

Vibrio parahaemolyticus isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos

Vibrio parahaemolyticus isolated from fishes captured from the Lagoa dos Patos estuary

RIALA6/1649

Camile MILAN*, Débora Rodrigues SILVEIRA, Janaina Viana da ROSA, Cláudio Dias TIMM

*Endereço para correspondência: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, pr. 34, Pelotas, RS, Brasil, CEP: 96010-900. Tel: 53 3275-7216. E-mail: cami_milan@hotmail.com

Recebido: 20.03.2015 - Aceito para publicação: 26.05.2015

RESUMO

O estuário da Lagoa dos Patos é um importante polo pesqueiro artesanal por constituir área de criação de diversas espécies de peixes e crustáceos. Suas águas são influenciadas diretamente por fatores meteorológicos, os quais interferem na entrada de água oceânica no estuário e na vazão, refletindo na sua salinidade. Por esta razão, há a possibilidade de *V. parahaemolyticus* ser encontrado no estuário da lagoa e, conseqüentemente, nos pescados nele capturados, o que ofereceria risco aos consumidores. O objetivo do estudo foi de avaliar a presença de *V. parahaemolyticus* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos, capturados e processados artesanalmente. Cinquenta e seis amostras de pescados oriundos do estuário da Lagoa dos Patos foram analisadas quanto à presença de *V. parahaemolyticus*. Três das cinco espécies analisadas, camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), tainha (*Mugil platanus*) e linguado (*Paralichthys orbignyanus*) albergavam o micro-organismo pesquisado. Estes resultados servem de alerta para a necessidade de maior fiscalização na produção de pescados, bem como da adoção de medidas higiênico-sanitárias que previnam o risco de transmissão deste patógeno para os consumidores. Este é o primeiro registro de isolamento de *V. parahaemolyticus* de *F. paulensis*, *M. platanus* e *P. orbignyanus*.

Palavras-chave. peixe, camarão, *Farfantepenaeus paulensis*, *Mugil platanus*, *Paralichthys orbignyanus*.

ABSTRACT

Lagoa dos Patos estuary is an important artisanal fishing pole because it represents an area for breeding several species of fish and shellfish. Water is directly influenced by meteorological factors, which interfere in the ocean water into the estuary and flow, reflecting on the salinity. For this reason, there is the possibility of *V. parahaemolyticus* be found in the lagoon estuary; consequently the fish caught from these place could offer risks to the health of consumers. The objective of this study was to evaluate the presence of *V. parahaemolyticus* in the Lagoa dos Patos estuary, and in the fishes captured from small-scale fishing and processing. Fifty-six samples of fish caught from the Lagoa dos Patos estuary were analyzed for the presence of *V. parahaemolyticus*. Three of five species analyzed, shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*), mullet (*Mugil platanus*) and sole (*Paralichthys orbignyanus*) harbored this microorganism. These results serve as a warning for providing the best technical oversight to the production of fish, and also the adoption of hygienic and sanitary measures to prevent the risk of transmission of this pathogen to consumers. This is the first report on the isolation of *V. parahaemolyticus* from *F. paulensis*, *M. platanus* and *P. orbignyanus*.

Keywords. fish, shrimp, *Farfantepenaeus paulensis*, *Mugil platanus*, *Paralichthys orbignyanus*.

INTRODUÇÃO

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria halofílica, encontrada principalmente durante o verão em águas salobras, que causa doenças gastrointestinais em humanos. O consumo de peixes, moluscos e crustáceos do mar crus ou mal cozidos tem sido a principal causa de contaminação por *V. parahaemolyticus* em humanos¹.

