriam comportamento semelhante aos peixes de alto mar, no que concerne à quantidade de vibrios presentes em suas superfícies corporais. O percentual de isolamento (6%) do *V. parahaemolyticus* encontrado no presente trabalho, pode ser considerado satisfatório, em vista da manipulação e resfriamento inadequados recebidos pelas lulas, quando expostas à venda. As amostras de Kampelmacher *et al.* (1970), além de originárias do Mar do Norte, de águas frias, eram mantidas resfriadas, dificultando com isso a multiplicação do vibrio.

A relação existente entre o número de isolamentos de vibrios sacarose positivos e o *V. parahaemolyticus* mostrou que a presença dos primeiros era muito mais efetiva. Segundo Zen-Yoji *et al.* (1965), em peixes e bivalves, a diferença na quantidade de isolamentos de vibrios sacarose positivos, chegava a quase dez vezes o número de isolados do *V. parahaemolyticus* (90,2 e 9,8% respectivamente). A relação aproximada de 10:1 foi também observada em lulas. As amostras sacarose positivas apresentaram um percentual de isolamento de 56% contra os 6% do *V. parahaemolyticus*.

Em 1972, Kampelmacher e Jansen afirmavam, que devido as discrepâncias de natureza intrínseca, alguns testes bioquímicos apresentavam respostas que poderiam resultar na agrupagem imprecisa dos organismos da família Vibrionaceae. O próprio caráter halofílico do *V. parahaemolyticus*, já que seu crescimento pode apresentar variações em diferentes concentrações salinas, não deveria ser usada, segundo Twedt *et al.* (1969) e Vanderzant e Nickelson (1972), como elemento chave na sua identificação, embora vários autores citem o organismo como medianamente halofílico, não se desenvolvendo em meios com 10% de NaCl (Sakazaki *et al.*, 1963; Jegathsan e Paramasivan, 1976; Pezzlo *et al.*, 1979; Blake *et al.*, 1980). No entanto, algumas citações apontam amostras do *V. parahaemolyticus* ocasionalmente positivas em cultivos salinos a 10% (Baross e Liston, 1968; Kampelmacher e Jansen, 1972; Kristensen, 1974; Chun *et al.*, 1974); enquanto outras indicam números bem mais elevados como a de Zen-Yoji *et al.* (1965), que verificaram 15 amostras positivas em 52 (26,3%) isolados; de Gjerde e Boe (1981), com 10 positivas em 15 (66,6%); de Colwell (1970), em, até mesmo, 100% das amostras testadas.

No presente trabalho, uma das amostras identificadas com *V. parahaemolyticus* cresceu em caldo triptona com 10% de NaCl, apesar deste crescimento não ser tão profuso quanto os observados nos meios de concentração de 6 a 8%. Embora as características bioquímicas desta amostra

estejam em concordância com alguns autores citados, o número reduzido de isolamentos do *V. parahaemolyticus* não possibilitou o aprofundamento das observações, ou seja, se no caso de maior número de isolamentos ter-se-ia a oportunidade do encontro de outras amostras com as mesmas características. Concluiu-se, sobre este aspecto, que as provas bioquímicas inerentes a um determinado grupo não devem ser analisadas separadamente e sim em conjunto, apontando ainda a prova do halofilismo a 10% como de grande importância auxiliar na identificação do *V. parahaemolyticus*.

O teste de fermentação da arabinose, de acordo com Leitão e Arina (1975), é de grande valor na caracterização do *V. parahaemolyticus*, sendo utilizado neste trabalho como prova integrante na classificação de Heiberg. As 3 amostras isoladas mostraram-se positivas à fermentação de arabinose como as descritas por Chatterjee *et al.* (1980), Kampelmacher e Jansen (1972), Olsen *et al.* (1978) e Blake *et al.* (1980) indicando serem pertencentes ao grupo VII de Heiberg.

