



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

PRISCILA FERNANDA CORTINA

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE
Vibrio spp. E O EFEITO NO CRESCIMENTO DE *Vibrio*
parahaemolyticus EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO DE OSTRAS (*Crassostrea gigas*)**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

PRISCILA FERNANDA CORTINA

**COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE
Vibrio spp. E O EFEITO NO CRESCIMENTO DE *Vibrio*
parahaemolyticus EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO DE OSTRAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cleide Rosana Werneck Vieira

Florianópolis – SC
2016.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Cortina, Priscila Fernanda

Comparação de Metodologias para Detecção de *Vibrio* spp. e o Efeito no Crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* em Diferentes Condições de Armazenamento de Ostras / Priscila Fernanda Cortina ; orientador, Cleide Rosana Werneck Vieira. Florianópolis - SC

120 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Ciências de Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. Ostras. 3. *Crassostrea gigas*. 4. *Vibrio cholerae*. 5. *Vibrio parahaemolyticus* I. Vieira, Cleide Rosana Werneck. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. IV. Título.

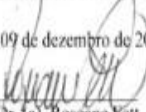
COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE *Vibrio*
spp. E O EFEITO NO CRESCIMENTO DE *Vibrio parahaemolyticus* EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE OSTRAS
(*Crassostrea gigas*)

Por


Priscila Fernanda Cortina


Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
"Mestrado em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 09 de dezembro de 2015

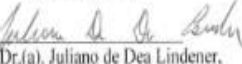

Prof. (a). Dr. (a). Roseane Fett
Coordenador

Banca Examinadora:


Prof.(a). Dr.(a). Cleide Rosana Werneck Vieira,
Orientador (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Roberta Juliano Ramos,
Membro (Estácio de Sá)


Prof.(a). Dr.(a). Elaine Schwinden Prudêncio,
Membro (UFSC)


Prof.(a)/Dr.(a). Juliano de Dea Lindener,
Membro (UFSC)

Aos meus pais dedico esta conquista por tudo o que representam e me ensinaram. Pelo amor, incentivo e apoio em todas as fases de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida, por me conceder esperança, força para continuar, acreditar e recomeçar.

Aos meus pais, Ademir e Lucimar Cortina e toda minha família, sem o apoio de vocês tudo seria mais difícil, pois mesmo distantes continuam me fortalecendo com o seu amor, amo vocês!

Agradeço a minha orientadora, professora Cleide Rosana Werneck Vieira pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, confiança, apoio e amizade.

Aos professores membros da banca, Roberta Juliano Ramos, Elane Schwinden Prudêncio e Juliano De Dea Lindner por aceitarem o convite e importante contribuição a este trabalho.

Aos colegas, grandes amigos do laboratório de microbiologia de alimentos, pelo prazer da convivência diária, pela amizade e principalmente ajuda para realização de minha pesquisa. Cada momento foi marcante, com muita risada e alegria. Agradeço e tenho vocês em meu coração...Helen Silvestre, Marília Miotto, Karin Medeiros, Clarissa Barreta, Simone Moraes Raszl e Norton Komora.

Em especial quero agradecer a minha grande amiga Helen Silvestre, pelo incentivo de iniciar o mestrado, compartilhando suas experiências e por toda sua ajuda nos momentos mais difíceis de minha pesquisa.

Aos Professores da Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, que contribuíram para minha formação acadêmica. A UFSC pelo ótimo programa de pós-graduação, e a CAPES, por financiar este estudo.

Aos amigos do laboratórios de extensão e ao funcionário Carlão pela ajuda nas coletas de amostra, possibilitando a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que torceram e que de alguma forma contribuíram para esta importante conquista.

Muito Obrigada!

Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

O estado de Santa Catarina, por suas características geográficas e da qualidade das águas litorâneas, tornou-se um ambiente ideal para o cultivo de organismos marinhos, especialmente moluscos bivalves, como ostras da espécie *Crassostrea gigas*. O fato de as ostras serem tradicionalmente consumidas *in natura*, reforça a necessidade de medidas eficientes de controle da produção e de métodos adequados e rápidos para detecção de patógenos. O método de coleta, as condições de armazenamento sob refrigeração e manuseio influenciam sobre a qualidade das ostras comercializadas, sendo que algumas espécies, como *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* são potencialmente patogênicas para o homem, representando riscos à saúde pública. As análises convencionais para detecção e quantificação de *Vibrio* spp., como a ISO 21872 e Número mais Provável (NMP), apesar de ainda muito utilizadas no Brasil, são técnicas laboriosas, demoradas e de sensibilidade reduzida. Os métodos moleculares atuais, como o PCR em tempo real, por exemplo, são extremamente sensíveis, rápidos e eficientes para a detecção de patógenos alimentares. Com base nisso, esse estudo teve como objetivo comparar os métodos ISO 21872 e PCR em tempo real em amostras de ostras (*C. gigas*) artificialmente contaminadas com *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* e avaliar os efeitos da temperatura e do tempo no armazenamento de ostras (*C. gigas*) contaminadas com *V. parahaemolyticus*. Foram analisadas um total de 70 amostras de ostras contaminadas artificialmente com *Vibrio* spp. e foi possível obter as seguintes positivities para o método ISO 21872: *V. cholerae*, 78,6%; *V. parahaemolyticus*, 71,43%; *V. vulnificus*, 78,6%; *V. cholerae* e *V. alginolyticus*, 64,29%; *V. vulnificus* e *V. mimicus* 64,29% e 100% de detecção para todas as amostras pelo método de PCR em tempo real. Os resultados mostraram uma alta sensibilidade do método PCR em tempo real. Com relação aos efeitos da temperatura e do tempo no armazenamento de ostras (*C. gigas*) contaminadas com *V. parahaemolyticus*, verificou-se que as ostras contaminadas naturalmente com *V. parahaemolyticus*, apresentaram um aumento nas contagens no quinto dia de armazenamento, de 1,9 log NMP g⁻¹ para a temperatura de 7°C e 3,5 log NMP g⁻¹ para temperatura de 20°C, valores superiores foram observados nas contagens de amostras artificialmente contaminadas no quinto dia de armazenamento, de 3,8 log NMP g⁻¹ para a temperatura de 7°C, e valores superiores de 5,2 log NMP g⁻¹ para

temperatura de 20°C, sendo assim, as condições de armazenamento influenciaram sobre a qualidade microbiológica final das ostras.

Palavras-chave: Ostras, *Crassostrea gigas*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, ISO 21872, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Due the existence of countless environmental preservation areas, such as bays and estuaries, associated with the good quality of the water, the coast of Santa Catarina state, Brazil, has become ideal for marine organisms cultures, especially bivalve mollusks such as the oyster species *Crassostrea gigas*. The fact that the oysters are traditionally consumed *in natura* reinforces the need for effective measures to control the production and appropriate methods and rapid detection of pathogens. The method of collection, the storage conditions under refrigeration and handling influence on the quality of commercialized oysters, and some species such as *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* are potentially pathogenic to man, representing a risk to public health. Conventional methods for detection and quantification of *Vibrio* spp. such as ISO 21872 and Most Probable Number (MPN), still widely used in Brazil, has laborious, high time consuming and reduced sensitivity. Current molecular techniques, such as real-time PCR, for example, are extremely sensitive, fast and effective for the detection of foodborne pathogens. On that basis, this study aimed to compare the ISO 21872 and real-time PCR methods in oyster samples (*C. gigas*) artificially contaminated with *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* and evaluate the effects of temperature and time in storage oyster (*C. gigas*) contaminated with *V. parahaemolyticus*. They analyzed a total of 70 samples oysters artificially contaminated with *Vibrio* spp. so it was possible to obtain the following positive aspects to the ISO 21872 method: *V. cholerae*, 78.6%; *V. parahaemolyticus*, 71.43%; *V. vulnificus*, 78.6%; *V. cholerae* and *V. alginolyticus*, 64.29%; *V. vulnificus* and *V. mimicus* 64.29% and 100% detection rate for all samples by PCR method in real time. The results showed a high sensitivity of PCR in real time. In relation to the effects of temperature and time storage of the oysters (*C. gigas*) contaminated with *V. parahaemolyticus*, it was found that the oysters contaminated naturally *V. parahaemolyticus*, showed an increase in counts on the fifth day of storage, 1.9 MPN g⁻¹ for temperature 7°C and 3.5 MPN g⁻¹ for temperature 20°C, higher values were observed in the samples artificially contaminated on the fifth day of storage, 3.8 MPN g⁻¹ for temperature 7°C and higher values of 5.2 MPN g⁻¹ for temperature 20°C and thus storage conditions influenced on the final microbiological quality of oysters.

Keywords: Oyster, *Crassostrea gigas*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, ISO 21872, Real time PCR.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figura 1. Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina..... | 33 |
| Figura 2. Evolução da produção de ostras comercializados em Santa Catarina..... | 34 |
| Figura 3. Ostra (<i>Crassostrea gigas</i>)..... | 36 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fluxograma para detecção de <i>Vibrio</i> spp. pelos métodos ISO 21872 e PCR em tempo real..... | 52 |
|---|----|

CAPÍTULO III

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Contagens de bactérias halofílicas em ostras naturalmente contaminadas com <i>V. parahaemolyticus</i> armazenadas a 7°C e 20°C...105 | 105 |
| Figura 2. Contagens de bactérias halofílicas em ostras artificialmente contaminadas com <i>V. parahaemolyticus</i> armazenadas a 7°C e 20°C...107 | 107 |
| Figura 3. Contagens de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em ostras naturalmente contaminadas armazenadas a 7°C e 20°C..... | 109 |
| Figura 4. Contagens de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em ostras artificialmente contaminadas armazenadas a 7°C e 20°C..... | 111 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Caracterização e número de amostras de ostras artificialmente contaminadas com <i>Vibrio</i> spp..... | 74 |
| Tabela 2. Mix da reação de PCR para detecção de <i>Vibrio</i> spp..... | 79 |
| Tabela 3. Número da amostra e <i>Cycle Threshould</i> (CT) obtidos na amplificação pelo método de PCR em tempo real nas diferentes amostras de ostras artificialmente contaminadas com <i>Vibrios</i> spp..... | 83 |
| Tabela 4. Avaliação estatística dos resultados das análises de <i>Vibrio</i> spp. em amostras de ostras artificialmente contaminadas pelo teste McNemar..... | 84 |
| Tabela 5. Cálculo da concordância relativa e sensibilidade relativa entre os métodos ISO 21872 e PCR em tempo real na detecção de <i>Vibrio</i> spp em amostras de ostras artificialmente contaminadas..... | 85 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Sequência de <i>primers</i> desenhados para quantificação de <i>V. parahaemolyticus</i> | 102 |
|---|-----|

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 25 |
| CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 29 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 31 |
| 2.1 Malacocultura no Brasil..... | 31 |
| 2.2 Caracterização da ostra <i>Crassostrea gigas</i> | 35 |
| 2.3 Aspectos gerais da microbiologia de moluscos bivalves..... | 38 |
| 2.4 <i>Vibrio</i> sp..... | 40 |
| 2.4.1 <i>Vibrio cholerae</i> | 42 |
| 2.4.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 43 |
| 2.4.3 <i>Vibrio vulnificus</i> | 43 |
| 2.5 Métodos de detecção em alimentos..... | 45 |
| 2.5.1 Método número mais provável (NMP)..... | 47 |
| 2.5.2 Metodologia ISO/TS 21872..... | 48 |
| 2.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 49 |
| 2.5.4 PCR em tempo real..... | 51 |
| 3 REFERÊNCIAS..... | 53 |
| CAPÍTULO II- COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODOS ISO 21872 E O PCR EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE <i>Vibrio cholerae</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i> EM OSTRAS (<i>Crassostrea gigas</i>) | 69 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 71 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 72 |
| 2.1 Amostras..... | 72 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 2.2 | Preparação das culturas bacterianas..... | 73 |
| 2.3 | Ensaio Microbiológico..... | 74 |
| 2.3.1 | Contaminação das amostras | 75 |
| 2.4 | Detecção pelo método ISO/TS 21872..... | 76 |
| 2.4.1 | Primeiro enriquecimento seletivo..... | 76 |
| 2.4.2 | Segundo enriquecimento seletivo..... | 76 |
| 2.4.3 | Isolamento e Identificação..... | 76 |
| 2.4.4 | Confirmação Bioquímica..... | 77 |
| 2.5 | Detecção pelo método PCR em tempo real..... | 78 |
| 2.5.1 | Preparo das amostras..... | 78 |
| 2.5.2 | Extração de DNA..... | 78 |
| 2.5.3 | PCR em tempo real..... | 78 |
| 2.6 | Análise Estatística..... | 80 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 81 |
| 3.1 | Detecção pelo método ISO/TS 21872..... | 81 |
| 3.2 | Detecção pelo método PCR em tempo real..... | 82 |
| 3.3 | Comparação entre os métodos de detecção..... | 84 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 87 |
| 5 | REFERÊNCIAS..... | 88 |
| | CAPÍTULO III- EFEITO DO CRESCIMENTO DE <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE OSTRAS (<i>Crassostrea gigas</i>)..... | 95 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 97 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| 2.1 Amostras..... | 99 |
| 2.2 Preparo das amostras..... | 100 |
| 2.2.1 Ostras naturalmente contaminadas..... | 100 |
| 2.2.2 Ostras artificialmente contaminadas..... | 100 |
| 2.3 Ensaios microbiológicos..... | 101 |
| 2.3.1 Preparo e diluições das amostras..... | 101 |
| 2.3.2 Contagem de bactérias..... | 101 |
| 2.3.3 Contagem de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - PCR em tempo real..... | 101 |
| 2.3.3.1 Extração de DNA..... | 102 |
| 2.3.3.2 Desenho de primers..... | 102 |
| 2.3.3.3 Avaliação da seletividade dos primers..... | 102 |
| 2.3.3.4 Construção da curva padrão..... | 103 |
| 2.3.3.5 Preparo da reação e condições de ciclagem..... | 103 |
| 2.4 Análise Estatística..... | 104 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 104 |
| 3.1 Contagem de bactérias halofílicas..... | 104 |
| 3.2 Contagem de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - PCR em tempo real..... | 108 |
| 3.2.1 Avaliação da seletividade dos primers..... | 108 |
| 3.2.2 Construção da curva padrão..... | 108 |
| 3.2.3 Contagem de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em ostras..... | 109 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 113 |
| 5 REFERÊNCIAS..... | 113 |

INTRODUÇÃO

A aquicultura compreende a criação e o cultivo de organismos em ambiente aquático controlado, mediante técnicas específicas, cujo objetivo é o desenvolvimento, crescimento e comercialização destes, sejam eles cultivados em águas salgadas, salobra ou doce (PILLAY e KUTT, 2005; SANTOS et al., 2009).

Em seu último relatório, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) sinalizou a atividade como uma grande promessa para suprir a crescente demanda por fontes saudáveis de proteína estima-se que o atual consumo mundial de pescados, seja de 19,2 kg de pescado por habitante ao ano (FAO, 2014).

A produção mundial de pescado em 2012 foi de 158 milhões de toneladas, das quais 136,2 milhões de toneladas foram utilizadas no consumo humano. Dessas 136 milhões de toneladas, 69,6 milhões de toneladas (51,1%) tiveram origem na pesca, enquanto 66,6 milhões (48,9%) de toneladas tiveram origem na aquicultura. Por sua vez, a produção mundial de aquicultura em 2012 (66,6 milhões de toneladas) está dividida da seguinte forma: aquicultura de água doce, com 41,9 milhões de toneladas (62,9%) do total e aquicultura marinha com 24,7 milhões de toneladas (37,1 %) do total (FAO, 2014).

O cultivo de moluscos bivalves no litoral brasileiro, tem se mostrado uma atividade viável, no qual a demanda vem gradativamente aumentando e várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando o aumento da produção. A produção de ostras, seja através de sua extração em bancos naturais, ou da implantação de estruturas de cultivo, é uma fonte de renda importante para a economia de muitas comunidades pesqueiras situadas ao longo da costa brasileira (FERREIRA, 2006; OSTRENSKY et al., 2008; SANTA CATARINA, 2010).

No Brasil, a espécie conhecida como ostra do Pacífico ou Japonesa (*Crassostrea gigas*, THUNBERG, 1793) é a mais cultivada especialmente, nas regiões Sudeste e Sul, devido ao investimento em tecnologias e a produção regular de sementes em laboratório (MELO et al., 2010; TURECK, 2010). O Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC é o principal laboratório no Brasil a produzir regularmente semente de ostras do Pacífico, considerado o principal pilar de sustentação da atividade, sendo um dos grandes responsáveis por Santa Catarina ser o principal estado produtor de moluscos marinhos, além de

possuir a capacidade de atender a demanda de outros estados como, São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Piauí, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Ceará (FERREIRA e OLIVEIRA NETO, 2008; CRUZ, 2011).

Segundo o Ministério da Pesca e da Aquicultura (MPA), o estado de Santa Catarina comporta a maior produção nacional de moluscos bivalves e o segundo maior produtor de moluscos da América Latina (BRASIL, 2013). Responsável por aproximadamente 90% da produção nacional de ostras de cultivo comercializadas em todo o território nacional, sendo o município de Florianópolis o maior produtor de ostras de Santa Catarina (SANTOS et al., 2012; SOUZA e PETCOV, 2013). As Baías norte e sul são responsáveis por 94,37% da produção estadual de ostras cultivadas (SANTA CATARINA, 2014).

Considerando que as ostras (*C. gigas*) são geralmente consumidas *in natura*, sem cozimento prévio, são vistas como alimento de alto risco e estão largamente associadas com intoxicações e infecções alimentares. Sua curta vida de prateleira e um meio propício para o desenvolvimento de patógenos, torna-se de extrema importância para o crescimento e ganho do mercado externo, o desenvolvimento de processos que possam vir a garantir a segurança alimentar dos consumidores de ostras produzidas em Santa Catarina (PORTELLA, 2005; RAMOS, 2007; MIOTTO, 2012).

A microbiota presente nas ostras costuma refletir as condições do ambiente de cultivo, podendo ser influenciada pela temperatura e salinidade da água, porém, o método de coleta e as condições de armazenamento e manuseio também exercem grande influência sobre sua qualidade microbiológica (FELDHUSEN, 2000; VIEIRA et al., 2011). A conservação será garantida, enquanto os animais são mantidos em baixas temperaturas e estiverem com suas valvas fechadas, mas a sua decomposição ocorre muito rapidamente após a morte (VIEIRA, 2004).

As bactérias patogênicas relacionadas a alimentos marinhos podem ser divididas em três grupos, aquelas que são componentes naturais de ambientes marinho ou estuário (*Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Aeromonas hydrophila*); bactérias entéricas que estão presentes neste ambiente devido a contaminação fecal; e bactérias introduzidas durante o manuseio pós-

coleta ou processamento (FELDHUSEN, 2000; JAKSIC et al., 2002; NORHANA et al., 2010).

Diferentes espécies do gênero *Vibrio* ocorrem naturalmente em ambientes marinhos, costeiros e estuários, sendo que algumas espécies, como *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae* são potencialmente patogênicas para o homem, e podem estar presentes em moluscos crus ou parcialmente submetidos à cocção (THOMPSON et al., 2004).

A utilização de métodos de detecção de micro-organismos é uma das ferramentas que garantem a segurança microbiológica dos alimentos. Métodos tradicionais utilizados em microbiologia são baseados nos aspectos morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. Neste sentido, métodos microbiológicos clássicos também chamados convencionais são aplicados, porém tais métodos apresentam desvantagens que podem levar a liberação de lotes de alimentos contaminados devido a amostras falso-negativas (MAZIERO, 2007; GANDRA et al., 2008).

Os métodos rápidos de análises microbiológica de alimentos surgiram como consequência da necessidade de se reduzir o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial, visando a simplificação do trabalho. A principal vantagem dos métodos rápidos é permitir liberação mais rápida de resultados na indústria de alimentos, como uma ferramenta de triagem os resultados negativos são considerados definitivos, enquanto resultados positivos são considerados presuntivos e requer a confirmação dos resultados por um método de referência (MARLONY et al., 2003; FENG, 2007).

As metodologias moleculares são mais rápidas e sensíveis, a introdução da reação em cadeia da polimerase (PCR) estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura, sendo a PCR em tempo real o avanço promissor na tecnologia em diagnóstico microbiano. A metodologia permite à amplificação, detecção e quantificação de DNA em única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações (MARLONY et al., 2003; LOURENÇO, 2011).

O diagnóstico molecular via PCR representa redução custos, tempo de análise, aumento da confiabilidade e da especificidade e é de fácil aprendizagem, além disso, é capaz de detectar célula no estado viável não cultivável (VNC) (TEODORO et al., 2006). Assim, a inovação em métodos microbiológicos qualitativos é requerida a fim de reduzir ou eliminar os inconvenientes dos métodos convencionais (TANG et al., 2009; IPARDES, 2011).

Desta forma, a dissertação foi dividida em três capítulos: o primeiro, uma revisão bibliográfica a respeito de todos os assuntos abordados neste trabalho, tais como: malacocultura no Brasil; caracterização da ostras *Crassostrea gigas*; aspectos da microbiologia de moluscos bivalves; *Vibrio* spp.; métodos de detecção no controle de microbiologia de alimentos; método número mais provável (NMP); metodologia ISO/TS 21872; reação em cadeia da polimerase (PCR); PCR em tempo real. O segundo capítulo, teve como objetivo: detectar *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* através dos métodos ISO 21827 e PCR em tempo real em ostras (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas; comparar o desempenho entre os métodos de detecção. O terceiro e último capítulo, teve como objetivo; avaliar o efeito no crescimento de *V. parahaemolyticus* e de bactérias halofílicas em ostras (*Crassostrea gigas*) naturalmente e artificialmente contaminadas armazenadas em diferentes tempos à 7°C e 20°C.

