

MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS EM PESCADOS DO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS

JANAINA VIANA DA ROSA¹; CAROLINA JANELLI DA SILVA¹; FRANCIELE BARBOSA¹; CLÁUDIO DIAS TIMM²

¹Universidade Federal de Pelotas – janavrosa@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o consumo de peixes vem aumentando, já que ele fornece proteínas, possui baixa quantidade de gordura saturada e é rico em micronutrientes, além de ser também fonte de ácidos graxos, como ômega-3, que propiciam benefícios para a saúde humana (FDA, 2009). Por ser um alimento com características intrínsecas necessárias à sobrevivência de muitos patógenos, constitui um potencial veículo de micro-organismos causadores de doenças em seres humanos (APHA, 2001). Estudos indicam os manipuladores de alimentos como um dos principais fatores implicados em surtos de doenças de origem alimentar, relacionando-os diretamente com a contaminação dos alimentos, decorrente de doenças, de maus hábitos de higiene e de práticas inadequadas na operacionalização do sistema produtivo de refeições (CAVALLI e SALAY, 2007).

V. parahaemolyticus é considerado um patógeno relevante nas regiões costeiras de clima temperado e tropical em todo o mundo (MARTINEZ-URTAZA et al., 2004), sendo encontrado em ambiente tipicamente marinho e estuarino (LIMA, 1997). Este micro-organismo pode causar diarreia, dor abdominal, vômitos, febre e dores de cabeça, associadas ao consumo de peixes, moluscos e crustáceos, crus ou mal cozidos (HEITMANN et al., 2005). O estudo dos perfis moleculares de isolados de *V. parahaemolyticus* obtidos de peixes inteiros e de peixes eviscerados prontos para consumo é um valioso instrumento para o avanço no conhecimento das Doenças Transmitidas por Alimentos causadas por essa bactéria. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo o isolamento de *V. parahaemolyticus* de peixes do estuário da Lagoa dos Patos, capturados e processados artesanalmente.

2. METODOLOGIA

Em seis desembarques de pescados capturados na colônia de pescadores Z-3, no município de Pelotas, RS, provenientes de capturas realizadas com métodos artesanais no estuário da Lagoa dos Patos, foram coletados aleatoriamente cinco peixes inteiros no momento de cada desembarque e cinco após o processamento (evisceração e higienização) para venda aos consumidores, totalizando 60 amostras. Os pescados foram imediatamente encaminhados ao laboratório para análise. As coletas foram realizadas nos meses de abril e outubro de 2013.

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi feita conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration - FDA (KAYSNER e DEPAOLA, 2004), com modificações. As guelras e o fígado de cada peixe foram coletados, colocados em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia), massageados por 5 minutos e incubados a 37 °C por 24 horas para enriquecimento. A partir do material da superfície dessas culturas foram feitas sementeiras por esgotamento em ágar Tiosulfato Citrato Bili Sacarose (TCBS, Himedia) e incubação a 37 °C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas. Até

três colônias típicas de cada placa foram semeadas em APA e, após incubação a 37 °C por 24 horas foram misturadas com 20% de glicerol para manutenção de estoque a -70 °C. Os isolados foram recuperados em APA a 37 °C por 24 horas, quando necessário. Porções de aproximadamente 25 g foram cortadas transversalmente do pescado processado artesanalmente para venda e colocadas em APA para pesquisa de *Vibrio*, seguindo os procedimentos descritos anteriormente.

Os DNAs dos isolados foram extraídos conforme SAMBROOK e RUSSEL (2001). Resumidamente, foi feita uma cultura em tubos contendo APA e após incubação a 37°C por 24 horas, o pellet obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA foi ressuscitado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram então adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70 °C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -70 °C.

Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *toxR*, para identificação de *V. parahaemolyticus* conforme BILUNG et al. (2005), com modificações. Cada reação teve um volume final de 20 µL. Foram utilizados 10 µL de Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil), 1 µL (10 pmol) de cada primer, 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 96 °C por 5 min, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63 °C por 1,5 min, extensão a 72 °C por 1,5 min e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,8%. Como controle positivo, foi utilizado o DNA de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 e controle negativo foi utilizada água pura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amostrados 60 peixes (30 inteiros e 30 limpos) e analisados quanto à presença de *V. parahaemolyticus*. As espécies capturadas e desembarcadas na época do ano em que o trabalho foi realizado foram a corvina (*Micropogonias furnieri*) e a tainha (*Mugil platanus*). As duas espécies albergavam o micro-organismo pesquisado (Tabela 1). Este é o primeiro registro de isolamento de *V. parahaemolyticus* de *M. furnieri* e *M. platanus*.

Tabela 1: Quantidade e época das coletas, espécies e isolados em cada tipo de peixe analisado.