O Brasil é considerado um país propício à ocorrência de infecções causadas por *V. parahaemolyticus*. O clima tropical, com ampla costa marítima, e os hábitos alimentares, que incluem a ingestão de pescados consumidos crus em algumas regiões, são fatores que influenciam a ocorrência de casos. No extremo sul do Brasil, o estuário da Lagoa dos Patos é considerado um polo pesqueiro artesanal, devido à importante área de criação de diversas espécies de peixes e crustáceos, destacando-se no abastecimento de pescados na região². Dentre os pescados capturados no estuário explorados comercialmente, destacam-se o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), a corvina (*Micropogonias furnieri*), a tainha (*Mugil latanus*), os bagres (principalmente *Genidens barbatus*), papa-terra (*Menticirrhus americanus*), o linguado (*Paralichthys orbignyanus*), a abrótea (*Urophycis brasiliensis*) e o peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*)^{3,4}.

A Lagoa dos Patos possui uma interação estuário-oceano, que é influenciada diretamente por fatores meteorológicos, os quais interferem na entrada de água oceânica no estuário e na vazão, refletindo na sua salinidade⁵. Por esta razão, há possibilidade de *V. parahaemolyticus* ser encontrado no estuário da lagoa e, conseqüentemente, nos pescados nele capturados. Logo, o risco que pode acarretar para os consumidores e a falta de estudos sobre *Vibrio* na região, caracterizam a justificativa do estudo, que teve como objetivo avaliar a presença de *V. parahaemolyticus* em pescados do estuário da Lagoa dos Patos, capturados e processados artesanalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Cinquenta e seis amostras de pescados inteiros refrigerados foram coletadas aleatoriamente em peixarias e supermercados dos municípios de Pelotas e Rio Grande, RS. Todas as amostras eram provenientes de capturas realizadas no estuário da Lagoa dos Patos. As amostras foram coletadas conforme a disponibilidade das espécies capturadas e desembarcadas na época do ano em que o trabalho foi realizado, de abril de 2013 a fevereiro de 2014. Foram coletadas 10 amostras de corvina (*Micropogonias furnieri*), 10 de tainha (*Mugil platanus*), 20 de linguado (*Paralichthys orbignyanus*), 3 de bagre (*Netuma barba*) e 13 de camarão (*Farfantepenaeus paulensis*). As amostras foram colocadas em sacos estéreis e imediatamente encaminhadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo, para a pesquisa de *V. parahaemolyticus*.

Pesquisa de *Vibrio* spp.

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi realizada de acordo com U. S. Food and Drug Administration - FDA⁶, com modificações. Para a análise das amostras, foram utilizados as guelras e o fígado, no caso dos peixes, ou um conjunto de quatro camarões. O material foi colocado em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia), massageado por 5 minutos e incubado a 37 °C por 24 h para enriquecimento. A partir do material da superfície dessas culturas foram feitas sementeiras por esgotamento em ágar Tiosulfato Citrato Bili Sacarose (TCBS, Himedia) e incubação a 37 °C por 24 h para obtenção de colônias isoladas. Até três colônias típicas de cada placa foram semeadas novamente em APA e após a incubação a 37 °C por 24 h foram misturadas com 20 % de glicerol para manutenção de estoque a -70 °C. Os isolados foram recuperados em APA a 37 °C por 24 h, quando necessário.

Extração de DNA

Para extração dos DNAs dos isolados foi utilizada a técnica descrita por Sambrook e Russel⁷. O pellet obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA foi ressuscitado em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1 % (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -20 °C por 1 h. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70 %. Após eluição em 40 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -20 °C.

Identificação de *V. parahaemolyticus*

Os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *toxR*, para identificação de *V. parahaemolyticus*, conforme Bilung et al⁸, com modificações. Cada reação teve como volume final 20 µL. A mistura consistiu em 10 µL de Master Mix (Qiagen, São Paulo, Brasil), 1 µL (10 pmol) de cada primer, ToxR-a

e ToxR-b, 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne), seguindo o programa: desnaturação inicial de 96 °C por 5 min, 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63 °C por 1,5 min, extensão a 72 °C por 1,5 min e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,8 %. Como controle positivo, foi utilizado o DNA de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 e como controle negativo foi utilizado água pura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinquenta e seis amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos foram coletadas e analisadas quanto à presença de *V. parahaemolyticus*. Três espécies albergavam o micro-organismo pesquisado (Tabela 1), sendo que os isolados de guelras e de fígados não eram dos mesmos peixes.