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Malacocultura no Brasil

A aquicultura, que envolve o cultivo de moluscos, algas, camarões, crustáceos e peixes, é uma atividade que tem adquirido importância em diversos países de vasto litoral como fornecedora de proteína animal. Na América Latina, a aquicultura tem avançado, sendo que os principais países produtores são Brasil, México, Equador e Chile (SOUZA-FILHO, 2003; FAO, 2010).

Segundo o Ministério da Pesca e da Aquicultura (MPA), destaca-se a região Nordeste, atualmente a maior produtora de pescados do Brasil, isto se deve ao aumento da produção de peixes nativos e camarão naquela região, já na região Sul, que está em segundo lugar, é caracterizada principalmente pela produção de peixes de água doce e de moluscos (BRASIL, 2013).

A malacocultura, é baseada no cultivo de três espécies: o mexilhão, a ostra e a vieira representando uma das principais atividades da aquicultura mundial. O Brasil é o segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina, ficando atrás apenas do Chile (VICENTE et al., 2010). O cultivo de moluscos é o setor da aquicultura brasileira que apresenta grande potencial de expansão, no entanto, na prática, a produção está concentrada nas zonas costeiras do estado de Santa Catarina (OSTRENSKY, 2008; JACOMEL e CAMPOS, 2014).

No Brasil, o cultivo de ostras e mexilhões é a fração mais importante da malacocultura, sendo mais desenvolvida nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Santa Catarina, que é o maior produtor nacional. A malacocultura em Santa Catarina surgiu no final da década de 80 sendo desenvolvida em quase toda a costa catarinense, responsável por aproximadamente 90% de toda a produção nacional (SANTOS et al. 2013).

A criação de moluscos bivalves no Brasil é representada principalmente pelo cultivo de ostras da espécie *Crassostrea gigas*, destacando-se devido à alta fecundidade, rápido crescimento e rentabilidade comercial, sendo de maior interesse econômico, em função do valor alimentício da carne e do uso da concha como matéria prima (AZEVEDO, 2011).

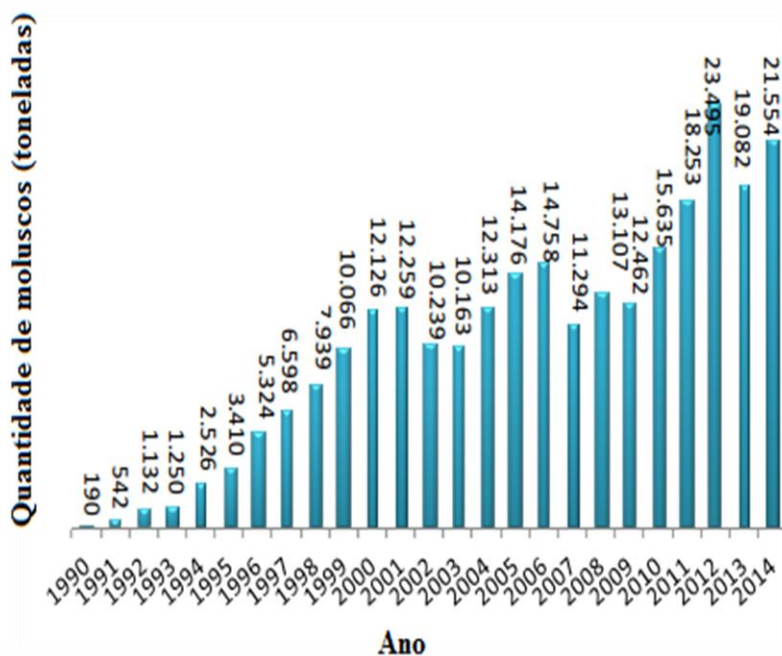
Em razão da existência de condições oceanográficas favoráveis, tais como inúmeras áreas protegidas, como baías, enseadas e estuários, ricas em fitoplâncton e temperaturas adequadas, contribuem para que o estado de Santa Catarina, como maior produtor nacional de moluscos bivalves (CONCEIÇÃO, 2002; ANACLETO, 2007; SANTOS et al., 2009). Esta atividade tem apresentado um crescimento bastante significativo, atualmente a sua produção é de aproximadamente 24 mil toneladas (SANTA CATARINA, 2013).

A Universidade Federal de Santa Catarina e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina são as precursoras da atividade, fornecendo tecnologia e assistência técnica aos produtores. O setor produtivo está organizado em associações, cooperativas e federação de empresas (SANTOS et al., 2009). Todo este cenário confere ao Estado uma posição de excelência nacional em cultivos de moluscos bivalves, além de deter mais de 90% da produção brasileira de ostras e mexilhões cultivados (BRASIL, 2013).

A produção de ostras e mexilhões em Santa Catarina concentra-se em uma faixa que engloba 12 municípios, que se estende desde São Francisco do Sul (norte do Estado) até Palhoça (região centro-leste). Entre estes municípios, destaca-se Florianópolis como o maior produtor de ostras de Santa Catarina e conseqüentemente, do Brasil (SANTOS et al., 2011).

A produção total de moluscos comercializados em 2014 por Santa Catarina (mexilhões, ostras e vieiras) foi de 21.553,6 toneladas, representando um aumento de 12,95% em relação a 2013 (Figura 1). Atuou diretamente na produção um contingente de 610 maricultores, representando um aumento de 3,56% em relação a 2013 (SANTA CATARINA, 2014).

Figura 1. Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina.



Fonte: SANTA CATARINA, 2014.

De acordo com a FAO, os moluscos ocupam o segundo lugar na produção da aquicultura mundial, representando 27% do total e ficando atrás somente do pescado de água doce, que ainda representa a maior parte da produção (54%). Cabe destacar que a maior parte dessa produção é proveniente da cultura de ostras, particularmente *C. gigas* (OLIVEIRA, 2011).

O cultivo de ostras no Brasil iniciou-se em 1971 em Salvador pela Universidade da Bahia. Já em 1974 foi introduzida no Brasil a espécie *C. gigas*, atualmente a principal espécie cultivada de ostra (OLIVEIRA et al., 2006). Em 1987, os primeiros exemplares foram trazidos de Cabo Frio para Santa Catarina e com eles iniciou-se um cultivo experimental. (POLI et al., 2004)

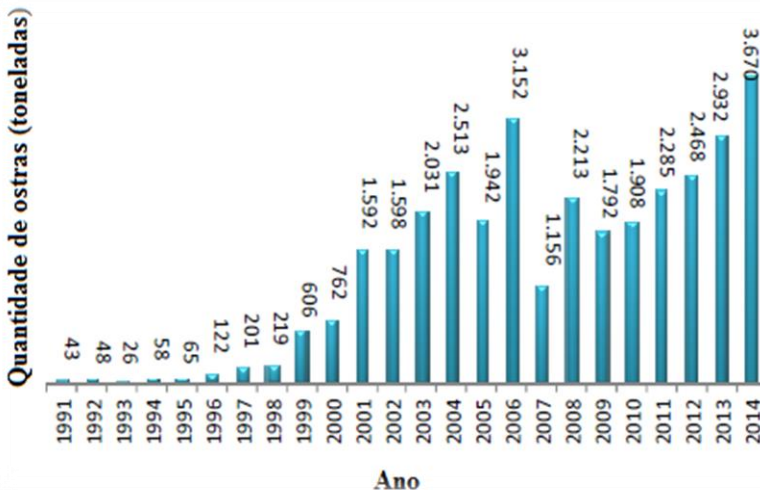
O Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que fica localizado na Barra da

Lagoa, em Florianópolis, desempenhou um papel crucial e identificou o potencial das águas marinhas de Florianópolis para o cultivo da ostra (*C. gigas*) e posteriormente, iniciou e expandiu a produção em laboratório destas ostras, tornando-se o principal produtor de sementes do país (SOUZA FILHO, 2003).

Atualmente, os municípios que mais contribuíram para a produção total do estado de Santa Catarina foram Florianópolis, com uma produção de 2.707,46 toneladas, representando um aumento 33,17% em relação à safra 2013, seguido por Palhoça 576 toneladas e São José 180,5 toneladas. Considerando que todos esses municípios fazem parte da Grande Florianópolis e localizam-se dentro das Baías Norte e Sul, equivale dizer que essas Baías são responsáveis por 94,37 % da produção estadual de ostras cultivadas. A comunidade do Ribeirão da Ilha, no município de Florianópolis, destaca-se como a maior produtora de ostra, representando 83,4% da produção de Florianópolis e 61,48% da produção estadual (SANTA CATARINA, 2014).

A comercialização de ostras (*C. gigas*) na safra 2014 foi de 3.670,36 toneladas. Esta produção é o recorde estadual, representando um aumento de 25,17% em relação à safra 2013 (Figura 2).

Figura 2. Evolução da produção de ostras comercializados em Santa Catarina.



Fonte: SANTA CATARINA, 2014.

A produção desta espécie exótica em águas catarinenses trouxe uma nova alternativa de renda aos pescadores artesanais, além de desenvolver forte consciência ecológica em relação a proteção das águas marinhas da qual depende a qualidade do produto (POLI, 2004).

2.2 Caracterização da ostra *Crassostrea gigas*

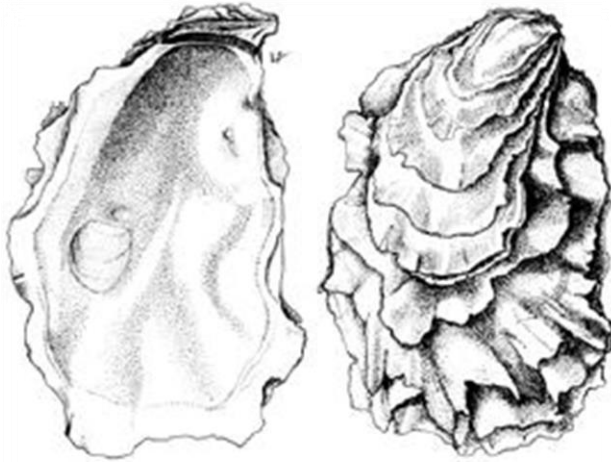
A espécie *Crassostrea gigas* conhecida como Ostra do Pacífico ou Japonesa pertence ao Filo MOLLUSCA, Classe PELECYPODA ou BIVALVIA, Família OSTREIDAE, Gênero *Crassostrea* (BARNES, 1990).

A ostra (*C. gigas*, THUNBERG, 1793) é a principal espécie produzida em sistemas aquícolas ao redor do mundo devido ao seu potencial de crescimento rápido e a sua ampla tolerância a diferentes condições ambientais (FAO, 2010).

Originária do leste da Ásia, especificamente China e Coreia, além de ser endêmica no Japão, atualmente a espécie *C. gigas* apresenta-se distribuída mundialmente, podendo ser encontrada da América do Norte (EUA e Canadá) à América do Sul (Brasil, Chile e Argentina), na Europa (desde a Noruega até Portugal e em países mediterrâneos) (AREIAS, 2012; FAO, 2014). Seu habitat natural inclui zonas costeiras protegidas e estuarinas, podendo também ser encontrada em regiões de mar aberto (FAO, 2014).

As ostras possuem uma estrutura física composta por um corpo macio, não possuem esqueleto interno, a valva superior ou direita é plana e a valva inferior ou esquerda que é levemente côncava, encaixada sob a articulação, sendo a valva pela qual a ostra encontra-se fixada ao substrato (Figura 3). O músculo adutor une as duas valvas sendo o responsável pelo fechamento das mesmas, atuando contra a pressão do ligamento e quando está relaxado, as valvas encontram-se abertas (RUPP, 1999; FREITAS, 2001).

Figura 3. Ostra (*Crassostrea gigas*)



Fonte: FAO, 2005.

A ostras, possui um sistema digestivo completo e um sistema nervoso formado por um gânglio cefálico e outro visceral, além de cordões nervosos ventrais. O sistema circulatório é aberto, com o coração constituído por um ventrículo e duas aurículas, veias, artérias e hemolínfa (MIOSSEC et al., 2009).

Assim como as demais espécies de moluscos bivalves, as ostras são organismos filtradores e alimentam-se de partículas em suspensão na coluna de água, que tanto podem ser orgânicas como inorgânicas, incluindo fitoplâncton, mas também podem conter micro-organismos e outras substâncias dissolvidas (DUPUY et al., 2000; FAO, 2004; MIZUTA, 2010). Sendo que, as bactérias patogênicas, que estejam eventualmente presentes na água de cultivo, após serem filtradas, poderão permanecer viáveis no trato digestivo das ostras (MORAES et al., 2000).

Os cílios branquiais produzem uma corrente de água até o interior do animal, enviando as partículas em suspensão até os filamentos branquiais, onde são retidas e levadas por batimentos ciliares até os palpos labiais, onde ocorre uma seleção, tanto química quanto por tamanho (FURLAN, 2004; RUPP, 1999). As partículas filtradas são

menores que 50 μm e, principalmente, em torno de 1 a 10 μm (MIOSSEC et al., 2009).

O ciclo de vida natural de uma ostra compreende várias fases, ostras adultas (machos e fêmeas) liberam seus gametas na água e dessa fecundação nasce uma larva que nada livremente até atingir o estágio de pedivéliger, no qual se forma um pé através do qual a larva irá se fixar ao substrato (VALENTE, 2012). Ostras adultas são hermafroditas, maturando normalmente primeiro como machos, podendo alternar de sexo durante seu ciclo de vida. Em zonas com boa disponibilidade de alimentos, as fêmeas dominam a população (FAO, 2011).

Os sistemas de cultivo de ostras podem ser de fundo ou suspensos, sendo que os cultivos suspensos podem ser fixos (mesa) ou flutuantes (espinhel ou *longline* e balsa). Estes são escolhidos conforme as condições do local, considerando a profundidade, ação das correntes, ondas e ventos (RAMOS, 2012; VALENTE, 2012). No Brasil, três sistemas de cultivo são possíveis: o cultivo em balsa, em mesa ou do tipo *longline*, sendo o último o mais utilizado atualmente em diversos lugares e o mais recomendado para locais mais profundos e expostos, sujeitos à ação de ventos e correntes. (NEEMA, 2008).

A taxa de crescimento das espécies do gênero *Crassostrea* depende de diversos fatores, além da espécie, como a distribuição geográfica, o clima, a localização e as diferenças genéticas entre indivíduos (HELM e BOURNE, 2004). O tamanho comercial da espécie *C. gigas* é de 8 cm, que é atingido em cerca de 7 a 8 meses de cultivo no estado de Santa Catarina no Brasil, devido às condições encontradas no Estado, por outro lado na França, para a mesma espécie, o tempo necessário para alcançar o tamanho comercial é de aproximadamente dois anos (MIZUTA, 2010).

De acordo com Poli (2004), as ostras (*C. gigas*) têm limite de tolerância de salinidade e temperatura. A faixa de melhor desempenho é de salinidade de 18-32 ppm, podendo seu cultivo ser realizado em salinidade inferior ou superior, porém seu crescimento é mais lento. Os limites de salinidade e temperatura variam muito, dependendo da variedade e localização geográfica que se encontram. Em alguns locais a salinidade pode variar entre 2-25 ppm entre o verão e inverno, ostras jovens e adultas podem sobreviver durante semanas em ambientes com baixa salinidade, fechando suas valvas, assim como pode tolerar

salinidades elevadas de até 45-50 ppm, como ocorre em cultivos na França, sendo que a mortalidade é observada em salinidades acima de 50 ppm (MIOSSEC et al., 2009).

2.3 Aspectos gerais da microbiologia de moluscos bivalves

O estado microbiológico de ostras após a coleta está diretamente relacionado à qualidade microbiológica da água, que é influenciada também pela temperatura e salinidade da água, distância entre o local de cultivo e áreas poluídas com material fecal ou à ocorrência de bactérias naturalmente presentes na água (FELDHUSEN, 2000). Além dos patogênicos, podem ser encontrados nos moluscos bivalves micro-organismos deteriorantes, que provocam alterações sensoriais, diminuindo a vida útil do produto. A grande quantidade de carboidratos em ostras cerca de 5,6%, é o que diferencia a sua deterioração de peixes, camarões e lulas. (JAY, 2005).

A contaminação desses alimentos também pode ocorrer na etapa de processamento, caso não sejam implementadas práticas adequadas de higiene no seu manuseio e armazenamento (FARIAS et al., 2010). Assim como, o descuido com o tempo e a temperatura durante as etapas de colheita e armazenamento (IWAMOTO et al., 2010).

Segundo Feldhusen (2000), as bactérias patogênicas associada a doenças causadas devido ao consumo de moluscos bivalves e outros produtos marinhos são divididas em três grupos, conforme a fonte de contaminação:

a) Bactérias que ocorrem naturalmente no ecossistema aquático: *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*

b) Bactérias presentes nesse ambiente como resultado da contaminação fecal humana e de animais de sangue quente: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patogênica, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp.

c) Bactérias que chegam nestes produtos durante a manipulação e o processamento: *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* (como *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli*) ocorrem em alimentos de origem marinha como resultado de contaminação causada pela atividade do homem ou dos animais. Esta contaminação tem sido normalmente associada à contaminação fecal ou à poluição das águas naturais ou de ambientes aquáticos, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período, ou à contaminação direta dos produtos durante o processamento (HUSS, 1997).

A concentração de micro-organismos nos moluscos filtradores varia de um animal para outro e depende também das condições meteorológicas, da temperatura, da matéria total particulada (turbidez) e da fisiologia alimentar do molusco (HUSS, 1997). As bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como os coliformes a 45°C e a *Escherichia coli* têm sido utilizadas como indicadores da qualidade sanitária das águas onde os moluscos são cultivados e dos próprios moluscos bivalves (BARARDI et al., 2006).

O Ministério da Saúde através da Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que aprova o regulamento técnico e princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, estabelece para moluscos bivalves *in natura* limites máximos permitidos de Estafilococos coagulase positivo de até $1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ e ausência de *Salmonella* sp. em 25g. O limite para coliformes a 45°C somente é estabelecido para moluscos bivalves, temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados, sendo este de $5,0 \times 10$ NMP.g⁻¹, não existindo nesta legislação, limites estabelecidos para *V. parahaemolyticus* em moluscos bivalves *in natura*. Há apenas limites de *V. parahaemolyticus* em pratos prontos à base de frutos do mar crus, que é $1,0 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ (BRASIL, 2001).

O Brasil permaneceu muito tempo sem a implantação de um programa específico para o monitoramento sanitário de moluscos. Por isso, considerando a necessidade de estabelecer requisitos de inspeção industrial e sanitária dos estabelecimentos de processamento de moluscos bivalves, como medida de prevenção de efeitos nocivos à saúde do consumidor, e com a finalidade de garantir padrões mínimos de qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em maio de 2012, instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). O PNCMB

abrange as etapas de retirada, trânsito, processamento e transporte de moluscos bivalves destinados ao consumo humano. É importante destacar que, para a definição de retirada de moluscos bivalves, a Instrução Normativa nº7 considera apenas limite de número mais provável (NMP) para a bactéria *Escherichia coli* em 100 gramas da parte comestível dos moluscos bivalves como um dos critérios para retirada liberada de moluscos bivalves das áreas de cultivo, sendo este limite $< 230 \text{ NMP } 100 \text{ g}^{-1}$. Outras bactérias patogênicas, como por exemplo, *Vibrio parahaemolyticus*, não são abordadas, nesta legislação.

Estudo realizado por Ramos (2007), avaliando a qualidade bacteriológica de águas de cultivo e ostras (*C. gigas*) cultivadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina observou a presença de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, observada na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, especialmente nos meses de verão.

Embora não sejam estabelecidos parâmetros de contagens para nenhuma espécie de *Vibrio* em moluscos bivalves *in natura*, os padrões microbiológicos existentes para outros micro-organismos consideram que estes moluscos *in natura* não sejam consumidos crus, o que deve ser reavaliado pelas autoridades da Vigilância Sanitária, visto que embora seja microbiologicamente mais seguro não consumi-los crus, este é o principal modo de consumo em várias regiões, e deve ser considerado para que os limites microbiológicos estabelecidos estejam adequados às características do alimento que chega à mesa do consumidor (RAMOS, 2007).

As ostras, bem como os demais moluscos, apresentam um tempo de vida de prateleira curto e variável em função de suas características intrínsecas (CORDEIROS et al., 2007). A alta atividade de água, o pH neutro e pelo fato de frequentemente abrigarem bactérias psicrotólicas, com habilidade de multiplicação em ambiente refrigerado. Devido a isto, há ainda a presença de enzimas autolíticas, responsáveis pelo surgimento de odores e sabores desagradáveis no produto, contribuindo para sua rápida deterioração (CODEX ALIMENTARIUS, 2004).

2.4 *Vibrio* spp.

O gênero *Vibrio* pertence à família *Vibrionaceae*, onde estão agrupadas bactérias patogênicas para o homem, causando desde

gastroenterites auto limitantes até quadros graves de septicemia, podendo levar o paciente a óbito (DECHET, 2008). São micro-organismos habitantes naturais de ambientes aquáticos, de clima tropical e temperado, presentes em água salgada, salobra e doce, podendo estar presentes em moluscos bivalves e outros crustáceos (GIBOTTI et al., 2000; BUT et al., 2004; WHO, 2005).