Desembarques	Meses	Pescados	<i>V. parahaemolyticus</i>	
			Peixes inteiros	Peixes eviscerados
1	Abril	<i>M. platanus</i>	1	0
2	Abril	<i>M. platanus</i>	1	1
3	Abril	<i>M. platanus</i>	0	2
4	Outubro	<i>M. furnieri</i>	1	0
5	Outubro	<i>M. furnieri</i>	0	0
6	Outubro	<i>M. furnieri</i>	0	0

V. parahaemolyticus foi isolado de três (10%) amostras de peixes inteiros e de três (10%) de peixes já eviscerados e prontos para o comércio (Tabela 1). PEREIRA et al. (2007) isolaram *V. parahaemolyticus* em 11,6% de 86 amostras de mexilhões (*Perna perna*) provenientes do município de Niterói, RJ, que possui clima tropical. VIEIRA et al. (2004) encontraram em 90 amostras de caranguejos de água doce (*Ucides cordatus*) analisadas, 8,9% positivas para *V. parahaemolyticus*, em Fortaleza, CE, onde o clima é semi-árido. No nosso trabalho as coletas foram em épocas de clima ameno, por isso o número de isolamentos do micro-organismo foi semelhante àqueles obtidos por VIEIRA et al. (2004) e PEREIRA et al. (2007).

Além das chuvas e dos índices de evaporação, os ventos também controlam decisivamente a circulação, a distribuição de salinidade e os níveis de água na Lagoa dos Patos (GARCIA, 1998). Essas mudanças influenciam a quantidade de micro-organismos, já que pode haver entrada de água e outras espécies de animais contaminados. *V. parahaemolyticus* é encontrado com maior frequência em águas que apresentam uma ampla faixa de salinidade, semelhante àquela encontrada em estuários e áreas costeiras (KELLY e STROH, 1988). Na Lagoa dos Patos, os meses de verão são aqueles em que ocorre maior entrada de água salgada (ANACLETO e GOMES, 2006), conseqüentemente, é possível que a incidência de *V. parahaemolyticus* seja maior nessa época do ano.

4. CONCLUSÕES

Os peixes das espécies *M. furnieri* e *M. platanus* capturados no estuário da Lagoa dos Patos podem albergar *V. parahaemolyticus* e este pode também estar presente no pescado limpo, sendo um alerta quanto à importância da adoção de medidas higiênico-sanitárias corretivas e preventivas através das boas práticas de fabricação, assim como quanto à necessidade de maior fiscalização da cadeia de produção de pescados por parte dos órgãos competentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3.ed. Whashington: DDC Vanderzant & DF Splittstoesser, 2001.

- ANACLETO, E.I.; GOMES, E.A.T. Relações tróficas no plâncton em um ambiente Estuarino tropical: Lagoa dos Patos (RS), Brasil. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.1, n.2, p.26-39, 2006.
- BILUNG, M.L.; RADU, S.; BAHAMAN, R.A.; RAHIM, A.R.; NAPIS, S.; KQUEEN, Y.C.; MURUGAIAH, C.; HADI, A.Y. et al. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara geanosa*). **American Journal of Immunology**, Austrália, v.1, p.31-36, 2005.
- CAVALLI, S. B.; SALAY, E. Gestão de pessoas em unidades produtoras de refeições comerciais e a segurança alimentar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.6, p.657-667, 2007.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Draft report of quantitative risk and benefit assessment of consumption of commercial fish, focusing on fetal neurodevelopmental effects (measured by verbal development in children) and on coronary heart disease and stroke in the general population.** FDA, Silver Spring, MD, 15 jan. 2009. Acessado em 07 jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/metals/ucm088794.htm>
- GARCIA, C. A. E. Características hidrográficas. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J. P. **Os ecossistemas costeiro e marinho do Extremo Sul do Brasil**, Rio Grande: Ecoscientia, 1998. Cap.4, p.18-21.
- HEITMANN, I.G.; JOFRE, L.M.; HORMAZABAL, O.J.C.; OLEA, A.; VALLEBUONA, C.; VALDES, C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectologia**, Santiago, v.22, n.2, p.131-140, 2005.
- KAYSNER, C.A.; DEPAOLA Jr. **Vibrio**. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM), Silver Spring, MD, mai. 2004. Acessado em: 08 jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>
- KELLY, M.T.; STROH, E.M.D. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. **Journal Clinical Microbiological**, Washington D.C, v.26, p.1754-1756, 1988.
- LIMA, F.C. *Vibrios* marinhos II. *Vibrios* não coléricos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.49, p.8-13, 1997.
- MARTINEZ-URTAZA, J.; LOZANO-LEON, A.; DEPAOLA, A.; ISHIBASHI, M.; SHIMADA, K.; NISHIBUCHI, M.; LIEBANA, E. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Santiago de Compostela, v.42, p.4672-4678, 2004.
- PEREIRA, C.S.; POSSAS, C.A.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.40, n.1, p.56-59, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- VIEIRA, R.H.S.F.; LIMA, E.A.; SOUZA, D.B.R.; REIS, E.F.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.46, n.4, 2004.