## Summary

### Enumeration and identification of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh squids commercialized at Niterói Rio de Janeiro State, Brazil

A study on the enumeration and identification of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh squids in Niterói was undertaken aiming at checking the hygienic-sanitary conditions of fish commercialized in that city. Fifty fresh squids (*Dorytheutis brasiliensis*, Blainville, 1823). Methods described by the International Commission on Microbiological Specification for Foods-ICMSF (1983) were used to identify and enumerate *V. parahaemolyticus* and Heiberg's classification was a complementary test. *V. parahaemolyticus* was identified in three samples (6%); in one of them it grew in an environment with 10% salt concentration during halophilism probe. Most probable number (MPN) average for *V. parahaemolyticus* was 19,3 bacteria per gram. The three samples submitted to Heiberg's classification showed a profile compatible with group VII (sacarose-, manose+, arabinose-). We concluded that, even under inadequate commercialization, manipulation and refrigeration conditions, *V. parahaemolyticus* frequencies and MPNs are low.

Key words: Marine vibrios, *Vibrio parahaemolyticus*

## Referências Bibliográficas

BAROSS, J., LISTON, J. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature*, Lon., v. 217, p. 1263-1264, 1968.

BARROS, G.C. *Vibrio parahaemolyticus*: Isolamento e Identificação em Crustáceos e Moluscos da Baía de Sepetiba. Niterói, 1977. 70p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária (Área de Concentração de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense.

BARTLEY, C.H., SLANETZ, L.W. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Estuarine Waters and Oysters of New Hampshire. *Applied Microbiology*, v. 107, n. 1, p. 268-294, 1971.

BLAKE, P.A., WEAVER, R.E., HOLLIS, D.G. Diseases of Humans (other than cholera) Caused by Vibrios. *Annual Review of Microbiology*, v. 34, p. 341-367, 1980.

BOCKEMUHL, J., TRIEMER, A. Ecology and Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* on the Coast of Togo. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 51, n. 4, p. 353-360, 1974.

CHATTERJEE, B.D. Present Status of Heiberg Groups for classifying Cholera-like Organisms. *Indian Journal of Medical Research*, v. 2. p. 479-483, 1974.

CHATTERJEE, B.D., GORBACH, S.L., NEOGY, K.N. Characteristics of Non-Cholera Vibrios Isolated from Patients with Diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, v. 3, n.4, p. 677-682, 1970.

CHUN, D., CHUNG, J.K., SEOL, S.Y. TAK, R. *Vibrio parahaemolyticus* in the Republic of Korea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 23, n.6, p. 1125-1130, 1974.

COLWELL, R.R. Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. *Journal of Bacteriology*, v. 104, n. 1, p. 410-433, 1970.

COVERT, D., WOODBURN, M. Relationships of Temperature and Sodium Chloride Concentration to the Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in Broth and Fish Homogenate. *Applied Microbiology*. v. 23, n. 2, p. 321-325, 1972.

FISBBEIN, M., WENTZ, B. *Vibrio parahaemolyticus* Methodology for Isolation from Seafoods and Epidemic Specimens. *Journal of Milk and Food Technology* v. 36, n. 2, p. 118-123, 1973.

FUJINO, T., OKUNO, Y., NAKADA, D., AOYAMA, A., FUKAI, K., MURAI, K., UEHO, T. On the Bacteriological Examination of Shirasu Food Poisoning. *Journal of the Japanese Association of Infectious Diseases*, v. 25, p. 11-16, 1951.

GJERDE, J., BOE, B. Isolation and Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* from the Norwegian Coastal Environment. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 22, p. 331-343, 1981.

HEIBERG, B. The Biochemical Reactions of Vibrios. *Journal of Hygiene*, Lond. v. 36, p. 114-117, 1936.

International Commission on Microbiological Specifications for foods. *Microorganismos de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1983. 2 v. v.1: Técnicas de análisis microbiológico. 431p.

JEGATHESAN, M., PARAMASIVAM, T. Emergence of *Vibrio parahaemolyticus* as an Important Cause of Diarrhea in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 25, n.1, p. 201-202, 1976.