As espécies que constituem o gênero *Vibrio* são bacilos Gram-negativos, curvos ou retos, não formadores de esporos, mesófilos, que medem entre 0,5 – 1,0 µm de largura e entre 1,4 – 3,0 µm de comprimento, são anaeróbicas facultativas e não esporulados (MCLAUGHLIN, 1995; THOMPSON e SWINGS 2006). A maioria das espécies patogênicas é móvel possuindo flagelo único e polar, fermentam glicose sem produção de gás e são catalase positivos. (KONEMAN et al. 2008). São principalmente mesófilas, as espécies patogênicas, isto é, ocorrem, em geral, em águas tropicais e em número mais elevado em águas temperadas nos finais do verão ou princípios do outono (HUSS, 1997).

O gênero *Vibrio* inclui mais de 30 espécies, das quais ao menos 14 são reconhecidas patogênicas para o homem (IWAMOTO, 2010). Entre estas espécies têm sido associadas a doenças transmitidas por alimentos, *Vibrio cholerae*, sorogrupos O1 e O139, são os mais importantes, uma vez que são associados com surtos de epidemias e pandemias de diarreia em várias partes do mundo (PRUZZO et al., 2005; DALMASSO et al., 2009).

Os micro-organismos patogênicos possuem capacidade adaptativa, o que permite sua sobrevivência no organismo hospedeiro e assim são capazes de provocar infecções. A expressão dos fatores de resistência e virulência é regulada por determinadas condições, como ambiente que a bactéria se encontra (MAYER, 2010).

O gênero *Vibrio* apresenta versatilidade de estratégia de patogenicidade, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência e multiplicação em uma diversidade de ambientes. O repertório genético desta bactéria para adaptação a mudanças e ambientes hostis, foi demonstrado pelo surgimento de cepas que manifestam mecanismos de resistência aos antimicrobianos (THOMPSON et al., 2004).

Em moluscos bivalves diferentes espécies de *Vibrio* têm sido isolado correspondendo a 75% das doenças transmitidas pelo consumo

de alimentos de origem marinha. Gastroenterites e infecções de pele têm sido associadas, e o número de casos têm aumentado nos últimos anos (TEPLITSKI et al., 2009) Estes patógenos permanecem viáveis e cultiváveis, na água, mesmo na ausência de matéria orgânica (PRUZZO et al., 2005).

Duas espécies em particular são importantes patógenos humanos transmitidos pelo consumo de alimentos de origem marinha, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (LISTON, 1990; YEUNG e BOOR, 2004; OLIVER, 2005; DRAKE et al., 2007). A concentração tanto de *V. parahaemolyticus* quanto de *V. vulnificus* em ostras está diretamente relacionada à temperatura da água, quando a temperatura da água está acima de 20°C observa-se em maiores concentrações e raramente isolados quando a temperatura das águas está abaixo de 15 °C. (PRUZZO et al., 2005; SU e LIU, 2007).

Estudo realizado por Ramos et al. (2014), observou a presença de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras de águas de cultivos provenientes da Baía Sul de Florianópolis no Estado de Santa Catarina e constatou que, as maiores densidades encontradas para as diferentes espécies foram nos meses de verão, quando a temperatura da água apresentou média de 24°C.

2.4.1 *Vibrio cholerae*

O *V. cholerae* é classificado com base nos antígenos somáticos (antígeno O) dentro de sorogrupos (BAUMMAN et al., 1984). Esta espécie é constituída de 206 sorogrupos, sendo que destes, somente dois sorogrupos, O1 e O139, são os causadores da cólera epidêmica. O *V. cholerae* não O1/não O139 estão amplamente distribuídos no ambiente aquático e podem causar surtos de diarreia. (VARNAM e EVANS, 1991; RIVERA et al. 2001). É importante o monitoramento da presença de *V. cholerae*, independente do sorotipo ou sorogrupo, patogenicidade, ou virulência devido à descoberta da transferência lateral de genes que pode realmente ocorrer no ambiente aquático (CHAKRABORTY et al., 2000).

O reservatório comprovado da cólera é o homem, no entanto, a presença desse micro-organismo no habitat aquático e sua associação à quitina, zooplânctons e peixes, podem favorecer a contaminação dos moluscos bivalves durante o processo de filtração (CALIXTO, 2010).

A dose infectante da bactéria necessária para causar as manifestações clínicas varia de acordo com a via, se ingerida com água, a dose infecciosa é de 10^3 a 10^6 células e quando ingerida com alimentos 10^2 a 10^6 células são necessários (HANDA, 2007).

2.4.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, e que se apresenta na forma de bastonete, apresenta um único flagelo polar e é móvel quando cultivado em meio líquido. Seu crescimento ocorre em temperaturas de 10 e 48°C, sendo que a temperatura ótima de 35-37°C, o melhor pH para seu crescimento é o pH alcalino que varia entre 7,5 e 8,5. Apresenta halofilismo restrito, exigindo um mínimo de 1% de NaCl e concentração favorável de para o desenvolvimento de *V. parahaemolyticus* é de 2 a 4% sendo 8% a concentração máxima tolerada (VIEIRA, 2004; ZAMORA-PANTOJA et al., 2013).

Ocorre naturalmente em águas oceânicas e costeiras, na maioria das áreas, *V. parahaemolyticus* é mais numeroso no ambiente durante os meses mais quentes, assim a maioria dos surtos ocorre nesse período. Os sintomas mais comuns de doença provocada por *V. parahaemolyticus* são: diarreia, dores abdominais, náusea, vômito e enxaqueca, febre e calafrios pouco frequentes. O período de incubação varia de 4 a 96 horas, e em média 12 horas, os sintomas podem persistir por 2 a 10 dias (SENAI, 2000; BATES et al., 2004).

A dose infectante mínima de aproximadamente 10^5 UFC (JAY, 2005; CHOI et al., 2009). Os sintomas geralmente são autolimitados e desaparecem após um período de uma semana ou menos, e não é necessário o tratamento com antibióticos. A doença tem sido associada ao consumo de ostras, caranguejos, camarão, lagosta e peixe crus. No entanto, a contaminação cruzada pode propiciar que outros alimentos se tornem veículos (SENAI, 2000; BATES et al., 2004; JAY, 2005).

2.4.3 *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus é um bacilo halofílico, móvel em meio líquido devido a um único flagelo polar, Gram-negativo, não formadora de esporos e capaz de causar uma infecção muito grave em indivíduos suscetíveis. Os sintomas da doença podem variar desde uma

gastroenterite até uma septicemia primária e fasiaíte necrosante, com uma taxa de mortalidade superior a 50% nos casos de septicemia. A infecção resulta do consumo ou manipulação de frutos do mar contaminados, mais frequentemente ostras, ou pela exposição de ferimentos ou lesões de pele à água do mar contaminada (IGBINOSA e OKOH, 2008; HORSEMAN e SURANI, 2011).

Os sintomas gastrointestinais são leves a moderados, auto limitantes e podem ocorrer mesmo em consumidores sem os fatores de predisposição. A septicemia severa tem sido descrita como a apresentação mais comum das doenças causadas por *Vibrio vulnificus*, ou ainda como secundária à infecção da pele (HORSEMAN e SURANI, 2011).

O rápido aparecimento dos sintomas (uma a sete horas após o consumo de ostras cruas) e a evolução da infecção indicam que *V. vulnificus* é capaz de driblar rapidamente a resposta imune em organismos infectados. A primeira barreira encontrada pela bactéria é a acidez estomacal e a estratégia adotada por *V. vulnificus* parece ser a mesma adotada por outras bactérias Gram negativas, que neutralizam o baixo pH quebrando aminoácidos em aminas e CO₂ (JONES e OLIVER, 2009).

Uma das diferenças entre a infecção pela pele a septicemia primária é a porta de infecção. A infecção pela pele pode resultar da entrada da bactéria por lesões pré-existentes, que pode ser simplesmente caminhar em águas contaminadas ou ainda pela inoculação por lesões traumáticas que ocorrem geralmente durante a manipulação de pescados, mariscos e instrumentos contaminados (facas, anzóis, etc. O período de incubação é de 7 dias, podendo chegar a 12 (HORSEMAN e SURANI, 2011).

A bactéria pode ser encontrada em ambientes marinhos costeiros ou estuários onde a temperatura varia entre 9 a 31°C, sendo que a temperatura ótima é de 18°C e salinidade entre 15 a 25 ppm. A salinidade acima de 30 ppm reduz a incidência de *V. vulnificus* independentemente da temperatura da água (HORSEMAN e SURANI, 2011).

2.5 Métodos de detecção no controle de microbiologia de alimentos

Para o controle microbiológico de alimentos são aplicadas diversas técnicas. No entanto, as mais empregadas são as técnicas microbiológicas convencionais, reconhecidas mundialmente como métodos padrão de detecção de patógenos em alimentos. Tais métodos, em teoria, são capazes de identificar células viáveis em amostras de alimentos seguindo os estágios de pré- enriquecimento e enriquecimento seletivo (RUCKERT, 2006; GE e MENG, 2009).

Os métodos convencionais recebem essa denominação porque foram desenvolvidos há muitos anos e desde então vem sendo empregados como métodos oficiais na maioria dos laboratórios de microbiologia de alimentos. Esses métodos estão descritos em publicações consideradas de referência, internacionalmente aceitos e recomendados pela *American Public Health Association* (APHA), pelo *International Commission on Microbiological Specification for Foods* (ICMSF) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) (GOLDBECK, 2008).

De maneira geral, os métodos convencionais de microbiologia de alimentos tem como base a microbiologia clássica que se fundamenta, por exemplo, para detecção de uma determinada bactéria em pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento do micro-organismo alvo em meio de cultura apropriado e na confirmação por meio de testes sorológicos, bioquímicos e morfológicos (GANDRA et al., 2008; BENETTI, 2009; LI et al., 2009; FDA, 2012). Na microbiologia clássica, para se atingir as devidas competências e corretas interpretações são necessários muito treino, experiência e conhecimentos prévios em microbiologia (ALTEKRUSE et al., 1998).

As propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e, quando expressas, ainda existe a dificuldade de interpretação dos resultados e classificação. A confirmação de positivos pelos métodos convencionais exige entre 4 e 5 dias, ou até 7 dias se forem necessárias confirmações sorológicas (MALORNY et al., 2003; GANGRA et al., 2008). Assim, a inovação em métodos microbiológicos qualitativos é requerida a fim de reduzir ou eliminar os inconvenientes dos métodos convencionais (TANG et al., 2009; IPARDES, 2011).

Os resultados dos testes bioquímicos podem conduzir o analista a erros, pois sofrem variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, o que acarreta resultados distintos. Outras características relevantes são o baixo poder discriminatório em micro-organismos com baixa variabilidade genética e o limitado número de testes devido aos custos dos mesmos (GANDRA et al., 2008).

O tempo gasto para a obtenção dos resultados é uma desvantagem muito discutida, pois determinadas análises demandam de vários dias para a obtenção de resultados conclusivos. Apesar dos progressos na formulação de meios de cultura seletivos a detecção continua demorada e trabalhosa (GE e MENG, 2009).

É importante destacar que diversas bactérias patogênicas em condições adversas podem sofrer injúria, o que pode inibir a multiplicação nos meios de cultura empregados. As células viáveis não cultiváveis (VNC), representam um perigo à saúde pública, visto que, podem estar presentes e alimentos podem ser liberados pela não detecção de patógeno (FORSYTHE, 2002; MAZIERO, 2007).

Especialmente na indústria de alimentos são necessários métodos mais rápidos para fornecer informações adequadas da possível presença de patógenos em matérias-primas e produtos finais possibilitando a intervenção no controle do processo de fabricação e para o monitoramento. Esses métodos rápidos detectam e enumeram os micro-organismos com prematuridade, e possibilitam a sua caracterização e isolamento para uso microbiológico, químico, imunológico, sorológico e molecular (DE SÁ, 2012).

Desse modo, métodos rápidos alternativos estão sendo desenvolvidos e empregados como potenciais substitutos aos métodos clássicos ou como complementares a estes, entre os métodos alternativos destacam-se os métodos fundamentados em técnicas de biologia molecular, sendo a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) a técnica mais explorada (FORSYTHE, 2002; TANG et al., 2009; ANDRADE et al., 2010;).

Pode-se perceber que os avanços em biotecnologia têm alavancado as técnicas de detecção de micro-organismos e influenciado o desenvolvimento de técnicas cada vez mais rápidas, automatizadas e sofisticadas. Entretanto, métodos rápidos são geralmente utilizados

como técnicas de triagem, ou seja, resultados positivos requerem confirmação por método oficial (FDA, 2012).

A PCR já está presente no controle de qualidade de alimentos, em laboratórios e nas linhas de produção de alguns países. Entre eles, pode-se citar os Estados Unidos, que desenvolve e valida seus métodos moleculares para a triagem e identificação de patógenos para uso interno por meio das agências reguladoras, incluindo a *Food and Drug Administration* (FDA), disponibilizados no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) e no *Microbiology Laboratory Guidebook* (GE e MENG, 2009).

2.5.1 Método número mais provável (NMP)

Um dos métodos usados para a detecção e enumeração de *Vibrio* em moluscos bivalves e na água salgada é método do número mais provável (NMP) conforme descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) do *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA). Este método baseia-se na inoculação de diluições decimais de uma amostra em várias séries de tubos. Cada diluição (podendo conter microorganismos viáveis ou não) é inoculada em três ou cinco tubos de meio de enriquecimento. Os tubos são considerados positivos se apresentarem colônias características em Agar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (TCBS), devidamente confirmadas com testes bioquímicos, ou imunológicos (FDA, 2004).

Apesar de ser muito útil, este método é muito laborioso e requer grandes quantidades de tubos com meio de enriquecimento e placas de ágar. Além disso, muitas vezes é difícil distinguir as colônias de *V. parahaemolyticus* de algumas colônias de *V. vulnificus* ou *V. mimicus* em TCBS, uma vez que estas formam colônias idênticas (colônias verdes ou verde-azuladas, com 2 a 3 mm de diâmetro) (SU e LIU, 2007).

Para facilitar a identificação dos isolados suspeitos, vários kits comerciais de testes bioquímicos, como Api 20E[®] e Api NE[®] (bioMérieux), RapID[™] System NF PLUS (Remel Inc.), e BBL[™] Crystal[™] Enteric Nonfermenter kit (Becton, Dickinson and Company), estão disponíveis para a rápida identificação de membros da família *Enterobacteriaceae*.

Por fim, são usadas tabelas de NMP para saber qual a concentração estimada para a combinação de tubos positivos

(devidamente confirmados) encontrada. Os valores de NMP são habitualmente calculados com base em três diluições decimais com 0,1g, 0,01g e 0,001g de inóculo, distribuídas em séries de três ou cinco tubos. Estes resultados apenas fornecem uma estimativa da concentração inicial de bactérias presentes na amostra, mas não fornecem uma contagem direta das mesmas. Este método é particularmente útil para baixas concentrações de micro-organismos (<100/g), mas apenas permite quantificar organismos viáveis (FDA, 2006).

2.5.2 Metodologia ISO/TS 21872

Outra metodologia disponível é a descrita pela Organização Internacional de Normalização (ISO), a ISO/TS 21872: 2007. A metodologia é dividida em duas partes:

Parte 1: Detecção de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*.

Parte 2: Detecção de outra espécies incluindo o *Vibrio vulnificus*.

A metodologia descrita na norma possui 4 etapas: duas fases de enriquecimento em solução salina alcalina peptonada, a fim de detectar os organismos alvos, pois podem estar presentes em pequenas quantidades e muitas vezes são acompanhados por um número maior de outros micro-organismos que pertencem à família *Vibrionaceae* ou outra família de micro-organismos. A fase de isolamento e identificação em dois meios seletivos de cultura (Agar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose - TCBS + outro meio seletivo).

A sua identificação preliminar é estabelecida com base na aparência da colônia em ágar TCBS. As colônias de *V. cholerae* são lisas e amarelas, as colônias de *V. parahaemolyticus* aparecem em azul, e/ou verde e as colônias de *V. vulnificus* são verdes (RIVER, 2010).

As colônias positivas em TCBS devem ser inoculadas em um dos três meios de acordo com a espécie de *Vibrio* sp.: Agar colistina polimixina β -celobiose (CPC), ou Agar sódio dodecil sulfato polimixina B sucrose (SDS) ou ainda o colistina polimixina β -celobiose modificado (CPCm). A norma sugere ainda a coloração Gram e o teste de motilidade em solução salina.

A identificação bioquímica, conforme previsto nas metodologias BAM (FDA, 2004) e ISO (ISO, 2007) pode ser feita através kits comerciais como Api 20E® ou pelo uso de meios e soluções específicas para comprovação de características fenotípicas próprias de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Entretanto, o uso destes meios e soluções não é prático quando existe um número muito grande de amostras, sendo neste caso mais recomendado o uso de sistemas como o já citado API 20E®, sendo mais fáceis de usar e mais rápidos, requerendo no máximo 24h para finalizar as análises.

A identificação bioquímica através de kits, são baseados na avaliação da capacidade dos micro-organismos de utilizarem determinados substratos ou de produzirem determinados metabólitos, onde os testes são executados com pequenos volumes de meio de cultura, os quais se encontram na forma desidratada ou liofilizada, e são reidratados pela adição de pequeno volume da amostra a ser testada. Após a incubação faz-se a leitura dos resultados, normalmente através de uma combinação de números obtida de acordo com o resultado de cada um dos testes que faz parte do sistema. Cada combinação de números corresponde a um micro-organismo diferente (MACHADO, 2007).

2.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), foi idealizada por Kary Mullis e Randall Saiki na década de 1980, e a partir desta data houve uma revolução na genética molecular devido à nova abordagem que proporcionou para o estudo dos genes (LOEFFELHOLZ e DENG; RUCKERT, 2006).

A primeira etapa na identificação de micro-organismos baseado em DNA é o isolamento de DNA genômico. O isolamento de DNA a partir de matrizes alimentares para utilização em PCR é dificultada pelo fato de muitos ingredientes em alimentos poderem atuar como inibidores de PCR. A qualidade do DNA também pode ser reduzida por muitas das condições comuns a processamentos de alimentos, tais como o baixo pH, altas temperaturas, alta pressão, e hidrólise (CHAPELA et al., 2007; KESMEN et al., 2009; BOTTERO & DALMASSO 2011).

Existem inúmeros métodos de extração de DNA, manuais e automatizados, com uso de kits comerciais e do método, os passos

básicos para extração do DNA de uma amostra consiste em lise celular, ligação, lavagem e eluição final (CHAPELA et al., 2007).

Após a quantificação e pureza, o DNA extraído é adicionado a uma mistura (também conhecida como pré-mix) que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com três fosfato, os primers também chamados de oligonucleotídeos (ou iniciadores) e a enzima DNA polimerase em uma solução tampão. Toda esta mistura é colocada no termociclador, o qual faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado) (GOLDBECK, 2008).

A PCR é uma técnica da biologia molecular, que permite produzir um grande número de cópias da sequência específica de DNA alvo através de uma reação enzimática, sendo necessário conhecer apenas a estrutura da região a ser amplificada e não o DNA completo. A sequência de DNA altamente específica fornece informações biológicas em todos os níveis taxonômicos, sendo ideal para a detecção específica de micro-organismos (LI et al., 2009; RUCKERT, 2006;).

Possui como princípio a capacidade da enzima polimerase (Taq DNA polimerase) replicar sequências de DNA, a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita réplica, denominados oligonucleotídeos, iniciadores ou primers. As variações de temperatura promovem a desnaturação, a hibridização e a extensão do DNA de organismos ou células, por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura em termociclador (LAZCKA et al., 2007). O método de reação em cadeia da polimerase é capaz de fornecer resultados rápidos e sensíveis para a detecção de patógenos em alimentos (PAGADALA et al., 2011).

Os métodos baseados em PCR servem não só para detectar micro-organismos contaminantes e patogênicos, mas também para evitar perdas econômicas devido a falsos positivos. Além disso, testes com base em meios de cultura seletivos, muitas vezes não conseguem detectar certas cepas dentro da população-alvo, resultando na subestimação dos números (JUSTÉ et al., 2008). No entanto, os tempos de enriquecimento para PCR são mais curtos do que com outros métodos, devido à maior sensibilidade da técnica (MARTÍN et al., 2010).

2.5.4 PCR em tempo real

PCR em tempo real é um método que permite a detecção e quantificação dos produtos gerados a cada ciclo de amplificação. Este método requer equipamentos específicos para a leitura a cada ciclo (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012). A precisão é influenciada pelo desenho do primer, pela qualidade do DNA, presença de inibidores da reação (EDWARDS & LOGAN, 2009), manuseio e armazenamento de amostras, *primers*, sondas e enzimas (DIONISI et al., 2003).

O *SYBR® Green* é um corante, que se liga a dupla fita de DNA e com a excitação de luz emitida por um sistema ótico, emite fluorescência verde. Sua utilização pode ter vantagens devido ao baixo custo, tornando desnecessário o uso de sondas o que permite diminuir o custo das análises (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; SWAMINATHAN, 2007a). A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo (BOTTERO & DALMASSO 2011; CHUANG et al., 2012).

Esse problema pode ser evitado com uma otimização cuidadosa da PCR para reduzir a formação de dímeros de *primers*. A avaliação de curvas de fusão também pode auxiliar na determinação específica do produto desejado. A temperatura de fusão (*melting temperature*- T_m) é a temperatura na qual 50% das moléculas de DNA estão como fita simples e 50% estão ligadas às sequências complementares (RASMUSSEN, 2006).

A PCR em tempo real também pode ser realizada utilizando a sonda *TaqMan®*, esse sistema utiliza outra forma de gerar a fluorescência. E o uso de uma sonda fluorescente, dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar e, seu uso acrescenta um nível adicional de especificidade para a reação de amplificação (DE SÁ, 2012).

Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase (HOLLAND et al., 1991; KESMEN et al., 2009). À medida que vai ocorrendo à amplificação, a Taq DNA polimerase, pela sua atividade exonucleásica, desloca-se para a extremidade 5' da sonda *TaqMan®*

contendo o fluoróforo (*reporter*) e cliva a sonda. Pelo fato do *reporter* ser liberado e não permanecer próximo ao *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor), há liberação de fluorescência (MORTARINO et al., 2004; YANG e ROTHMAN, 2004).

A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência, assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (GALIMBERTI et al., 2013). O resultado da análise é apresentado como *Cycle Treshold* (CT), que significa o primeiro ciclo de amplificação no qual há aumento significativo de fluorescência e será proporcional ao número de cópias inicial de DNA (JOTHIKUMAR; GRIFFITHS; WANG, 2003; SWAMINATHAN, 2007a; LOGAN et al., 2009).

Com amostras de alimentos, a atenção especial deve ser dada à possível presença de inibidores, e à eficiência de extração de DNA. Um conhecimento microbiológico profundo do alimento em questão, incluindo a sua microbiota habitual e potenciais contaminantes, são também pré-requisitos. Uma vez decidido qual micro-organismo será detectado, os genes-alvo e um par de primer específico para reconhecê-lo, deve ser selecionado e desenhado. A seleção do gene-alvo é de grande importância, um gene altamente conservado entre espécies diferentes podem ser usado como estratégia para uma ampla base de detecção, entretanto, se a sequência de DNA usada for única para uma determinada espécie, fornecerá um teste altamente específico (HANNA; CONNOR; WANG, 2005). Sondas, *primers* e as condições de PCR deve ser otimizados, não apenas para um baixo limite de detecção (sensibilidade), mas também para uma alta eficiência da reação. A concentração ideal de cada um dos oligonucleotídeos usados no ensaio também deve ser otimizada. A quantidade de DNA polimerase acrescentada também é importante; pouca quantidade da enzima pode levar à amplificação ineficiente e uma perda de sensibilidade (EDWARDS e LOGAN, 2009).

As características da PCR em tempo real possibilitam a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do

produto amplificado. Desta forma, pode-se observar que as vantagens da PCR em tempo real em relação à PCR convencional e aos métodos tradicionais de análises de patógenos são inúmeras e incluem, rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa. (YANG e ROTHMAN, 2004; GAMMON et al., 2007).

Atualmente, vários sistemas de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado por empresas como Applied Biosystem, DuPont, Merck, Qiagen e Roche, permitindo a detecção de patógenos em diferentes matrizes alimentares.

3 REFERÊNCIAS

ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 7, p. 709- 725, 1998.

ANACLETO A.; PERIN, E. J.; SILVA, F. C.; DESCHRMAYER, S. R. O declínio da pesca artesanal e a ostreicultura como alternativa econômica sustentável. Congresso internacional de administração. Ponta Grossa-Paraná. 2007.

ANDRADE, R. B. et. al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

AREIAS, D. L. L. Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova da ostra *Crassostrea gigas* (Thundberg, 1795). Dissertação (Mestrado). Universidade do Porto, p.74, 2012.

AZEVEDO, R.V. Biofiltração e desenvolvimento da ostra *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) utilizando efluentes de tanque de sedimentação de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1811). 2011. 57p. Dissertação de mestrado (PósGraduação em Ciências Animal). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, 2011.

BARARDI, C.R.M.; SINCERO, T.C.M.; CORREA, A.A. Contaminação de moluscos bivalves por patógenos humanos. v. 45, 2006.

BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados. 4 ed. São Paulo: Livraria Roca, 1990. 1179 p.

BAUMANN, P.; FURNISS, A.L.; LEE, J.V. GENUS I. *Vibrio*. In: Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. & Holt J.G. (eds). Vol. 1, Baltimore, Williams & Wilkins, p. 518-538, 1984.

BEIRÃO, L.H.; TEIXEIRA, E.; BATISTA, C.R.V et al. Tecnologia pós-captura de pescados e derivados. In POLI, C.R.; BASSANESI, A.T.; ANDREATTA, E.R.; BELTRANE E, et al. Aquicultura: experiências brasileiras, Ed. Multitarefa. Florianópolis, Brasil, p. 407-440, 2004.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A.; Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, v. 190, p. 34-38, 2011.

BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K.E.; SANDERS, C.V.; Infections related to the ingestion of seafood. Part I. Viral and bacterial infections. *Lancet Infection Diseases*, v.4, n.4, p. 201-212, 2004.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura, Instrução Normativa Interministerial N°7 Diário Oficial da União, p. 55-59. Brasília, 8 de maio de 2012. Disponível on-line em <http://mpa.gov.br/index.php/aquicultura>.

BRASIL. RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. DOU, Brasília, 1 jan. 2001.

CALIXTO, F. A.A. Avaliação dos parâmetros bacteriológicos em Mexilhão, *Perna perna*, de mitilicultura da Baía de Ilha Grande RJ, submetidos a irradiação gama. Universidade Federal Fluminense, Mestrado em Medicina Veterinária, p. 98, 2010.

CHAPELA, M. J.; SOTELO, C. G.; PEREZ-MARTIN, R. I.; PARDO, M. A.; PEREZ-VILLAREAL, B.; GILARDI, P.; RIESE, J. Comparison

of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification, *Food Control*, v. 18, p. 1211-1215, 2007.

CHAKRABORTY, S.; MUKHOPADHYAY, A.K.; BHADRA, R.K.; GHOSH, A.N.; MITRA, R.; SHIMADA, T.; YAMASAKI, S.; FARUQUE, S.M.; TAKEDA, Y.; COLWELL, R.R.; NAIR, G.B. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4022-4028, 2000.

CODEX ALIMENTARIUS. Código de Práticas para Pescados e Produtos da Pesca, CAC/RCP 52-2003, v. 1, 2004.

CONCEIÇÃO, S. S. Serviços de informação para negócios: uma aplicação às comunidades pesqueiras de mitilicultura e ostreicultura em Santa Catarina. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 120, 2002.

CHUANG, P. S.; MENG-I.; CHENG; SHIAO, J. C.; Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique. *Food Chemistry*, v.133, p.1055-1061, 2012.

CORDEIRO, D.; LOPES, T.G.G; OETTERER, M.; PORTO, E.; GALVÃO, J.A. Qualidade do mexilhão *Perna perna* ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento. *Boletim do CEPPA*. Curitiba, v. 25, n. 1, p. 165-179, 2007.

DALMASSO, A.; CIVERA, T.; BOTTERO, M.T. Multiplex primer-extension assay for identification of six pathogenic vibrios. *International Journal of Food Microbiology*. v.129, p. 21-25, 2009.

DE SÁ, J.F. Caracterização microbiológica de doce de leite, leite condensado e queijo minas padrão por metodologia clássica e padronização de multiplex para detecção de patógenos por PCR em tempo real. Dissertação de Mestrado, 2012.

DIONISI, H. M.; HARMS, G.; LAYTON, A. C.; GREGORY, I. R.; PARKER, J.; HAWKINS, S. A.; ROBINSON, K. G.; SAYLER, G. S. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 6597 e 6604, 2003.

DRAKE, S.; DEPAOLA, A.; JAYKUS, L. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. v.6, p.120-144, 2007.

EDWARDS, K.; LOGAN, J. Performing real-time PCR. Current technology and applications. Norfolk. UK: Caister Academic Press, 2009.

FARIAS, M. F.; ROCHA-BARREIRA, C. A.; CARVALHO, F. C. T.; SILVA, C. M.; REIS, E. M. F.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. dos F. Condições microbiológicas de *Tagelus plebeius* (LIGHTFOOT, 1786) (Mollusca: Bivalvia: Solecurtidae) e da água no estuário do rio Ceará, em Fortaleza – CE. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v. 36, n. 2, p. 135-142, 2010.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne disease. *Microbes and Infections*, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FENG, P. Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next-generation technologies. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 3. ed. Washington: ASM Press, 2007. cap.43, p.911-934

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M.; SILVESTRI, F. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. *Infopesca Internacional*, v. 28, p. 34-41, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2014- Food security and climate change. A report by the High Level Panel of Experts on FOOD SECURITY AND NUTRITION OF THE COMMITTEE ON WORLD FOOD SECURITY, Rome 2012. Disponível em http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/hlpe/hlpe_documents/HLPE_Reports/HLPE-Report-3-Food_security_and_climate_change-June_2012.pdf. Acesso em 03 mar 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2012 - The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the

United Nations. 223p., Roma, Itália. ISBN 978-9251082751. Disponível [on-line] em <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, FAO. 2010. 197p. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf> Acesso em 20 jan, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Texto de HELM, M.M. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. FAO: Rome. Acessado em 23 fev 2014. Disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en HELM, M. M.; BOURNE, N. Hatchery culture of bivalves: A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471. Roma. 203p. 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Hatchery culture of bivalve molluscs. Fisheries Technical Report, Rome, n. 471, p. 177, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual (BAM).

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA JR., A. Chapter 9. *Vibrio*. May 2004. Disponível em

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>. Acesso em 02 mar, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Bad Bug Book (Second Edition). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook - Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), U.S. Department of Health and Human Services, 2012.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed, Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt, 2002.

FURLAN, E.F. Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e

microbiológicos. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 106, 2004.

GALIMBERTI, A.; DE MATTIA, F.; LOSA, A.; BRUNI, I.; FEDERICI, S.; CASIRAGHI, M.; MARTELLOS, S.; LABRA, M. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, v. 50, p. 55-63, 2013.

GAMMON, K. S.; LIVENS, S.; PAWLOWSKY, K.; RAWLING, S. J.; CHANDRA, S.; MIDDLETON, A. M. Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter* species in an electrolyte replacement drink. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, 262-267, 2007.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Sci. Technol. Maringá*, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005.

GE, B.; MENG, J. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: current applications and future directions. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, v. 14, p. 235-241, 2009.

GERMANO, P. M. L. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: Varela 2001.

GIBOTTO, A.; SARADAKIS, H.O.; PELAYO, J.S.; TAGLIARI, K.C.; FALCÃO, D.P. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-01, *Aeromonas spp.* and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). *Journal Applied Microbiology*, v.89, p. 70-75, 2000.

GOLDBECK, R. Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos Campinas, São Paulo, 2008.
HANDA, S. Cholerae. <http://emedicine.medscape.com/article/962643-overview#a0104>. Acesso em 25 jul, 2014

HANNA, S. E.; CONNOR, C. J.; WANG, H. H. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science*, v.70, p. 49-53, 2005.

HELM M. M.; BOURNE N. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper, Rome. Italy., p. 471, 2004.

HOLLAND P. M.; ABRAMSON R. D.; WATSON R.; GELFAND D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 88, p. 7276-7280, 1991.

HORSEMAN, M. A.; SURANI, S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 15, p. 157-166, 2011.

HUSS, H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. FAO. Documento Técnico sobre as Pescas. n. 334. Roma: FAO. p. 176, 1997.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Research in Microbiology*, v. 159, p. 495-506, 2008.

IPARDES. Workshop: identificação de gargalos tecnológicos na agroindústria paranaense, 2011.

IWAMOTO, M.; AYERS, T.; MAHON, B. E.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 2, p. 399-411, 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TS 21872-2:2007(E) - Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.- Parte 2 – Detecção de outras espécies além de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*. vol. 21872-2, First ed. 19.

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.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6^o edição. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 711, 2005.

JONES, M. K.; OLIVER, J.. *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 5, p. 1723-1733, 2009.

Jothikumar, N., Wang, X., & Griffiths, M.W. Real-time multiplex SYBR Green I based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, v. 66, p. 2141-2145, 2003.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P. H. J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25, p. 745-761, 2008.

KESMEN Z, GULLUCE A, SAHIN F, YETIM H . Identification of meat species by TaqMan based real-time PCR assay. *Meat Sci*, v. 82, p. 444- 449, 2009.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. *Diagnóstico microbiológico*: 6 edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAZCKA, O. et. al. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Food Control*, v. 22, issue 7, p. 1205-1217, 2007.

LISTON, J. Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technology*. v. 44, p. 56-62, 1990.

LOFFELHOZ, M., DENG, H. PCR and Its Variations. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Nashville: Springer US. p. 166-183, 2006.

MAURER, J., “PCR Methods in Foods”, Springer, USA, p. 42-48, 2006.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N. Real-time PCR: Current technology and applications (1. ed.). Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009.

LOURENÇO, J. I. R. Implementação da técnica de PCR em tempo real na detecção de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos. 2011 Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária de Santarém, Portugal, 2011.

LI, Y. et al. Determination of foodborne pathogenic bacteria by multiplex pcr microchip capillary electrophoresis with genetic algorithm-support vector regression optimization. *Analytica Chimica Acta*, v. 643, p. 100-107, 2009.

MACHADO, M. G. Métodos de análise microbiológica de alimentos. Apostila da disciplina de microbiologia de alimentos, Universidade Federal de Pelotas, p. 1-8, 2007,

MAYER, C.C.S. Detecção molecular e resistência aos antimicrobianos no grupo *Vibrio fluvialis*- *Vibrio furnissi*. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, SP, Dissertação de Mestrado, p. 96, 2010.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RÅDSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int.J. Food Microbiol.*, v.83, p.39–48, 2003

MARTÍN, M.C.; MARTÍNEZ, N.; DEL RIO, B.; LADERO, V.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M.A. A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae in the dairy and other food industries. *Journal Dairy Science*, v. 93, p. 860-867, 2010.

MAZIERO, M. T. Contaminação de carcaças de frango por *Campylobacter jejuni* antes e após armazenamento sob resfriamento ou congelamento. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) –

Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Estadual de Londrina, Londrina, p. 56-92, 2007.

MCLAUGHLIN, J.C. *Vibrio*. In: JOBARON, E. et al (ed). Manual of clinical microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. V. 35. p 465–76, 1995.

MELO, C.M.R.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; LAZOSKI, C. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. Biological Invasions, v.12, p.441-449, 2010.

MIOSSEC, L.; LE DEUFF, R.M.; GOULLETQUER, P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report, Copenhagen, n. 299, p. 42, 2009.

MIOTTO M. Recomendações para um programa de Boas Práticas de Fabricação aquícolas em cultivos de ostras (*Crassostrea gigas*). Universidade Federal de Santa Catarina- Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. p. 41, 2012.

MIZUTA, D. D. Contribuição do estudo oceanográfico para a produção comercial de ostras *Crassostrea gigas*: estudo de caso da Baía Sul, Ilha de Santa Catarina, SC. 2010. Dissertação (Mestrado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 126, 2010.

MORAES, I. R.; MASTRO, N. L.; JAKABI, M.; GELLI, D. S. Estudo da radiosensibilidade ao 60CO do *Vibrio cholerae* O1 incorporado em ostras. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 29-32, 2000.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. Parassitologia, Roma, v. 46, n. 1-2, p.163-167, 2004.

NORHANA, M. N. W.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; DYKES, G. A.; Prevalence, persistence and control of salmonella and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. Food Control. v. 21, p. 343–61, 2012.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In: BELKIN, S.S.; COLWELL, R.R. Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. New York: Springer. 2005. p. 253-275.

OLIVERA, A.; CAMPOS, S. S.; BRITO, L. O.; CASTRO, M. F.; FARIAS, M. E.; FRANÇA, E. Oyster culture in the state of Pernambuco-Brazil: Perspectives and Barriers. *World Aquaculture*, v. 37, n. 1, p.13 - 15, 2006.

OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives. *Food Control*, v.22, p. 805-816, 2011.

OSTRENSKY, A.; BORGUETTI, J. R.; SOTO, D. *Aqüicultura no Brasil – O desafio é crescer*. Brasília, p. 276, 2008.

PAGADALA, S; PARVEEN, S.; RIPPEN, T.; LUCHANSKY, J. B.; SCHWARZ, J.G.; Comparison of Automated BAX PCR and Standard Culture Methods for Detection of *Listeria monocytogenes* in Blue Crabmeat (*Callinectes sapidus*) and Blue Crab Processing Plants. *Journal of Food Protection*, v. 74, n. 11, p.1930–1933, 2011.

PRUZZO, C. et al. Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environment. In: BELKIN, S.S.; COLWELL, R.R. *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. New York: Springer, p. 217-252, 2005.

POLI, C.R. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*, 1852). In: POLI, C.R. et al. (Org.) *Aqüicultura: experiências brasileiras*. Florianópolis: Ed. Multitarefa, p. 251-266, 2004.

PORTELLA, C. D. G. Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliiana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2005.

PRUZZO, C. et al. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitin binding proteins. *Microbiology*, v. 142, p. 2181–2186, 1996.

RAMOS, R. J. Monitoramento bacteriológico de águas do mar e ostras (*Crassostrea Gigas*) em áreas de cultivo na baía Sul da Ilha de Santa

Catarina. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, p. 86, 2007.

RAMOS, R. J. *Vibrio* sp. em ostras e águas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina: ocorrência, caracterização feno e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração. 2012. 146 f. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Florianópolis, 2012.

RASMUSSEN, J. W.; HOIBY, N. Oxa-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, v. 57, p. 373-383, 2006.

RIVERA, I.N.; CHUN, J., HUQ, A.; SACK, R.B.; COLWELL, R.R. Genotypes associated virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2419-2421, 2001.

RUPP, G.S. Introdução à biologia das ostras. In: FERREIRA, J.F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Florianópolis, p. 15-24, 1999.

RÜCKERT, D. A. S. V. Comparação dos métodos microbiológicos convencional, imunoenálise e reação de polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate. Dissertação de Mestrado- Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa, p. 70, 2006.

RIVER, C. Detection and Identification of *Vibrio* Species in Food; <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Vibrios.php>; ©Copyright rapidmicrobiology.com, 2010.

SANTA CATARINA. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Síntese Informativa da maricultura catarinense, 2014. (Texto técnico). Disponível em http://www.epagri.sc.gov.br/wpcontent/uploads/2013/08/Sintese_informativa_da_maricultura_2014.pdf.

SANTA CATARINA. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Síntese Informativa da maricultura catarinense, 2013. (Texto técnico). Disponível em http://www.epagri.sc.gov.br/wpcontent/uploads/2013/08/Sintese_informativa_da_maricultura_2013.pdf.

SANTA CATARINA. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Síntese Informativa da Maricultura 2010. (Texto Técnico). Florianópolis: EPAGRI, p. 9, 2010.

SANTOS, A. A. D.A. L. T.; NOVAES, F. M; SILVA, et al. Síntese Informativa da Maricultura EPAGRI-Dados Estatísticos da Aquicultura, n. 7, 2012.

SANTOS, A. A.; NOVAES A.L.T.; SILVA F.M.; SOUZA R.V.; COSTA S.W. Síntese informativa da maricultura 2011. Governo do Estado de Santa Catarina, Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina- EPAGRI, Florianópolis, p. 7, 2011.

SANTOS, A.A.; NOVAES, A. L.T.; MULLER, F.; RUPP, G. S.; VENTURA, R. Síntese informativa da maricultura 2009 (mexilhões, ostras e vieiras). Epagri/Cedap. Florianópolis, 2010. [online] disponível na internet via <http://www.epagri.rct-sc.br/> o em 10 set, 2010

SENAI.; SEBRAI.; CNI. Elementos de apoio para o sistema APPCC: Série Qualidade e Segurança Alimentar. Projeto APPCC Indústria. 2 ed. Brasília. 2000.

SILVA-SOUZA (org.). Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. Maringa: Abrapoa, p. 95-117, 2006. CODEX ALIMENTARIUS. Code of Practice for Fish & Fishery Products. CAC/RPC 52-2003, Rev.1-2004.

SONIAT, T.M.; KLINCK, J.M.; POWELL, E.N.; COOPER, N.; ABDELGUERFI, M.; HOFMANN, E.E E.; QADDOURA, F. A shell-neutral modeling approach yields sustainable oyster harvest estimates: A retrospective analysis of the Louisiana state primary seed grounds. Journal of Shellfish Research, v. 31, n. 4, p. 1103-1112, 2012.

SOUZA FILHO, J. Custo de produção da ostra cultivada. Florianópolis: Instituto Cepa/SC. Cadernos de indicadores agrícolas, p. 23, 2003.

SOUZA, R. V. de; PETCOV, H. F. D. Comércio legal de moluscos bivalves. Florianópolis, SC; Epagri, Boletim Didático, n. 95, p. 58, 2013.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food microbiology. v. 24, p. 549-558, 2007.

SWANINATHAN, N., Qu, J., Sun, Y. An electro chemo mechanical theory of defects in ionic solids. I. Theory. Philos. Mag. v. 87, n. 11, p. 1705–1721, 2007a.

TANG, Y.; LU, L.; WEI, Z.; WANG, J. Rapid detection techniques for biological and chemical contamination in food: A review. International Journal of Food Engineering, v.5, issue 4, p.1-13, 2009.

TEODORO, V. A. M.; PINTO, M. C. D.; VANETTI, P. D.; BEVILACQUA, M. P.; PINTO, M. S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 9-14, 2006.

TEPLITSKI, M.; WRIGHT, A.C.; LORCA, G. Biological approaches for controlling shellfish-associated pathogens. Current opinion in Biotechnology, v.20, p.1-6, 2009.