JOHNSON, H.C., BAROSS, J.A., LISTON, J. *Vibrio parahaemolyticus* and its Importance in Seafood Hygiene. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 159, n. 11, p. 1470-1473, 1971.

KAMPELMACHER, E.H., MOSSEL, D.A.A., JANSEN, L.M. van N., VICENTIE, H. A Survey of the Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*, on Mussels and Oysters and in Estuarine Waters in the Netherlands. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 35, n. 3, p. 431-438, 1972.

KAMPELMACHER, E.H., MOSSEL, D.A.A., JANSEN, L.M. van N., VICENTIE, H. A Survey on the Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* on Fish and Shellfish, Marketed in the Netherlands. *Journal of Hygiene*, Camb., v. 68, n. 2, p. 189-196, 1970.

KAWABATA, T., HALSTEAD, B.W., JUDFIND, T.F. A Report of a Series of Recent Outbreaks of Unusual Cephalopod and Fish Intoxications in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 6, n. 5, p. 935-939, 1957.

KAYSNER, C.A. Incidence of *Vibrio alginolyticus* and Bacteria of Sanitary Significance in the Bering Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 5, p. 1279-1282, 1981.

KRISTENSEN, K.K. The Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* in the Sound. *Nordisk Veterinaer-Medicine*, v. 26 n. 3/4, p. 188-196, 1974.

LEITÃO, M.F.F., ARINA, H.K. *Vibrio parahaemolyticus* no Ambiente Marinho do Estado de São Paulo. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v.6, p. 149-166, 1975.

- MACFADDIN, J.F. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias de Importancia Clínica*. Buenos Aires, Panamericana, 1985. 301p.
- NELSON, K.J., POTTER, N.N. Growth of *Vibrio parahaemolyticus* at Low Salt Levels and in Nonmarine Foods. *Journal of Food Science*, v. 41, n. 6, p. 1413-1417, 1976.
- OLSEN, H. *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Discharge from the Ear in Two Patients Exposed to Sea Water. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. Section B: Microbiology et Immunology, v. 86, n. 4, p. 247-248, 1978.
- PEZZLO, M., VALTER, P.J., BURNS, M.J. Wound Infection Associated With *Vibrio alginolyticus*. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 71, n. 4, p. 476-478, 1979.
- SAKAZAKI, R., IWANAMI, S., FUKUMI, H. Studies on the Enteropathogenic, Facultatively Halophilic Bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, Cultural and Biochemical Properties and its Taxonomical Positions. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, v. 16, p. 161-188, 1963.
- SHINODA, S., NAKAHARA, N., NINIMIYA, Y., ITO, K., KANE, H., ZEN-YOTI, H., SAKAI, S., TERAYANA, T., KUDO, Y., ITO, T., BENOKI, M. NAGASAKI, M. Serological Method for Identification of *Vibrio parahaemolyticus* from Marine Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 45 n.1, p. 148-152, 1983.
- THOMPSON, Jr. S.A. VANDERZANT, C., RAY, S.M. Effect of Processing, Distribution and Storage on *Vibrio parahaemolyticus* and Bacterial Counts of Oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Science*, v. 41, n. 1, p. 123-127, 1976.
- THOMPSON, S.A., VANDERZANT, C., RAY, S.M. Relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters, Water and Sediment, and Bacteriological and Environmental Indices. *Journal of Food Science* v. 41, n. 1, p. 117-122, 1976.
- TWEDT, R.M., SPAULDING, P.L., HALL, H.E. Morphological, Cultural, Biochemical and Serological Comparison of Japanese Strains of *Vibrio parahaemolyticus* with Related Cultures Isolated in the United States. *Journal of Bacteriology*, V. 98, n. 2, p. 511-518, 1969.
- VANDERZANT, C., NICKELSON, R. Procedure for Isolation and Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, v. 23, n.1, p. 26-33, 1972.
- ZEN-YOJI, H., SAKAI, S., TERAYANA, T., KUTO, Y., ITO, T., BENOKI, M. NAGASAKI, M. Epidemiology, Enteropathogenicity, and Classification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 115, n. 5, p. 436-444, 1965.