TILLER, R.; GENTRY, R.; RICHARDS, R. Stakeholder driven future scenarios as an element of interdisciplinary management tools; the case of future offshore aquaculture development and the potential effects on fishermen in Santa Barbara, California. Ocean & Coastal Management, v. 73, p. 127-135, 2013.

THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Taxonomy of the *Vibrios*. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Eds.). The Biology of *Vibrios*. Whashington: American Society for Microbiology, p. 29-43, 2006.

THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of *vibrios*. Microbiology Molecular Biology. Review.v.68, p.403-432, 2004.

TURECK, T. R. Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsidio ao cultivo. Dissertação de doutoramento apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. p. 140, 2010.

YEUNG, P. S. M.; BOOR, K. J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. Foodborne pathogens and disease. v. 1, n. 2, p. 74-88, 2004.

VALENTE, L. et. al. Manuais de Maricultura; Cultivo de Ostras. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, 2012. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABbH4AJ/manual-criacao-ostras>

VICENTE, A. L.; SOUZA, R. V.; NOVAES, A.T.; SANTOS, A.; SILVA, F. M. Diagnóstico de Problemas e demandas da Malacocultura em Santa Catarina: Uma Visão de Maricultores, Extensionistas e Pesquisadores. Epagri 2010.

VIEIRA, R. H. S. F. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Livraria Varela, p. 380, 2004.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. Kanagawa-Negative, tdh- and trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. Current Microbiology, v. 63, p. 126-130, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION.

Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters: interpretative summary and technical report. WHO: Genebra, n. 8, p. 135, 2005.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. The Lancet, London, v. 4, p.337-348, 2004.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.). Biologia Molecular Básica.4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 403, 2012.

ZAMORA-PANTOJA, D.R; QUINONES-RAMIREZ, E. I.;
FERNÁNDEZ, F.J. ; VÁSQUEZ-SALINAS C. Virulence factors
involved in the pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus* . Reviews in
Medical Microbiology, v. 24, p. 41–47, 2013.

CAPÍTULO II

**COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ISO 21872 E O PCR EM
TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE *Vibrio cholerae*, *Vibrio
parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* EM OSTRAS (*Crassostrea
gigas*)**

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos, o Brasil se tornou o segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina, devido ao desenvolvimento da atividade de aquicultura, que passou por grandes avanços produtivos (FAO, 2014).

O consumo de moluscos, especialmente ostras cruas, é prática crescente em todas as regiões litorâneas do Brasil. A preferência do consumidor por ostras frescas pode representar riscos, devido a sua vida útil curta, que limitam a comercialização global de produtos frescos em larga escala (RODRIGUES e CARVALHO FILHO, 2011).

O problema tende a se agravar quando há aumento da temperatura ambiental, pois as taxas de filtração e de crescimento das ostras também são aceleradas nessas condições, conseqüentemente aumentando a possibilidade de bioacumulação de bactérias patogênicas pelas ostras (CHRISTO, 2006). Esses patógenos podem ocorrer naturalmente no ambiente marinho, como é o caso das espécies de *Vibrio*, e podem estar presentes nos pescados e moluscos crus ou parcialmente submetidos à cocção (THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004).

As três principais espécies: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, são consideradas potencialmente patogênicas ao homem e conhecidas por causar infecções, representando riscos à saúde pública (THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004; DRAKE; DEPAOLA; JAYKUS, 2007; NEOGI et al., 2010; IZUMIYA et al, 2011).

Para a detecção de patógenos, os métodos convencionais são os mais utilizados no controle microbiológico de alimentos. Na indústria de alimentos os métodos analíticos microbiológicos são essenciais para a liberação de lotes de alimentos seguros, porém, outras técnicas estão sendo estudadas e inseridas no controle de qualidade microbiológica para suprir dificuldades encontradas na utilização de métodos convencionais (ANDRADE et al., 2010). A inovação em métodos microbiológicos qualitativos é requerida a fim de reduzir ou eliminar os inconvenientes dos métodos convencionais (TANG et al., 2009; IPARDES, 2011).

A PCR revolucionou a análise genética, visto que as pesquisas propiciaram o desenvolvimento de diversas técnicas derivadas, já consolidadas principalmente em laboratórios como ferramenta complementar aos métodos oficiais de análise microbiológica (CORTEZ, 2006). Na análise microbiológica de alimentos há a necessidade de procedimentos rápidos e eficazes, pois a rápida e elevada iminência de novas contaminações alimentares conduz a esta necessidade (PASSO, 2009).

Diversos autores, tem utilizado a PCR em tempo real para detecção de *V. parahaemolyticus* (NORDSTROM et al., 2007; KIM et al., 2008) *V. cholerae* (GUBALA, 2006; GUBALA e PAROLE, 2006) e *V. vulnificus* (PANICKER e BEJ, 2005; GORDON et al., 2008; WU et al., 2008) em amostras de ostras.

No entanto, ressalta-se assim que os testes baseados em PCR estão entre os mais rápidos utilizados atualmente, permitindo a detecção de patógenos de relevância e reconhecidos como potenciais alternativas aos métodos de cultura (JUSTÉ et al., 2008; KILLNER, 2008; PASSO, 2009). Os tempos de enriquecimento para a PCR em tempo real, são mais curtos do que com outros métodos, devido à maior sensibilidade da técnica (MARTÍN et al., 2010).

Este trabalho teve por objetivo comparar os metodologias ISO **21872** e o PCR em tempo real para detectar *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em ostras (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de ostras (*C. gigas*) foram coletadas no mês de dezembro de 2014, no Distrito de Santo Antônio de Lisboa, localizado na parte noroeste da Ilha de Santa Catarina. Após a coleta as amostras de ostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e levadas ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

As amostras de ostras foram imediatamente lavadas, com escova sob água corrente potável. Todo material aderido às conchas foram

retirados, e as ostras foram colocadas em bandejas plásticas previamente higienizadas com álcool 70%.

Foram coletadas um total de 70 amostras de ostras frescas, de tamanho médio de 10 cm, sendo que 6 ostras constituíram cada amostra, totalizando 420 ostras analisadas.

2.2 Preparação das culturas bacterianas

Foram utilizadas cinco cepas de *Vibrio* sp. fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Cada micro-organismo foi individualmente inoculado de acordo com o protocolo de reativação:

- *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749) e *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562): inoculados individualmente em 10 ml de caldo nutriente (Difco) suplementado com 3% NaCl e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C). O caldo com crescimento foi inoculado em placas de Agar Marine (Difco) e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C).
- *Vibrio cholerae* (ATCC 14039): inoculado individualmente em 10 ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB, Oxoid) e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C). O caldo com crescimento foi inoculado em placas de Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid) e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C).
- *Vibrio cholerae* (ATCC 14039): inoculado individualmente em 10 ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB, Oxoid) e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C). O caldo com crescimento foi inoculado em placas de Tryptic Soy Agar (TSA, Oxoid) e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C).
- *Vibrio mimicus* (ATCC 33653): inoculado individualmente em 10 ml de caldo nutriente (Difco) e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C). O caldo com crescimento foi inoculado em placas de Agar Nutriente (Difco) e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C).
- *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802): inoculado individualmente em 10 ml de caldo nutriente (Difco) suplementado com 3% NaCl e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C). O caldo com crescimento foi inoculado em placas de Agar

Nutriente (Difco) suplementado com 3% NaCl e incubado por 24h a 37 °C (± 1 °C).

Uma única colônia de cada cultura foi repicada separadamente em tubos de 10 ml de TSB (*V. cholerae* e *V. mimicus*) e TSB com 3% NaCl (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) e foram incubados a 37 °C (± 1 °C) por 6h. As culturas foram transferidas para tubos e centrifugados a 3000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensão em 50 ml de solução salina (1%) para produzir uma concentração de cultura de aproximadamente 10^8 UFC ml⁻¹ de acordo com a escala padrão de McFarland.

Para etapa de contaminação artificial das ostras com diferentes espécies de *Vibrio*, foram utilizadas as combinações de micro-organismos divididos em cinco amostras (A1, A2, A3, A4, A5) de acordo com a Tabela 1.

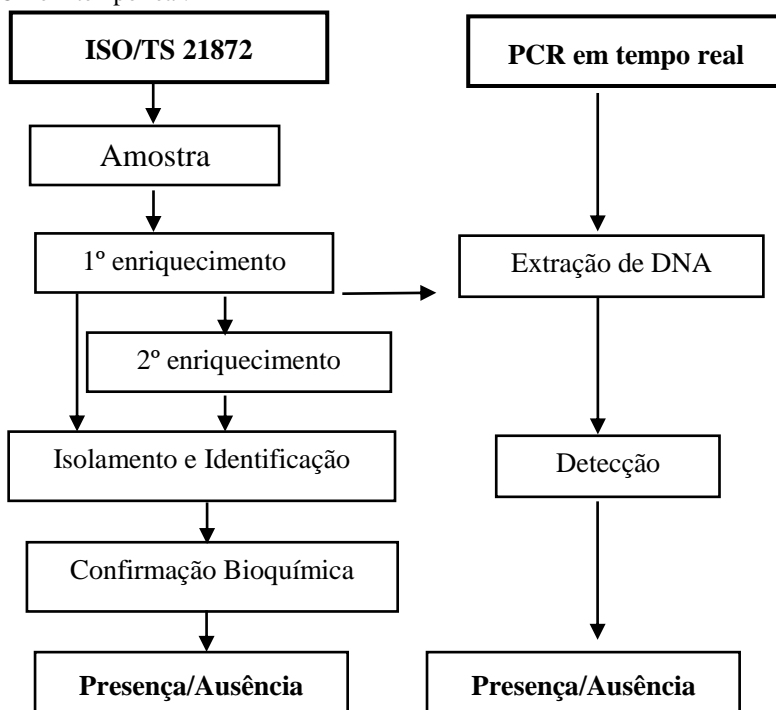
Tabela 1. Caracterização e número de amostras de ostras artificialmente contaminadas com *Vibrio* spp.

| Amostras de ostras | <i>Vibrio</i> spp. inoculados | Número de amostras |
|---------------------------|--|---------------------------|
| A1 | <i>V. cholerae</i> | 14 |
| A2 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 14 |
| A3 | <i>V. vulnificus</i> | 14 |
| A4 | <i>V. cholerae</i> + <i>V. alginolyticus</i> | 14 |
| A5 | <i>V. vulnificus</i> + <i>V. mimicus</i> | 14 |
| Total | | 70 |

2.3 Ensaios Microbiológicos

Os ensaios microbiológicos de isolamento foram realizados utilizando-se simultaneamente, o método ISO/TS 21872:2007, segundo a especificação técnica, Parte 1- Detecção de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* e Parte 2 – Detecção de outras espécies incluindo o *V. vulnificus* e o PCR em tempo real, conforme a Figura 1.

Figura 1. Fluxograma para detecção de *Vibrio* spp. pelos métodos ISO 21872 e PCR em tempo real.



2.3.1 Contaminação das amostras

As culturas bacterianas obtidas no item 2.2, foram utilizadas para a etapa de contaminação artificial das amostras. Foram realizadas contagens para confirmar a concentração inicial das culturas 10^8 UFC ml^{-1} em placas de TSA (*V. cholerae* e *V. mimicus*) e TSA com 3% NaCl (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) e incubadas a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24h.

Uma alíquota da cultura de 10^8 UFC ml^{-1} foi utilizada para atingir a concentração desejada (10^1 UFC ml^{-1}). As contaminações das amostras com as cepas de *Vibrio* spp. foram realizadas, na etapa seguinte.

2.4 Detecção pelo método ISO/TS 21872

2.4.1 Primeiro enriquecimento seletivo

Para cada amostra pesou-se 25g de ostras em saco estéril e posteriormente foram adicionados 225 ml de água peptonada alcalina pH 8,6 (APW-Oxoid). As amostras foram homogeneizadas no equipamento Bag Mixer® por 1 minuto e foi inoculada uma alíquota da concentração de cultura obtida no item 2.3.1 e as amostras homogeneizadas novamente por 1 minuto e incubou-se por 6h a 41,5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

2.4.2 Segundo enriquecimento seletivo

Após a incubação, foi transferido 1mL da cultura obtida no primeiro enriquecimento seletivo para um tubo contendo 10 mL de água peptonada alcalina (APW) e incubou-se por 18h a 41,5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

2.4.3 Isolamento e Identificação

A partir das culturas obtidas no item 2.4.1 e 2.4.2, foram realizadas as inoculações em dois meios seletivos. O primeiro meio seletivo utilizado foi o ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) recomendado pela ISO 21872, para o isolamento e identificação de *Vibrio* spp. O segundo meio seletivo utilizado para isolamento e identificação foi o ágar sódio dodecil sulfato polimixina B sucrose (SDS) para *V. cholerae* e *V. vulnificus* e o ágar tripton de soja cloreto de trifeniltetrazólio (TSAT) para *V. parahaemolyticus*. As inoculações foram realizadas com alça de platina na superfície das placas pela técnica de esgotamento, após foram invertidas e incubadas por 24h a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Verificou-se as placas quanto à presença de colônias suspeitas de serem *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. As características das colônias foram observadas de acordo com cada meio seletivo:

- *V. cholerae*: colônias amarelas (sacarose positiva), 2 a 3mm de diâmetro em ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) e colônias roxas, com halo opaco e com 2 mm de diâmetro ou maiores em o ágar sódio dodecil sulfato polimixina B sucrose (SDS).

- *V. parahaemolyticus*: colônias lisas ou planas, verde azuladas (sacarose negativa) com 2-3mm de diâmetro em ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) e colônias planas, com halos opacos vermelho escuro e com 2-3mm de diâmetro em ágar triptona de soja cloreto de trifeniltetrazólio (TSAT).
- *V. vulnificus*: colônias lisas ou planas, verde azuladas (sacarose negativa) com 2-3mm de diâmetro em ágar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) e colônias roxas, com halo opaco e com 2 mm de diâmetro ou maiores em o ágar sódio dodecil sulfato polimixina B sucrose (SDS).

Foram selecionadas 5 colônias típicas suspeitas ou todas (quando houve menos de 5) nos dois meio de isolamento. Após as colônias suspeitas foram inoculadas na superfície de placas com ágar salino nutritivo e incubadas por 24 h a 37°C (± 1 °C) para posterior confirmação bioquímica.

2.4.4 Confirmação Bioquímica

Inicialmente realizou-se uma triagem, através da coloração de Gram, teste de oxidase, teste de motilidade e halotolerância. Segundo a ISO 21872, as colônias isoladas em ágar salino nutritivo foram submetidas a coloração de Gram para o estudo da morfologia bacteriana com o auxílio de um microscópio, o teste da oxidase, através de tiras de oxidase (Newprov). As colônias isoladas em ágar salino nutritivo foram inoculadas em tubos de água peptonada alcalina (APW) e incubadas por 6h a 37°C (± 1 °C), após uma gota da cultura foi depositada em lâmina, coberta por uma lamínula e observada a motilidade com auxílio de um microscópio. Para os testes de halotolerância, foram preparadas séries de tubos com água peptonada e adição de NaCl em diferentes concentrações (0%, 2%, 6%, 8% e 10%) e incubou-se os tubos por 24h a 37°C.

Após a triagem inicial, as culturas Gram negativas, oxidase positiva, motilidade positiva e crescimento em 0% e 2% de NaCl para *V. cholerae*, 2%, 6% e 8% para *V. parahaemolyticus*, 2% e 6% para *V. vulnificus*, foram submetidas à identificação taxonômica das espécies e confirmação pelo kit API 20E (Biomérieux).

Utilizando uma suspensão bacteriana preparada a partir de uma colônia isolada em ágar salino nutritivo em 5 ml de solução salina contendo 0,85% NaCl, foram inoculadas em galerias de API 20E e incubadas por 18-24h a 37° C (± 1 °C). Após incubação, a identificação do micro-organismo é realizada pelas mudanças de cores nos microtubos, após o sistema indicador ter sido alterado pelos metabolitos ou pelos reagentes. A leitura de cada galeria de API 20E gerou um código de 7 dígitos e utilizou-se de um software para a confirmação dos resultados.

2.5 Detecção pelo método PCR em tempo real

2.5.1 Teste preliminar

Foi realizado inicialmente um teste preliminar para o kit *Vibrio triple*® (QIAGEN), a fim de avaliar as condições de preparo de mix, extração e condições de ciclagem. Pra isso foram utilizados o DNA de *V. cholerae* (ATCC 14039), *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *V. vulnificus* (ATCC 27562) como controle positivo e o DNA da cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) como controle negativo.

2.5.2 Preparo das amostras

Para a realização do protocolos de PCR em tempo real, foi retirada uma alíquota de 1ml da cultura obtida após o período de incubação da etapa do primeiro enriquecimento seletivo, utilizado na metodologia ISO 21872. Essa alíquota foi transferida assepticamente para um microtubo de 2 ml identificado e foi realizada uma centrifugação de 30.000_xg por 10 minutos, o *pellet* foi ressuspenso em 20 μ L de PBS, posteriormente foi levado ao equipamento de extração de DNA.

2.5.3 Extração de DNA

A extração e purificação do DNA bacteriano foi realizada de forma automatizada no equipamento QiaCube® (Qiagen) utilizando o kit *DNeasy Blood and Tissue*® (Qiagen) com protocolo específico para o equipamento, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Este equipamento seguiu as mesmas etapas de um procedimento manual, agilizando os procedimentos de purificação a partir de 12 amostras por corrida.

2.5.4 PCR em tempo real

Para realização da PCR em tempo real, inicialmente foram preparadas as reações, utilizando o kit *Vibrio triple*® (Qiagen) para a detecção qualitativa de *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* e *V. Vulnificus*, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Mix da reação de PCR para detecção de *Vibrio* spp. em amostras de ostras artificialmente contaminadas.

| Composição | Amostra | Controle (+) | Controle (-) |
|---|----------------|---------------------|---------------------|
| Master Mix | 10 µl | 10µl | 10µl |
| DNA- amostras | 10 µl | - | - |
| DNA- controle positivo | - | 10µl | - |
| H ₂ O livre de RNase – controle negativo | - | - | 10µl |
| Volume total | 20µl | 20µl | 20µl |

Fonte: dados primários do kit *Vibrio triple*® (2015)

Em todas as reações realizadas de PCR neste estudo, cada rotor incluiu um controle negativo, realizada uma reação com água isenta de RNase e um controle positivo do próprio kit.

Para a detecção da região específica do genoma dos patógenos, o produto alvo foi amplificado e detectado por sonda fluorescente que se ligam a ele, a medida que o produto de PCR acumula há um sinal registrando pelo Rotor-Gene. As condições de ciclagem da PCR foram realizadas conforme o protocolo do kit: 5 minutos a 95°C (Ativação enzima Taq DNA polimerase); 15 segundos a 95°C (desnaturação); 15 segundos a 60°C (anelamento); 10 segundos a 60°C (extensão), seguidos por 40 ciclos de PCR.

Os resultados foram expressos, quanto a presença/ausência de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. Vulnificus* para ambos os métodos, ISO 21872 e PCR em tempo real.

2.6 Análise Estatística

Os dados não paramétricos, foram tratados estatisticamente pelo software BioEstat 5.0 utilizando o teste de McNemar (SIEGEL, 1956), segundo a equação: $(|ND - PD| - 1)^2 / (ND + PD) = \chi^2$. O resultado foi significativo quando $\chi^2 > 3,84$, admitindo-se um erro padrão de 5% ($\alpha = 0,05$). Foram realizados os seguintes cálculos para os métodos qualitativos:

a) Concordância relativa: Grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método alternativo em amostras idênticas;

b) Desvio positivo (PD): O método alternativo se torna um falso positivo quando mostra um desvio positivo se ele indica um resultado positivo quando o método de referência indica um resultado negativo;

c) Desvio negativo (ND): O método alternativo indica um desvio negativo se ele demonstra um resultado negativo quando o método de referência dá um resultado positivo;

d) Sensibilidade relativa: Capacidade do método alternativo para detectar o alvo quando ele não é detectado pelo método de referência.

O cálculo de concordância relativa, sensibilidade relativa foram calculados através das equações:

$$\text{Concordância relativa} = (PA + NA) / N \cdot 100 \quad (1)$$

$$\text{Sensibilidade relativa} = (PA/N_+) \cdot 100 \quad (2)$$

PA = Número de resultados positivos nos dois métodos utilizados;

NA = Número de resultados negativos nos dois métodos utilizados;

N_+ = Total de resultados positivos obtidos pelo método de referência;

N = Número de amostras analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção pelo método ISO/TS 21872

As amostras artificialmente contaminadas com *Vibrio* spp. apresentaram as seguintes positivities pelo método ISO 21872: *V. cholerae*, 78,6% (11/14); *V. parahaemolyticus*, 71,43% (10/14); *V. vulnificus*, 78,6% (11/14); *V. cholerae* e *V. alginolyticus*, 64,29% (9/14); *V. vulnificus* e *V. mimicus* 64,29% (9/14). Das 70 amostras testadas, houve a detecção (presença) de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* na maioria das amostras.

As amostras artificialmente contaminadas com *Vibrio* spp. que não apresentaram colônias típicas no primeiro meio seletivo (TCBS) e no segundo, (SDS) para *V. cholerae* e *V. vulnificus* (TSAT) para *V. parahaemolyticus*, porém reações típicas na etapa de triagem bioquímica, foram submetidas a identificação taxonômica pelo kit API 20E. Os resultados dos micro-organismos identificados (%) foram: amostra 1 (*Aeromonas hydrophila*, 65%); amostra 2 (*Aeromonas salmonicida* ssp, 69%); amostra 3 (*V. anguillarum*, 45,3%); amostra 4 (*V. alginolyticus*, 99,3%) e amostra 5 (*V. vulnificus*, 43,8%).

Segundo Croci et al. (2007) são considerados positivos os isolados identificados pelo kit API 20E, quando a probabilidade for superior a 80%. Em seu estudo, avaliando diferentes métodos bioquímicos e moleculares para identificação de *V. parahaemolyticus*, constatou uma baixa sensibilidade (53%) na identificação correta através do sistema API 20E, indicando a possibilidade de produzir resultados falso negativos.

O uso do ágar de TCBS é recomendado pela ISO/TS21872, todavia, observou-se diferença na leitura de colônias características para as três espécies estudadas, principalmente pelo fato de colônias de *V. cholerae* possuírem as mesmas características de colônias de *V. alginolyticus*, o mesmo aconteceu para *V. vulnificus* e *V. mimicus*.

Entretanto o TCBS não diferencia *V. vulnificus* de *V. parahaemolyticus* ou *V. mimicus*, as colônias destes três espécies, que não fermentam sacarose, aparecem redondas, verdes e com 2 a 3 mm de diâmetro no TCBS, sendo necessários outros métodos para confirmação

da espécie, como o uso de testes bioquímicos ou moleculares (WILLIAMS; FROELICH; OLIVER, 2013).

Segundo Blanco-Abad et al. (2009) o *V. alginolyticus* é abundante nas águas do oceano Atlântico e tem uma maior taxa de multiplicação o que pode levar a inibição do crescimento de *V. parahaemolyticus* nos meios de cultura, levando a resultados falso-negativos, o autor recomenda que seja empregado um método de PCR direto para que se tenham resultados mais confiáveis.

O Agar SDS é um dos meios recomendados pela metodologia ISO 21872, ele foi desenvolvido para diferenciar as colônias de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* que possuem o mesmo aspecto em TCBS. As características que permitem a diferenciação baseiam-se na fermentação da sucrose e na atividade sulfatase, que produzem um halo ao redor da colônia. Além disso, são acrescentados um detergente e a polimixina B para aumentar a seletividade do meio, entretanto, é importante ressaltar que, neste meio, tanto as colônias de *V. vulnificus* como de *V. cholerae* não-O1 possuem o mesmo aspecto (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004), razão pela qual, na metodologia ISO ele é usado em conjunto com o TCBS.

Rosec et al. (2012), em estudo avaliando a metodologia ISO/TS21872-1 em produtos marinhos frescos, considerou pouco eficaz a utilização do ágar TCBS como meio seletivo na pesquisa de *V. parahaemolyticus* e recomenda a utilização de ágar cromogênico e confirmação molecular na pesquisa deste micro-organismo.

3.2 Detecção pelo método PCR em tempo real

O teste preliminar realizado com o kit *Vibrio triple*® (Qiagen) para avaliação da eficiência do teste foi satisfatório, tendo o controle positivo e o DNA conhecido de *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* amplificado com sucesso. O controle negativo do teste preliminar e para cada amostra não tiveram amplificação. As condições de ciclagem e preparo do mix sugeridos no protocolo do kit foram adequadas e, portanto, mantidas para as análises das amostras. Das 70 amostras testadas, houve amplificação para todas (presença), sendo as amostras e *Cycle Threshold* (CT) das curvas amplificadas estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Número da amostra e *Cycle Threshold* (CT) obtidos na amplificação pelo método de PCR em tempo real nas diferentes amostras de ostras artificialmente contaminadas com *Vibrio* spp.

| Nº de amostra | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 25,37 | 20,02 | 18,20 | 18,05 | 16,15 |
| 2 | 22,28 | 18,52 | 18,35 | 17,63 | 20,34 |
| 3 | 22,40 | 18,31 | 17,04 | 10,61 | 20,21 |
| 4 | 27,07 | 18,01 | 16,24 | 29,58 | 30,49 |
| 5 | 22,48 | 25,22 | 16,30 | 17,19 | 16,26 |
| 6 | 21,98 | 17,36 | 17,60 | 26,78 | 16,17 |
| 7 | 27,58 | 19,69 | 19,22 | 12,85 | 19,99 |
| 8 | 24,83 | 20,34 | 19,83 | 16,02 | 18,01 |
| 9 | 23,87 | 19,44 | 13,92 | 16,03 | 19,88 |
| 10 | 24,15 | 19,66 | 15,57 | 27,98 | 23,48 |
| 11 | 23,97 | 19,18 | 17,51 | 15,58 | 21,25 |
| 12 | 23,29 | 18,18 | 18,07 | 30,39 | 23,55 |
| 13 | 22,11 | 19,99 | 19,45 | 14,31 | 25,65 |
| 14 | 22,45 | 18,79 | 26,25 | 16,07 | 22,04 |

Legenda:

A1= *V. cholerae*

A2= *V. parahaemolyticus*

A3= *V. vulnificus*

A4= *V. cholerae* e *V. alginolyticus*

A5= *V. vulnificus* e *V. mimicus*

Como pode ser observado, os valores de *Cycle Threshold* (CT) positivos variaram de 10,61 a 30,49, ou seja, quanto maior for a quantidade inicial do alvo, mais cedo ocorreu um aumento significativo da fluorescência e mais baixo o valor de CT (ANDERSEN et al., 2006).

Essa diferença pode ocorrer devido a fatores relacionados a amostra, quantidade de DNA utilizado, presença de outros micro-organismos na matriz alimentar que competem no meio de

enriquecimento, efetividade do método de extração, além disso, não é possível conhecer qual o gene de interesse amplificado, devido ao kit ser comercial.

Estudo realizado por Kim et al. (2012), desenvolveram um ensaio de PCR multiplex para a detecção e quantificação de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em frutos do mar, sendo que, após o enriquecimento de 8 horas, os valores positivos de CT variaram de 16,2 a 28,2.

3.3 Comparação entre os métodos de detecção

Tanto o método de referência ISO 21872 quanto o método alternativo PCR em tempo real, foram capazes de detectar *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras artificialmente contaminadas. Os resultados de χ^2 foram $< 3,84$, para cada amostra, não apresentando diferença estatística significativa a nível de 95% de confiança. A comparação entre os métodos de detecção pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação estatística dos resultados das análises de *Vibrio* spp. em amostras de ostras artificialmente contaminadas pelo teste McNemar.

| Amostras | Métodos | PA (++) | NA (--) | ND (+-) | PD (-+) | χ^2 | Valor p |
|----------|---------|------------|------------|------------|------------|----------|---------|
| A1 | ISO PCR | 11 | 0 | 0 | 3 | 1,33 | 0,25 |
| A2 | ISO PCR | 10 | 0 | 0 | 4 | 2,25 | 0,13 |
| A3 | ISO PCR | 11 | 0 | 0 | 3 | 1,33 | 0,25 |
| A4 | ISO PCR | 9 | 0 | 0 | 5 | 3,2 | 0,063 |
| A5 | ISO PCR | 9 | 0 | 0 | 5 | 3,2 | 0,063 |

Legenda:

PA= Concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+)

NA= Concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-)

ND= Desvio negativo (método de referência positivo e método alternativo negativo (R+/A-))

PD= Desvio positivo (método de referência negativo e método alternativo positivo (R-/A+))

Segundo os dados obtidos neste estudo, não foi possível observar a concordância de resultados negativos e um desvio negativo em ambos os métodos, pois o método alternativo, detectou a presença das três espécies de *Vibrio* para todas as amostras realizadas.

Os resultados da concordância relativa (Tabela 5), mostraram um percentual entre 62,29% a 78,57%, de equivalência ao grau de correspondência obtidos pelo método ISO 21872 e PCR em tempo real. A sensibilidade relativa para o método alternativo PCR em tempo real, foi de 100% de detecção.

Tabela 5. Cálculo da concordância relativa e sensibilidade relativa entre os métodos ISO 21872 e PCR em tempo real na detecção de *Vibrio* spp. em amostras de ostras artificialmente contaminadas.

| Amostras | N | Concordância relativa (%) (PA + NA) / N . 100 | N₊ | Sensibilidade relativa (%) (PA/N₊) . 100 |
|-----------------|----------|--|----------------------|--|
| A1 | 14 | 78,57 | 11 | 100 |
| A2 | 14 | 71,43 | 10 | 100 |
| A3 | 14 | 78,57 | 11 | 100 |
| A4 | 14 | 64,29 | 9 | 100 |
| A5 | 14 | 64,29 | 9 | 100 |

Legenda:

N = Número de amostras analisadas;

N₊ = Total de resultados positivos obtidos pelo método de referência.

PA= Concordância de amostras com resultados positivos em ambos os métodos (+/+)

NA= Concordância de amostras com resultados negativos em ambos os métodos (-/-)

Fonte: dados primários (2015)

O método ISO 21872, demonstrou-se estatisticamente semelhante ao PCR em tempo real quanto a capacidade de detecção, no entanto, algumas amostras positivas detectadas através do método de PCR, não foram confirmadas pela metodologia clássica, podendo trazer implicações importantes quanto a saúde dos consumidores expostos. É necessário considerar que, em se tratando da garantia de inocuidade dos produtos envolvidos e da segurança alimentar dos consumidores, as

amostras positivas não detectadas pelo método ISO 21872, podem acarretar inúmeros problemas a nível de saúde pública.

Estes resultados evidenciam a elevada sensibilidade do método PCR em tempo real, permitindo detectar células viáveis e não viáveis, exigindo uma menor quantidade de células para detecção. Os falsos negativos, que poderão surgir pelo método clássico, são um perigo para a segurança alimentar quando os micro-organismos patogênicos são classificados como ausentes na amostra, não havendo detecção no momento de amostragem, podendo estas estar viáveis no momento do consumo (LOURENÇO, 2011).

A maior diferença entre os dois métodos de detecção, reside no custo benefício, já que os kits comerciais de PCR em tempo real, tendem a encarecer bastante as análises. Porém, a presença de células viáveis mas não cultivável (VNC) representa um problema de saúde pública, pois as células neste estado não são detectadas pelas metodologias clássicas utilizadas na rotina em laboratórios, resultando numa avaliação inadequada de alimentos contaminados com patógenos. Estas células ao serem ingeridas, e ao entrarem em contato com o consumidor, podem retomar a capacidade de se multiplicar e causar doenças (DOYLE; BEUCHAT e VILLE, 2001; DOYLE e BEUCHAT, 2007).

Estudo realizado por Garrido-Maestu et al. (2014), validaram um protocolo de qPCR multiplex *in house*, para detecção simultânea de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* e compararam com o método ISO 21872. O método desenvolvido foi aplicado para 58 amostras naturalmente contaminadas, entre elas peixes, crustáceos, moluscos, água e algas, nenhuma das amostras foram positivas para *V. vulnificus* pelos dois métodos, porém para *V. cholerae* (sete positivos para ISO e treze positivos para PCR) e para *V. parahaemolyticus* (um positivo para ISO e quatro para PCR) as frequências mais elevadas foram para o método qPCR.

Outros autores também destacaram a PCR em tempo real com maior frequência de detecção em comparação aos métodos de cultura tradicional em amostras de moluscos bivalves (FEDIO et al., 2007; ROSEC et al., 2009).

As técnicas baseadas em PCR tem o potencial para permitir uma rápida e sensível detecção de agentes patogênicos de origem

alimentar (KOBAYASHI et al., 2009; HYEON et al., 2010). Além disso, a grande vantagem do método PCR em tempo real em relação ao método ISO 21872 é principalmente o tempo de análise, enquanto o método alternativo foi possível detectar em menos de 48 horas, o método convencional levou cinco a seis dias para confirmação final.

O tempo de análise representa um dos fatores de maior discussão quando há comparação de métodos moleculares com os clássicos, sendo a PCR em tempo real uma ferramenta alternativa para identificação rápida e precisa (ANDRADE et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que, a comparação entre os dois métodos de detecção não diferiram estatisticamente entre si, porém, o método PCR em tempo real detectou o maior número de amostras positivas. Este método é uma alternativa especialmente interessante pois reduz bastante o tempo de análise das amostras contribuindo assim para um aumento da segurança alimentar dos consumidores deste tipo de produtos.

Com este trabalho tornou-se evidente que as características e capacidades da técnica de PCR em tempo real e existe uma necessidade de melhora na metodologia clássica disponível para que não se produzam resultados falsos-negativos, evitando assim que a segurança na produção de alimentos de origem marinha seja colocada em risco, protegendo assim o consumidor final.

Os métodos alternativos qualitativos podem ser utilizados como uma poderosa ferramenta na detecção de micro-organismos patogênicos em alimentos. Porém, há necessidade de padronização de protocolos e de validação internacional, mesmo após anos da introdução da PCR e sua aplicação na detecção de patógenos alimentares.

Além destas características apesar do investimento inicial de implementação da tecnologia de PCR em tempo real, o tempo útil para o conhecimento dos resultados é reduzido enormemente em relação aos testes realizados por métodos clássicos, sendo que todo este tempo ganho gera uma eficiência maior para liberação de resultados.

Deve ter-se ainda em conta que os custos nas análises alimentares regulares realizadas por tecnologia de PCR em tempo real,

em comparação com métodos de diagnóstico clássico definidos pelas normas da ISO, não diferem muito e que pela rapidez do alcance destes mesmos resultados, podem deste modo realizar-se um volume de análises muitíssimo maior.

5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. B.; GEMELLI, T.; ONDER DALL, K.; CRISTINA, T.; DE BRITO, T.; BARBOZA, A.A.L.; DE BRITO, B.G. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 741-750, 2010.

ANDERSEN, C.B.; HOLST-JENSEN, A.; BERDAL, K.G.; THORSTENSEN, T. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. J. Agric. Food Chem. v. 54, p. 9658-9663, 2006.

BLANCO-ABAD; V.; ANSEDE-BERMEJO, J.; RODRIGUEZ-CASTRO, A.; MARTINEZ-URTAZA, J. Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. International Journal of Food Microbiology, v. 129 n. 3, p. 229-236, 2009.

CORTEZ, A. L. L. Disseminação de bactérias do gênero *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade de São Paulo, Jaboticabal, p. 97, 2006.

CROCI, L; SUFFREDINI, E; COZZI, L; TOTI, L; OTTAVIANI, D; PRUZZO, C; SERRATORE, C; FISCHETTI, R; GOFFREDO, E; LOFFREDO, G; MIONI, R. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Applied Microbiology, v. 102, p. 229-237, 2007.

CHRISTO, W. S. Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea sacco*, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná/Brasil): um

subsídio ao cultivo. 2006. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2006.

DRAKE, S. L.; DEPAOLA, A.; JAYKUS, L. A. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. n. 6, v. 4, p. 120-144, 2007.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L.R.; VILLE, T. *Journal Food Microbiology Fundaments and Frontiers*; Second Edition; ASM Press; Washington DC; p. 24-28, 2001.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L.R. *Food Microbiology Fundaments and Frontiers*; Third Edition; ASM Press; Washington DC p. 78-361, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Roma, 2014

GARRIDO-MAESTU.A; CHAPELA, J.M; PEÑARANDA, E.; VIEITES, M.J.; CABADO, G.A. In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*) *Food Control* v. 37, p. 371-379, 2014.

GORDON, M. A.; GRAHAM, S. M.; WALSH, A. L.; WILSON, L.; PHIRI, A.; MOLYNEUX, E.; ZIJLSTRA, E. E.; HEYDERMAN, R. S.; HART, C. A.; MOLYNEUX, M. E. Epidemics of invasive *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* and *S. enterica* serovar *Typhimurium* infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 7, p. 963-969, 2008.

GRIFFITT, K. J., GRIMES, D. J. A novel agar formulation for isolation and direct enumeration of *Vibrio vulnificus* from oyster tissue. *Journal of Microbiological Methods*, v. 94, n. 2, p. 98-102, 2013.

GUBALA, A.J. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae* *Journal of Microbiological Methods* v. 65, p. 278–293, 2006.

HARWOOD, V. J.; GANDHI, J. P.; WRIGHT, A. C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and

environmental sources: a review. *Journal of Microbiological Methods*, v. 59, p. 301–316, 2004.

HYEON, J. Y.; HWANG, I. G.; KWAK, H. S.; PARK, C.; CHOI, I. S.; SEO, K. H. Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella Enteritidis* using real-time PCR assay. *Journal of Veterinary Science*, v. 11, n. 2, p. 143-149, 2010.

IPARDES. Workshop: identificação de gargalos tecnológicos na agroindústria paranaense, 2011.

ISO. (2007a). In (1st ed). *Microbiology of food and animal feeding stuffs e Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.- Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera* v. 21872-1*, p. 19, 2007.

ISO. (2007b). In (1 st ed). *Microbiology of food and animal feeding stuffs e Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.- Part 2: Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* v. 21872-2*, p.25, 2007.

IZUMIYA, H.; MATSUMOTO, K.; YAHIRO, S.; LEE, J.; MORITA, M.; YAMAMOTO, S.; ARAKAWA E.; OHNISHI M. Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Molecular and Cellular Probes*, v. 25, n. 4, 174-176, 2011.

JUSTÉ A.; THOMMAD B.; LIEVENS B: Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol* v. 25, p. 745–761, 2008.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, A. J. (2004). *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* spp. *Bacteriological analytical manual*. 8 ed., c. 9, 2004.

KILLNER, M. Paralelo entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para a detecção de *Salmonella* spp. em matrizes alimentares

sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso. 2008. 168f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KIM, H.-J.; LEE, H.-J.; LEE, K.-H.; CHO, J.C. Simultaneous detection of pathogenic *Vibrio* species using multiplex real-time PCR. *Food Control*, v. 23, n. 2, p. 491-498, 2012.

KOBAYASHI, H.; KUBOTA, J.; FUJIHARA, K.; HONJOH, K.; ITO, M.; FUJIKI, N. Simultaneous enrichment of *Salmonella* spp, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Listeria monocytogenes* by single broth and screening of the pathogens by multiplex real-time PCR. *Food Science and Technology Research*, v. 15, n. 4, p. 427-438, 2009.

LOURENÇO, J. I. R. Implementação da técnica de PCR em tempo real na detecção de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos. Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária de Santarém, Portugal, 2011.

MAFFEI, M. P.; VERNOCCHI, P.; LANCIOTTI R.; GUERZONI, M.E.; BELLETTI, N.; GARDINI, F. Depuration of Striped Venus Clam (*Chamelea gallina* L.: effects on microorganisms, sand content, and mortality. *Journal of food science*, v. 74, p. M1–M7, 2009.

NEOGI, S. B.; CHOWDHURY, N.; ASAKURA, M.; HINENOYA, A.; HALDAR, S.; SAIDI, S. M. A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 293-300, 2010.

NOSTROM, J.L.; VICKERY, M.C.L.; BLACKSTONE, G.M.; MURRAY, S.L.; DEPAOLA, A. Development of a multiplex Real-Time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl Environ Microbiol.* V. 73, n. 18, p. 5840-5847, 2007.

OLIVER, J. D. Viable but non culturable state in bacteria; *Journal of Microbiology*; v. 43, p. 93-100, 2005.

- PANICKER, G.; BEJ, A.K. Real-Time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oyster. Comparasion of targenting *vvhA* oligonucleotide primers and probes. Appl. Environ. Microbiol. v. 71, n. 10, p. 5702, 2005.
- PASSO, M. do C. S. U. da C. Avaliação de métodos moleculares para avaliação da qualidade e da segurança microbiológicas em produtos alimentares. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- RODRIGUES L.A.P, CARVALHO FILHO C.D. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* nas etapas de beneficiamento de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), Cultivadas na Baía de Todos os Santos - BA, e Determinação dos Pontos Críticos de Controle. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde v. 13, n. 2, p.77-83, 2011.
- ROSEC, J.-P.; CAUSSE, V.; CRUZ, B.; RAUZIER, J.; CARNAT, L. The international standard ISO/TS 21872-1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood: ITS improvement by use of a chromogenic medium and PCR. International Journal of Food Microbiology, n. 157, v. 2, p. 189-194, 2012.
- ROSEC, J. P.; SIMON, M.; CAUSSE, V.; BOUDJEMAA. M. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: comparison of PCR protocols using pR72H or toxR targets with a culture method. International Journal of Food Microbiology, v. 129, n. 2, p. 136-145, 2009.
- TANG, Y.; LU, L.; WEI, Z.; WANG, J. Rapid detection techniques for biological and chemical contamination in food: A review. International Journal of Food Engineering, v.5, N. 4, p. 1-13, 2009.
- THOMPSON, F. L., IIDA, T., SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 68, n. 3, p. 403-431, 2004.
- SANCHEZ, P.S.; STOPPE, N.C.; ZANOLI, M.I.; MARTINEZ, S.C.G.L.; OSTINI, S.; SEGAMARCHI, A.L.; ALMEIDA, G.L. Caracterização da qualidade microbiológica de águas marinhas e

moluscos bivalves do litoral norte do Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Goiânia. v. 16, p.430-445, 1991.

SARAVANAN, V.; KUMAR, H. S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Putative virulence genes of *Vibrio cholerae* from sea foods and the coastal environment of Southwest India. International Journal of Food Microbiology, v. 119, n. 3, p. 329-333, 2007.

SOLIC, M.; KRSTULOVIC, N.; JOZIC, S.; CURAC, D. The rate of concentration of fecal coliforms in shellfish under different environmental condition. Environment international, v. 25, n. 8, p. 991-1000, 1999.

WILLIAMS, T.; FROELICH, B.; OLIVER, J.D. Anewculture-based method for the improved identification of *Vibrio vulnificus* from environmental samples, reducing the need for molecular confirmation. Journal of Microbiological Methods, v. 93, n. 3, p. 277-283, 2013.

WU, Z.H.; LOU, Y.L.; LU, Y.Y.; YAN, J. Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for the detection of *Vibrio vulnificus* based on haemolysin (vvhA) codinf system. Biomed. Environ. Sci. v. 21, p. 296-301, 2008.

CAPÍTULO III

***EFEITO NO CRESCIMENTO DE Vibrio parahaemolyticus EM
OSTRAS (Crassostrea gigas) ARMAZENADAS SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E TEMPO***

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um território privilegiado em termos de costa litorânea e um enorme potencial para o desenvolvimento de sistemas de maricultura, apostando na produção de alimentos seguros e regionais. Santa Catarina concentra a maior parte desta produção, visto que suas condições geográficas são adequadas para o cultivo destes animais (RAMOS et al., 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em maio de 2012, instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). O PNCMB abrange as etapas de retirada, trânsito, processamento e transporte de moluscos bivalves destinados ao consumo humano. É importante destacar que, para a definição de retirada de moluscos bivalves, a Instrução Normativa nº7 considera apenas limite de número mais provável (NMP) para a bactéria *Escherichia coli* em 100 gramas da parte comestível dos moluscos bivalves como um dos critérios para retirada liberada de moluscos bivalves das áreas de cultivo, sendo este limite $< 230 \text{ NMP } 100 \text{ g}^{-1}$. Outras bactérias patogênicas, como por exemplo, *Vibrio parahaemolyticus*, não são abordadas, nesta legislação (BRASIL, 2012).

Todavia, a mesma instrução não fixa um tempo e uma temperatura na qual os moluscos podem ficar armazenados com o objetivo de assegurar a qualidade microbiológica, sendo importante avaliar os efeitos do binômio tempo e temperatura mais adequado.

É de interesse do governo de Santa Catarina, da secretaria de estado da agricultura e pesca, o desenvolvimento e aplicação de medidas de controle microbiológico para atender as exigências da União Europeia em moluscos bivalves (SOUZA, 2014). A maioria das nações que exportam produtos de origem marinha tem desenvolvido programas próprios, de acordo com a regulamentação de mercados modelo (BARARDI et al., 2006).

Nos Estados Unidos, através do *National Shellfish Sanitation Program* (NSSP) recomenda padrões de tempo e temperatura de armazenamento de moluscos bivalves vivos dentro das conchas para transporte até o processamento. Recomenda-se que as ostras sejam armazenadas em temperatura $\leq 10^{\circ}\text{C}$ por um período que varia de 10 a

36 horas. Este tempo é determinado em função da temperatura da água no momento da retirada dos moluscos e da presença de espécies do gênero *Vibrio* spp. (FDA, 2012). Sendo assim, os valores recomendados podem servir como modelo para estudos.

A possibilidade de consumidores de alimentos de origem marinha serem infectados por vibrios patogênicos através da ingestão de ostras, depende tanto da presença e quantidade microbiológica no habitat marinho, quanto das práticas de manuseio e processamento destes moluscos (VIEIRA et al., 2011). A capacidade filtradora e de bioacumulação das ostras faz com que a quantidade de bactérias em seu intestino seja superior à encontrada na água, uma vez que possui a capacidade de filtrar cerca de quatro litros de água por hora (VIEIRA; VASCONCELOS; CARVALHO, 2007).

A bioacumulação de *V. parahaemolyticus* em moluscos bivalves associa-se à temperatura das águas de cultivo, que fornecem um ambiente favorável à multiplicação do agente patogênico em temperaturas acima de 20 °C, e quando abaixo de 15°C favorecem ao desaparecimento deste micro-organismo, ou sua entrada em estado viável porém não cultivável em métodos da microbiologia clássica (SU e LIU, 2007). Todavia, tratando-se o Brasil de um país tropical com temperaturas elevadas durante boa parte do ano, esse cenário torna-se propício em toda a sua costa litorânea.

Vibrio parahaemolyticus, tem adquirido notável importância nas últimas décadas para comunidade científica, uma vez que foi protagonista de diversos surtos alimentares (SU e LIU, 2007; NELAPATI et al., 2012). Os sintomas comumente descritos e associados com infecções causadas por *V. parahaemolyticus* são caracterizados por diarreia, náusea, vômito, cefaleia, febre, dor abdominal. Os surtos registrados indicam que a causa é o consumo de alimentos de origem marinha crus ou inadequadamente cozidos, ou cozidos e recontaminados (LEE et al, 2008; GARRIDO et al., 2012).

Esta particularidade favorece a atuação das toxinas “*Thermostable Direct Hemolysin*” (TDH), “*Thermostable Related Hemolysin*” (TRH) e “*Thermolabile Hemolysin*” (TLH), reconhecidas como principais fatores de virulência, responsáveis pela manifestação de gastroenterite humana e identificadas fenotipicamente através da hemólise total dos eritrócitos humanos, o conhecido fenômeno de Ka-

nagawa (PEREIRA; VIANA e RODRIGUES, 2004; GONZALEZ et al., 2005; HEITMANN et al., 2005).

A microbiota presente nas ostras costuma refletir as condições do ambiente de cultivo, podendo ser influenciada pela temperatura e salinidade da água (FELDHUSEN, 2000; VIEIRA et al. 2011). Durante a retirada, transporte e armazenamento, micro-organismos patogênicos e deteriorantes podem se multiplicar afetando negativamente o aspecto sensorial das ostras e também podem vir a representar uma potencial ameaça à saúde do consumidor (MUDOH et al., 2014).

O armazenamento em gelo e refrigeração permanecem como os métodos mais frequentemente empregados para armazenamento devido a simplicidade e relativo baixo custo (CHEN et al., 2013). As ostras devem ser dispostas com a parte côncava para baixo e a parte lisa para cima, de forma a conter a água do mar, este procedimento ajuda na conservação do produto (SANTA CATARINA, 2007).

Este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito do crescimento de *V. parahaemolyticus* em ostras (*Crassostrea gigas*) naturalmente e artificialmente contaminadas armazenadas em temperatura de refrigeração (7°C) e temperatura ambiente (20°C) durante o período de 5 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As ostras (*C. gigas*) foram adquiridas de um cultivo na localidade de Santo Antônio de Lisboa, Florianópolis, Santa Catarina. Foi coletado um total de 96 ostras de tamanho médio (10 cm). As ostras foram, acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo em embalagem vedada até a realização das análises.

A água salina filtrada e esterilizada foi obtida do Laboratório de Moluscos Marinhos, localizado na unidade da Barra da Lagoa do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, acondicionada em galões de plástico. O estudo foi realizado em triplicata, nos meses de inverno de 2015, onde a temperatura média da água do cultivo foi de 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

2.2 Preparação das amostras

2.2.1 Ostras naturalmente contaminadas

As 48 ostras escolhidas apresentavam valvas bem fechadas e lavadas com água potável para eliminar resíduos presentes na parte externa das conchas, após divididas em dois lotes de 24 ostras cada. As ostras foram adicionadas em bandejas de plástico com a concha plana para cima, o primeiro lote foi imediatamente submetido a temperatura de 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em refrigerador, e o segundo lote armazenado a temperatura de 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em estufa, ambas período de 5 dias.

2.2.2 Ostras artificialmente contaminadas

Para a etapa de contaminação artificial primeiramente, a cepa de *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, foi reativada em 10 ml de caldo nutriente (Difco) suplementado com 3% NaCl e incubada a temperatura de 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24h. O caldo com crescimento foi inoculado em placas de Agar Nutriente (Difco) suplementado com 3% NaCl e incubado a 35 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24h.

Uma única colônia em placas foi repicada em tubos de 10 ml caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid) suplementada com 3% NaCl e incubada a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 6h. A cultura foi transferida para um tubo e centrifugada a 3000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso em 50 ml de solução salina (1%) para produzir um concentração de cultura de aproximadamente 10^8 UFC.ml⁻¹ de acordo com a escala padrão de McFarland.

As 48 ostras escolhidas apresentavam valvas bem fechadas e lavadas com água salina filtrada para eliminar resíduos presentes na parte externa das conchas. Após, as ostras foram colocadas com a concha plana para cima, em um aquário (dimensões: 50 x 32 x 29 cm), contendo 20L de água salina filtrada e esterilizada, por um período de adaptação de 3h, com aeração constante. Posteriormente a água salina foi contaminada com a cultura de *V. parahaemolyticus* a uma concentração de 10^3 UFC.ml⁻¹ e permaneceram por mais 3h no aquário. Foram realizadas contagens para confirmar a biocumulação, em placas de agar tripticase de soja (TSA-Difco) suplementada com 3% NaCl e incubadas a 35 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 24h.

As ostras contaminadas foram retiradas do aquário, e divididas em dois lotes de 24 ostras cada e acondicionadas em bandejas de plástico com a concha plana para cima. O primeiro lote foi imediatamente submetido a temperatura de 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em refrigerador e o segundo lote armazenado a temperatura de 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em estufa, ambos por um período de 5 dias.

2.3 Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados nos tempos 0, 1, 3, e 5 dias de armazenamento, para os lotes de ostras naturalmente e artificialmente contaminadas com *V. parahaemolyticus*, submetidos a temperatura de 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

2.3.1 Preparo e diluições das amostras

A cada lote, 6 unidades de ostras foram abertas com faca estéril própria e o líquido intervalar e a carne transferidos asépticamente para saco plástico estéril. Em seguida, pesada uma alíquota de 25g e homogeneizada em 225 ml de tampão fosfato salino (PBS-Oxoid). Foram preparadas diluições decimais até 10^{-7} em tampão fosfato salino (PBS), utilizados para os ensaios para a contagem de bactérias halofílicas e contagem de *V. parahaemolyticus*.

2.3.2 Contagem de bactérias halofílicas

A partir das diluições citadas no item 2.3.1, volumes de 100 μl foram semeados por espalhamento em placas contendo ágar tripticase de soja (TSA-Difco) suplementada com 2,5% NaCl. As placas foram incubadas a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48h. Após este período realizou-se a contagem das colônias e o resultado expresso em UFC.g⁻¹ (MUDOH et al., 2014).

2.3.3 Contagem de *Vibrio parahaemolyticus* – PCR em tempo real

A contagem de *V. parahaemolyticus* inicialmente foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP). A partir das diluições citadas no item 2.3.1, volumes de 1 ml foram inoculados em série de três tubos contendo 10 ml de água peptonada alcalina (APW-Oxoid) suplementada com 3% de NaCl e incubada a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 18 horas. Após, a confirmação dos tubos com turvação, investigou-se a detecção

de *V. parahaemolyticus* por PCR em tempo real, segundo as etapas seguintes.

2.3.3.1 Extração de DNA

Para a detecção de *V. parahaemolyticus*, por PCR em tempo real, os tubos de água peptonada alcalina (APW) que apresentaram turvação segundo o item 2.3.3, foram submetidos a etapa de extração do DNA bacteriano. Para cada tubo turvo, foi transferida uma alíquota de 200µl em microtubos específico para extração de DNA e a cultura fervida por 10 minutos, após os tubos permaneceram por 10 min em bloco de gelo (MUDOH et al., 2014). Todos os tubos extraídos nesta etapa, foram mantidos congelados para a confirmação por PCR.

2.3.3.2 Desenho de *primers*

Os *primers* para o *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) foram desenhados no programa Primer3 Plus, após o alinhamento no programa Bioedit e informações das sequências disponíveis no banco de genomas GenBank (HALL, 1999; UNTERGASSER et al., 2007). Os iniciadores foram analisados por meio do programa OligoCalc e PrimerBlast (KIBBE, 2007) para verificação de estruturas secundárias e análises *in silico* de especificidade. Os *primers* selecionados para reação de PCR são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers desenhados para quantificação de *V. parahaemolyticus* em ostras naturalmente e artificialmente contaminadas.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' para 3') | Tamanho do amplicon (bp) |
|----------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>Forward</i> | AAA ATT CGT GCG AAA GTG CT | 20 |
| <i>Reverse</i> | AAC AAG GAT CAC TCG CGT TC | 20 |

2.3.3.3 Avaliação da seletividade dos *primers*

A seletividade dos *primers* foi avaliada para a sequência alvo de DNA e de DNA não correspondente à região alvo, comumente encontrado em moluscos e no ambiente marinho e filogeneticamente relacionados com a espécie alvo.

Foram utilizadas, nove cepas bacterianas: *V. cholerae* (ATCC 14039), *V. vulnificus* (ATCC 27562), *V. mimicus* (ATCC 33653), *V. alginolyticus* (ATCC 17749), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111). Para a realização deste teste foi preparado o mix de reação, conforme descrito nas etapas seguintes, assim como as mesmas condições de ciclagem. Foi utilizado em duplicata como controle positivo *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) e duplicata do controle negativo sem nenhuma amostra de DNA.

2.3.3.4 Construção da curva padrão

A curva padrão foi preparada com diluições em série de DNA genômico isolado a partir de *V. parahaemolyticus*. O número de cópias do genoma foram calculadas com base no tamanho do *V. parahaemolyticus* (número de acesso GenBank JX262976.1) genoma (5,13 MBP) utilizando a constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) e o peso molecular do DNA (660 Da/bp). O DNA genômico foi diluído em dez vezes em água ultrapura e concentrações finais 10^6 a 10^0 cópias do genoma por 2 μ l, o equivalente a 5,52 ng a 5,52 fg.

A curva padrão para cada uma das diluições foram realizadas em duplicata e representadas pelo ciclo de quantificação (Cq) versus o logaritmo do número de cópias do genoma bacteriano. Os critérios de confiabilidade foram coeficiente de correlação e a eficiência de amplificação. O coeficiente de correlação R^2 é uma medida correspondente a todos os dados ajustados em linha reta, entre as repetições e o intervalo linear do ensaio (ACHILLEOS e BERTHIER, 2013). A eficiência de amplificação foram determinadas utilizando a equação $E = (10^{-1/s} - 1) \times 100$, onde E é a eficiência e o s é o declive obtido a partir da curva (BUSTIN et al., 2009).

2.3.3.5 Preparo da reação e condições de ciclagem

O volume da reação final utilizada foi de 25 μ L, conforme protocolo Rotor-Gene SYBR® Green kit (Qiagen) contendo: 7,5 μ L de água livre de RNase; 12,5 μ L do mix de reação; 1,5 μ L do *primer forward*; 1,5 μ L do *primer reverse* e 2 μ L de DNA.

As amplificações do DNA foram feitas em equipamento de PCR em tempo real (RotorGene Q - Qiagen) com as seguintes condições

de ciclagem: 5 minutos a 95°C (ativação inicial da enzima); 5 segundos a 95°C (desnaturação); 10 segundos a 60°C (anelamento e extensão), seguidos por 40 ciclos de PCR. Em todas as reações realizadas de PCR neste estudo, cada rotor incluiu um controle negativo, realizada uma reação com água isenta de DNA e um controle positivo de *V. parahaemolyticus*.

A população total de *V. parahaemolyticus* neste estudo foi determinada convertendo o número de tubos de APW positivos confirmados na PCR em tempo real, através da utilização da tabela do número mais provável (NMP) e o resultado expresso em NMP g⁻¹.

2.4 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios microbiológicos foram transformados em valores de log para realizar as análises estatísticas, as quais foram realizadas com auxílio do software BioEstat 5.0.

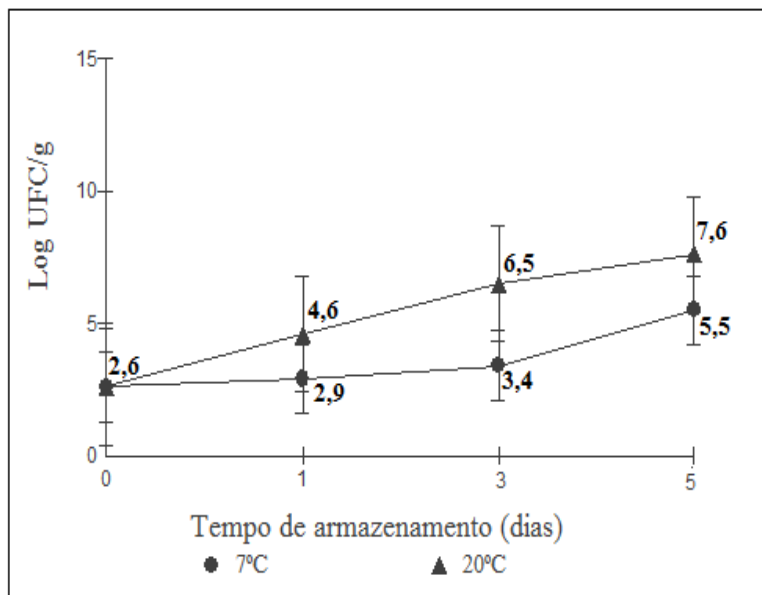
Os resultados foram submetidos a análise de variância ANOVA, utilizando um nível de significância de 5%. Havendo diferença entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey para compará-las por um período de até 5 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem de bactérias halofílicas

Os resultados das contagens de bactérias halofílicas em ostras naturalmente contaminadas com *V. parahaemolyticus*, armazenadas a 7°C e 20°C, podem ser observados na figura 1. Segundo os dados, houve um aumento nas contagens atingindo 5,5 log UFC g⁻¹ para a temperatura de 7°C, porém valores superiores de 7,6 log UFC g⁻¹ podem ser observados para temperatura de 20°C. Os resultados das contagens de bactérias halofílicas em ostras naturalmente contaminadas com *V. parahaemolyticus*, apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) para temperatura de 7°C e 20°C no período de 5 dias de armazenamento.

Figura 1. Contagens de bactérias halofílicas em ostras naturalmente contaminadas com *V. parahaemolyticus* armazenadas a 7°C e 20°C.



Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre as médias das contagens de bactérias halofílicas em ostras naturalmente contaminadas com *V. parahaemolyticus* para o tempo 0 e 1 dia, armazenadas a 7°C, porém houve um aumento significativo observado nos tempos 3 e 5 dias. As amostras armazenadas a 20°C, apresentaram diferença ($p < 0,05$), pois foi observado um aumento significativo entre todos os tempos de armazenamento.

Com relação a temperatura, verificou-se que, quando as ostras foram submetidas ao armazenamento em temperatura de refrigeração a 7°C, as contagens de bactérias halofílicas foram menores em relação a temperatura elevada de 20°C. As bactérias halofílicas presentes nas ostras costumam refletir de acordo com as condições do ambiente de cultivo e possui influência com a temperatura da água de cultivo, métodos de coleta das ostras e as condições de armazenamento também exercem grande influência.

Estudo realizado por Lorca et al. (2001), avaliando os efeitos de três temperaturas (7°C, 13°C e 21°C) de armazenamento de ostras

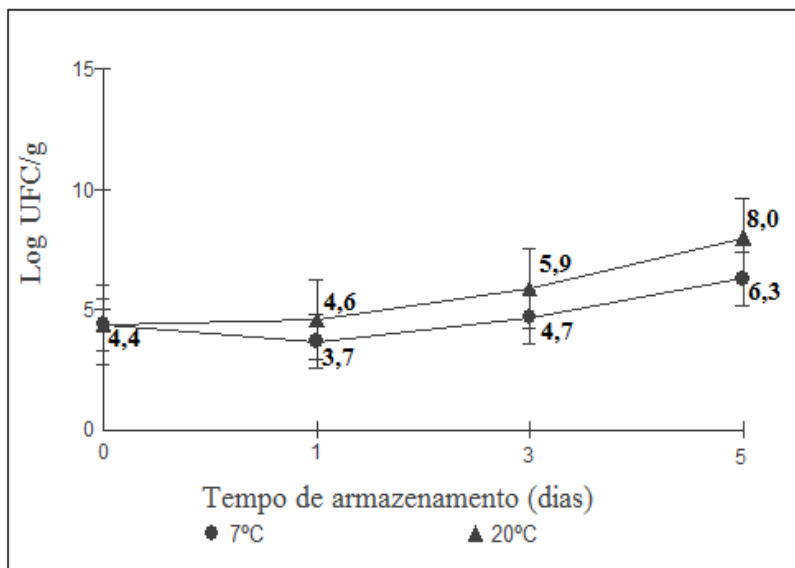
(*Crassostrea virginica*) durante o período de 10 dias, evidenciaram um aumento de 2,0 a 4,0 log para contagem de bactérias halofílicas em todas as condições de armazenamento.

De acordo com estudos da literatura, diversos micro-organismos podem estar envolvidos no ambiente marinho, sendo a microbiota das ostras bastante variada, podendo incluir bactérias patogênicas, como *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (KITIGUL et al., 2007; LEE, et al, 2008). Todos esses patógenos podem ser transmitidos pelo ambiente, ou como resultado de contaminação fecal humana e de animais de sangue quente, favorecendo a multiplicação acelerada em condições inadequadas de armazenamento (CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008).

Cao et al. (2009), avaliando as bactérias predominantes em ostras (*C. gigas*) armazenadas em duas temperaturas (5°C e 10°C) observaram contagens de 7,0 Log UFC g⁻¹ no décimo dia para temperatura de 5°C e no sexto dia para temperatura de 10°C. As espécies predominantes neste estudo foram bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* e *Bacillus*.

Os resultados das contagens de bactérias halofílicas em ostras artificialmente contaminadas com *V. parahaemolyticus*, armazenadas a 7°C e 20°C, podem ser observados na figura 2. Segundo os dados, houve um aumento nas contagens atingindo 6,3 log UFC g⁻¹ para a temperatura de 7°C, porém valores superiores de 8,0 log UFC g⁻¹ podem ser observados para temperatura de 20°C. Os resultados das contagens de bactérias halofílicas em ostras artificialmente contaminadas com *V. parahaemolyticus*, apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) para temperatura de 7°C e 20°C no período de 5 dias de armazenamento.

Figura 2. Contagens de bactérias halofílicas em ostras artificialmente contaminadas com *V. parahaemolyticus*, armazenadas a 7°C e 20°C.



Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre as médias das contagens de bactérias halofílicas em ostras artificialmente contaminadas com *V. parahaemolyticus* para os tempos 0, 1 e 3 dias, armazenadas a 7°C, porém houve um aumento significativo observado nos tempos 0 e 5 dias. As amostras armazenadas a 20°C, não apresentaram diferença ($p < 0,05$) no tempo 0 e 1 dia. Foi observado um aumento significativo nas contagens a partir do terceiro dia.

A contaminação artificial com *V. parahaemolyticus*, contribuiu no presente estudo com um aumento inicial na contagem de bactérias halofílicas, porém a temperatura de refrigeração a 7°C, foi capaz de manter constante as contagens nos três primeiros dias de armazenamento e um aumento observado nas contagens de bactérias halofílicas submetidas a temperatura abusiva de 20°C. Os resultados estão de acordo com Mudoh et al. (2014), que avaliaram os efeitos de três temperatura (5°C, 10°C e 20°C) de armazenamento em amostras de ostras (*C. virginica*) e observaram um aumento significativo nas contagens de bactérias halofílicas de 4,5 a 9,4 log UFC g⁻¹ entre o tempo 0 e 7 dias de armazenamento a 20°C.

3.2 Contagem de *Vibrio parahaemolyticus* - PCR em tempo real

3.2.1 Avaliação da seletividade dos primers

O controle negativo e as nove cepas bacterianas não correspondente a região alvo de DNA, não amplificaram e foi observada amplificação para o controle positivo *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802). A seletividade dos primers avaliada pela PCR em tempo real foi satisfatória, de acordo com a norma ISO 22118 (ISO, 2011b), a qual define seletividade como a medida da inclusão (detecção do micro-organismo alvo) e exclusividade (não detecção de micro-organismos não alvo).

De acordo com Wanderley (2011), a determinação da especificidade *in silico* e experimental para um sistema baseado em PCR deve ser considerada como um pré-requisito para qualquer estudo que faça uso da PCR, pois a escolha dos iniciadores que serão utilizados na PCR é de crucial importância, além de ser um dos principais fatores para se estabelecer a alta sensibilidade e especificidade da reação.

3.2.2 Construção da curva padrão

Os resultados obtidos na construção da curva padrão, para avaliação do desempenho da reação de qPCR apresentaram, correlação linear satisfatória ($R^2 = 0,99$), coeficiente angular da reta de ($S = -3,44$), correspondendo à uma eficiência de 95%.

Segundo Bustin et al. (2009), a eficiência de amplificação da PCR deve ser estabelecida por meio de curvas de calibração, pois tal calibração fornece uma indicação simples, rápida e reprodutível da eficiência média da PCR, a sensibilidade analítica do ensaio. Estes resultados estão de acordo com Zang e Feng (2006), a qual uma curva padrão de confiança deve apresentar um valor de R^2 mais elevado do que 0,95 e uma inclinação entre -3,9 e -3,0, correspondendo à eficiência de PCR entre 80 e 115%, respectivamente.

O ensaio de PCR desenvolvido, assegurou de forma confiável a detecção de quantidades de DNA de *V. parahaemolyticus* que variam de 10^6 cópias do genoma (5,62 ng) para 10^0 cópias do genoma (5,52 fg). O

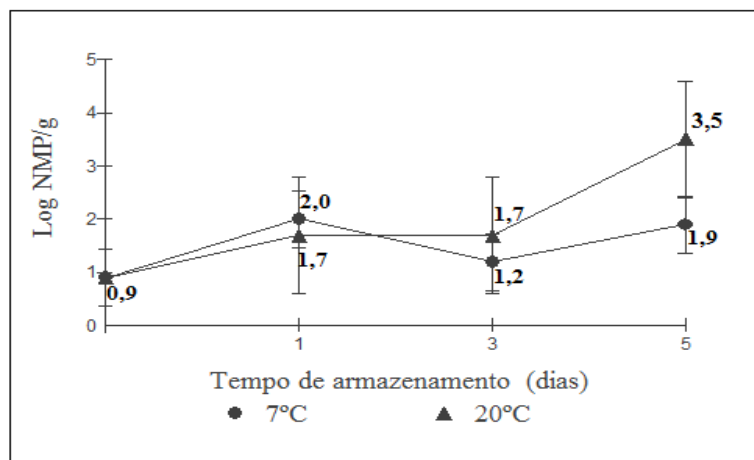
limite de detecção (LOD) foi de 1 cópia do genoma por reação, mostrando a alta sensibilidade do método.

Os resultados estão de acordo com European Union Reference Laboratory (LRUE), determina a sensibilidade de um método de quantificação de PCR através do LOD, sendo a menor quantidade de amostra que pode ser detectado de forma confiável.

3.2.3 Contagem de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras

Os resultados das contagens de *V. parahaemolyticus* em ostras naturalmente contaminadas, armazenadas a 7°C e 20°C, podem ser observados na figura 3. Segundo os dados, houve um aumento nas contagens atingindo 1,9 log NMP g⁻¹ para a temperatura de 7°C, porém valores superiores de 3,5 log NMP g⁻¹ podem ser observados para temperatura de 20°C. Os resultados das contagens de *V. parahaemolyticus* em ostras naturalmente contaminadas, apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) para temperatura de 7°C e 20°C no período de 5 dias de armazenamento .

Figura 3. Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras naturalmente contaminadas armazenadas a 7°C e 20°C.



Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre as médias das contagens de *V. parahaemolyticus* em ostras naturalmente contaminadas armazenadas a 7°C, foram observadas

diferenças significativas no tempo 0 e 5 dias, porém não houve aumento significativo observado entre os tempos 1, 3 e 5 dias. As amostras armazenadas a 20°C apresentaram diferença estatística e um aumento observado nos tempos 0, 1 e 5 dias. Não foi observada diferença significativa entre 1 e 3 dias de armazenamento a 20°C.

Ramos (2012), observou a presença natural de *V. parahaemolyticus* em baixas contagens variando de 0,9 a 1,9 log NMP g⁻¹ em ostras (*C. gigas*) nos meses da primavera e verão, período em que a temperatura das águas manteve-se em média próxima a 24°C. Ainda que em baixas concentrações os resultados deste estudo foram semelhantes e revelaram a presença natural de *V. parahaemolyticus* de 0,9 log NMP g⁻¹ nos meses de inverno, período em que a água manteve-se em média próxima a 21°C.

Diversos estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre a temperatura da água e ocorrência de *V. parahaemolyticus* (DEPAOLA et al., 2003; DEEPANJALI et al., 2005; CHAE et al., 2009; WANG et al., 2010). Segundo Curtis et al. (2003), o cultivo de moluscos bivalves, especialmente de ostras *C. gigas* no Brasil, apresenta um padrão rápido de crescimento, devido às ótimas condições geográficas, assim como a temperatura da água, que frequentemente está entre 20°C e 25°C.

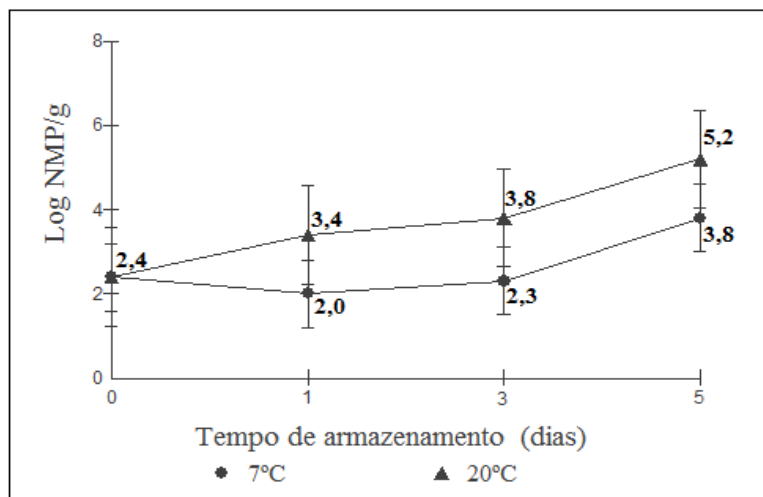
No Brasil, o controle microbiológico para a comercialização de ostras, são seguidos os parâmetros estabelecidos através da RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 do Departamento de Vigilância Sanitária, o qual não estabelece limites para *V. parahaemolyticus* (BRASIL, 2001). A legislação atual libera o consumo *in natura* que atendam aos limites microbiológicos estabelecidos somente se não consumidos crus, no entanto, considerando que as ostras são tradicionalmente consumidas crus ou levemente cozidas, podem representar alto risco e de uma forma geral, estão associadas a infecção alimentar (DE MATOS, 2013).

Considerando esta legislação a qual o nível máximo de *V. parahaemolyticus* permitido de $1,0 \times 10^3$ NMP g⁻¹ (3,0 log NMP g⁻¹), para pratos prontos, a contagem de *V. parahaemolyticus* em ostras naturalmente contaminadas em temperatura de refrigeração (7°C), apresentou valores inferiores durante os tempos de armazenamento ao limite máximo permitido. O armazenamento em temperatura superiores (20°C) apresentou um valor superior no tempo de 5 dias, em relação ao limite máximo permitido.

Estudo conduzido por Mudoh et al. (2014), avaliando os efeitos de três temperatura (5°C, 10°C e 20°C) de armazenamento de ostras (*C. virginica*) colhidas durante os meses de verão, observou uma concentração inicial de 3,5 log UFC g⁻¹ de *V. parahaemolyticus* e um aumento significativo de 7,5 log NMP g⁻¹ no décimo dia de armazenamento a 20°C. Embora, comparando com os valores encontrados neste estudo, foram inferiores para a contaminação natural inicial de *V. parahaemolyticus*, devido as ostras colhidas nos meses de inverno e avaliadas no período de 5 dias, porém o abuso de temperatura também apontou um aumento significativo no quinto dia de armazenamento a 20°C.

Os resultados das contagens de *V. parahaemolyticus* em ostras artificialmente contaminadas, armazenadas a 7°C e 20°C, podem ser observados na figura 4. Segundo os dados, houve um aumento nas contagens atingindo 3,8 log NMP g⁻¹ para a temperatura de 7°C, porém valores superiores de 5,2 log NMP g⁻¹ podem ser observados para temperatura de 20°C. Os resultados das contagens de *V. parahaemolyticus* em ostras naturalmente contaminadas, apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) para temperatura de 7°C e 20°C durante o período de 5 dias de armazenamento.

Figura 4. Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras artificialmente contaminadas armazenadas a 7°C e 20°C.



Foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre as médias das contagens de *V. parahaemolyticus* em ostras artificialmente contaminadas armazenadas a 7°C, entre os tempos 0 e 5 dias, porém não houve aumento significativo observado entre os tempos 0, 1 e 3 dias. As amostras armazenadas a 20°C apresentaram diferença estatística e um aumento observado nos tempos 0, 1 e 5 dias. Não foi observada diferença significativa entre 1 e 3 dias de armazenamento a 20°C.

Considerando a legislação a qual o nível máximo de *V. parahaemolyticus* permitido de $1,0 \times 10^3$ NMP g⁻¹ (3,0 log NMP g⁻¹) para comparação dos resultados observados neste estudo, a contagem de *V. parahaemolyticus* em ostras artificialmente contaminadas em temperatura de refrigeração (7°C), apresentou valores inferiores nos tempos 0, 1 e 3 dias de armazenamento ao limite máximo permitido. O armazenamento em temperatura superiores (20°C), apresentou valores superior nos tempos 1, 3 e 5 dias, em relação ao limite máximo permitido.

Nos Estados Unidos, após um surto envolvendo ostras, a *Food and Drug Administration* (FDA), através do o Programa Nacional de Sanitização de Moluscos (*National Shellfish Sanitation Program – NSSP - Guide for the Control of Molluscan Shellfish* (2009), estabeleceu um limite de atenção para *V. parahaemolyticus*, sendo este nível de contaminação igual ou superior a $1,0 \times 10^4$ NMP g⁻¹ (4,0 log NMP g⁻¹), Kanagawa positivo ou negativo.

Parveen et al. (2013), avaliando através de um modelo preditivo a multiplicação de *V. parahaemolyticus* em ostras (*C. virginica*) armazenadas em diferentes temperatura (5°C, 10°C, 15°C, 20°C 25°C e 30°C), puderam observar um rápido aumento nas contagens entre 15°C a 30°C em 3 dias e não foi observado um aumento nas contagens para temperatura de 5°C no período de 10 dias pelo modelo preditivo desenvolvido, sugerindo armazenamento em temperatura abaixo de 10°C eficaz na prevenção, da multiplicação de *V. parahaemolyticus* em ostras após a coleta.

No presente estudo a temperatura de refrigeração de 7°C submetida tanto para ostras contaminadas com níveis menores e maiores de *V. parahaemolyticus*, foi possível verificar uma contagem baixa nos três primeiros dias de armazenamento, sendo um dos parâmetros mais

importantes para o controle da multiplicação de *V. parahaemolyticus* e outras bactérias envolvidas no ambiente marinho.

4 CONCLUSÃO

Este estudo disponibiliza informações que podem contribuir no controle de *V. parahaemolyticus* em ostras comercializadas, especialmente para consumo *in natura*. O método de coleta e as condições de armazenamento sob refrigeração e manuseio influenciam sobre a qualidade do produto comercializado.

No intuito de assegurar a saúde do consumidor, é essencial o desenvolvimento e aplicação de medidas de controle higiênico-sanitárias na produção de ostras, principalmente, por meio de monitoramento bacteriológico das ostras e da água de cultivo. Por isso, considerando a necessidade de estabelecer requisitos de inspeção industrial e sanitária dos estabelecimentos de processamento de moluscos bivalves, como medida de prevenção de efeitos nocivos à saúde do consumidor, e com a finalidade de garantir padrões de qualidade.

Destaca-se a importância para a definição de retirada de moluscos bivalves, devido a Instrução Normativa nº7 considerar apenas limites da bactéria *Escherichia coli* e limites de biotoxinas produzidas por microalgas. Outras bactérias patogênicas, como por exemplo, *Vibrio parahaemolyticus*, não são abordadas nesta legislação.

5 REFERÊNCIAS

ACHILLEOS C.; BERTHIER F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples Food Microbiology v. 36, n. 2, p. 286-295, 2013.

BARROS, L.M.O.; THEOPHILO, G.N.D.; COSTA, R.G.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, R.H.S.F. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. Revista Ciências Agrônômica, Fortaleza, v. 36, n. 3, p. 285- 289, 2005.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.;MUELLER, R.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. The MIQE

guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, Washington, DC, v. 55, p. 611-622, 2009.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura, Instrução Normativa Interministerial N°7 Diário Oficial da União, p. 55-59. Brasília, 8 de maio de 2012. Disponível on-line em <http://mpa.gov.br/index.php/aquicultura>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. DOU, Brasília, 1 jan. 2001.

CAO R.; CHANG-HU; XUE Ch.H.; LIU Q.; XUE Y. Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. *Czech J. Food Sci.*, v. 27, p. 102–108, 2009.

CHAE, M.; CHENEY, D.; SU, Y. Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of food science*, v. 74, p. M62–M66, 2009.

CHEN, H., LIU, Z.; WANG, M.; CHEN, S.; CHEN, T. Characterisation of the spoilage bacterial microbiota in oyster gills during storage at different temperatures. *J. Sci. Food Agric.* v. 93, p. 3748–3754, 2013.

CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J.P.; KELLY, A.L. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. *Food Control*, v. 19, n. 12, p. 1139-1147, 2008.

CURTIUS, A.J. et al. Evaluating trace element contamination in mariculture activities. Partial results of a case study carried out in the coastal region of Santa Catarina, Brazil *Química Nova*, v. 26, p.44-52, 2003.

DE MATOS, K.H.O. Inativação microbiana em ostras (*Crassostrea gigas*) empregando dióxido de carbono supercrítico. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.; KARUNASAGAR, I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. Applied and environmental microbiology, v. 71, p. 3575–3580, 2005.

DEPAOLA, A. et al. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. Applied and environmental microbiology, v. 56, p. 2299 -2302, 2003.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborn disease. Microbes and Infections, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

GARRIDO, A.; CHAPELA, M.; FERREIRA, M.; ATANASSOVA, M.; FAJARDO, P.; LAGO, J.; CABADO, A. G. Development of a multiplex real-time PCR method for pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* detection (tdh+ and trh+). Food Control, v. 24, p 128-135, 2012.

GONZALEZ, E. N.; CACHICAR, V.; ACEVEDO, C.; RIOSECO, M. L.; VERGARA, J. A.; CABELLO, F.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. Emerg. Infect. Dis., v. 11, n. 1, p. 129-131, 2005.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., v. 41, p. 95-98, 1999.

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*. Rev. Chil. Infectol., v. 22, n. 2, p. 131-140, 2005.

ISO norm 22118:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens performance characteristics of molecular detection methods, 2011b.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 711, 2005.

KIBBE, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* v. 35, p. W43–W46, 2007.

KITTIGUL, L.; POMBUBPA, K.; RATTANATHAM, T.; DIRAPHAT, P.; UTRARACHKIJ, F.; PUNGCHITTON, S.; KHAMRIN, P.; USHIJIMA, H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters, *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, v. 122, n. 1-2, p. 204-210, 2008.

LEE, J.K.; JUNG, D. W.; EOM, S. Y.; OH, S. W.; KIM, Y.; KWAK, H. S.; KIM, Y. H. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. *Food Control*, v. 19, n. 10, p. 990-994, 2008.

LORCA AT.; PIERSON DM.; FLICK GJ.; HACKNEY RC., Levels of *V. vulnificus* and organoleptic quality of raw shellstock oysters (*Crassostrea virginica*) maintained at different storage temperatures. *J Food Prot* v. 64, n. 21 p. 1716, 2001.

MUDOH, F. M.; PARVEEN, S.; SCHWARZ, J.; RIPPEN, T.; CHAUDHURI, A. The effects of storage temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and organoleptic properties in oysters. *Frontiers on Public Health*. v. 2 p. 1-7, 2014.

NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM. Guide for the control of molluscan shellfish. Washington, 2009, 504 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/ucm046353.htm>>. Acesso em: 03 ago. 2011.

NELAPATI, S.; NELAPATI, K.; CHINNAM, B. K. *Vibrio parahaemolyticus* - An emerging foodborne pathogen A Review. *Veterinary World*. v. 5 p. 48-62, 2012.

PARVEEN S.; DASILVA L.; DEPAOLA A.; BOWERS J.; WHITE C.; MUNASINGHE K.A., et al. Development and validation of a predictive

model for the growth of *Vp* in post-harvest shellstock oysters. *Int J Food Microbiol* n. 1-6 p. 161, 2013.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, n. 4, p. 591-595, 2004.

RAMOS, R. J. *Vibrio sp.* em ostras e águas de áreas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina: ocorrência, caracterização feno e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração. 2012. 146p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2012.

RAMOS, R.J.; PEREIRA, M.R.; MIOTTO, L.A.; FARIA, R.D.; SILVEIRA JUNIOR, N.; VIEIRA, C.R.W. Occurrence of *Vibrio* spp., positive coagulase staphylococci and enteric bacteria in oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in the south bay of Santa Catarina island, Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.32, n. 3, p. 478-484, 2012.

SANCHEZ, P.S.; STOPPE, N.C.; ZANOLI, M.I.; MARTINEZ, S.C.G.L.; OSTINI, S.; SEGAMARCHI, A.L.; ALMEIDA, G.L. Caracterização da qualidade microbiológica de águas marinhas e moluscos bivalves do litoral norte do Estado de São Paulo. In: Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, Goiânia. Anais... Goiânia, v. 16, p. 430-445, 1991.

SANTA CATARINA. EPAGRI - PROGRAMA DE CERTIFICAÇÃO DA QUALIDADE DAS OSTRAS DA GRANDE FLORIANÓPOLIS. Ostras da Grande Florianópolis: caderno de normas: melhores práticas para produção de ostras de Florianópolis. SEBRAE, p. 66, 2007.

SOUZA, R. V. G. S.; RUPP, C. J. A.; CAMPOS, et al. (2014) Moluscos bivalves: medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Europeia Documentos v. 48, p. 247, 2014.

SU, Y.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food microbiol.* v. 24, p. 549-558, 2007.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USFDA). National Shellfish Sanitation Program model ordinance 2009. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/FederalStateFoodPrograms/UCM415522.pdf> Acesso em 19/09/2015.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M.: Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research v. 35, p. W71-W74, 2007.

VIEIRA, R. H. S. F.; VASCONCELOS, R. F.; CARVALHO, E. M. R. Quantificação de *vibrio*, de coliformes totais e termotolerantes em ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, e na água do estuário do Rio Jaguaribe, Fortim-CE. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. Kanagawa-Negative, tdh- and trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. Current Microbiology, v. 63, p. 126-130, 2011.

WANDERLEY, B.L. Avaliação da especificidade dos primers RV1 e RV2 para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral. Dissertação de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

WANG, D.; ZHANG, D.; CHEN, W.; YU, S.; SHI, X. Retention of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues after chlorine dioxide treatment. International journal of food microbiology, v. 137, p.76–80, 2010.

ZHANG, T.; FANG, H. H. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 70, n. 3, p. 281–289, 2006.