Apesar do clima com temperaturas mais amenas no sul do Brasil, *V. parahaemolyticus* foi isolado de número percentualmente maior de amostras tanto de camarões como de peixes, quando comparado a estudos realizados em outras regiões do Brasil.

Tabela 1. Pesquisa da presença de *Vibrio parahaemolyticus* em pescados capturados no ambiente estuarino da Lagoa dos Patos

Espécies	n*	Pescados positivos para <i>V. parahaemolyticus</i>		
		Fígado	Guelras	Total (%)
Tainha (<i>Mugil platanus</i>)	10	2	2	4 (40)
Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	10	0	0	0 (0)
Linguado (<i>Paralichthys orbignyanus</i>)	20	2	2	4 (20)
Bagre (<i>Genidens barbatus</i>)	3	0	0	0 (0)
Camarão (<i>Farfantepenaeus paulensis</i>)	13	-	-	6 (46,15)
Total	56			14 (25)

*: Número de amostras

V. parahaemolyticus foi isolado de quase 50 % das amostras de camarão, o que vai de encontro ao trabalho de Melo et al⁹, que isolou o micro-organismo de 20 % de 50 amostras de outra espécie de camarão (*Litopenaeus vannamei*) coletadas em supermercados de Natal, RN. Chen et al¹⁰, em um estudo com 112 amostras de atum coletados no comércio varejista em São Paulo/SP, encontraram três amostras positivas (2,68 %) para *V. parahaemolyticus*, diferentemente do nosso trabalho onde foram observadas 18,6 % de amostras de peixes contaminadas com o micro-organismo.

Todos os pescados analisados eram provenientes da Lagoa dos Patos, que troca água com o Oceano Atlântico através de um canal com 20 km de comprimento e 0,5 a 3 km de largura¹¹, o qual, durante os meses de verão, permite a entrada de água salgada na lagoa¹². No presente trabalho, *V. parahaemolyticus* foi isolado em todas as épocas do ano, sendo o verão a estação em que ocorreu com maior frequência (Figura 1). Este fato possivelmente possa ser justificado devido à temperatura ambiental, já que *V. parahaemolyticus* é encontrado mais comumente em climas tropical e temperado¹³.

Ramos et al¹⁴ pesquisaram *Vibrio parahaemolyticus* em 60 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) em Santa Catarina,

encontrando o micro-organismo em 35 % das mesmas. Apesar de não haveramos coletado essa espécie de pescado em nosso trabalho, esse resultado comprova a presença de *Vibrio parahaemolyticus* no sul do Brasil.

Torres e Fernandez¹⁵ estudaram 57 amostras de frutos do mar (ostras frescas, peixes e camarões) coletadas durante um ano em Guadalajara, México, e observaram incidência de *V. parahaemolyticus* de 45,6 %, sendo 71,4 % em peixes, 44 % em ostras e 27,6 % em camarão. Os resultados obtidos no nosso trabalho foram semelhantes em relação à quantidade de *V. parahaemolyticus* isolados de camarão, mas com relação ao isolamento em peixes o percentual encontrado foi inferior. Isso possivelmente possa ser explicado pela diferença das regiões de origem dos pescados.

CONCLUSÃO

Os pescados das espécies *Mugil platanus*, *Paralichthys orbignyanus* e *Farfantepenaeus paulensis*, oriundos no estuário da Lagoa dos Patos, podem albergar *V. parahaemolyticus*. Estes resultados servem de alerta para a necessidade de maior fiscalização na produção de pescados, bem como da adoção de medidas higiênico-sanitárias que previnam o risco de transmissão deste patógeno para os consumidores.

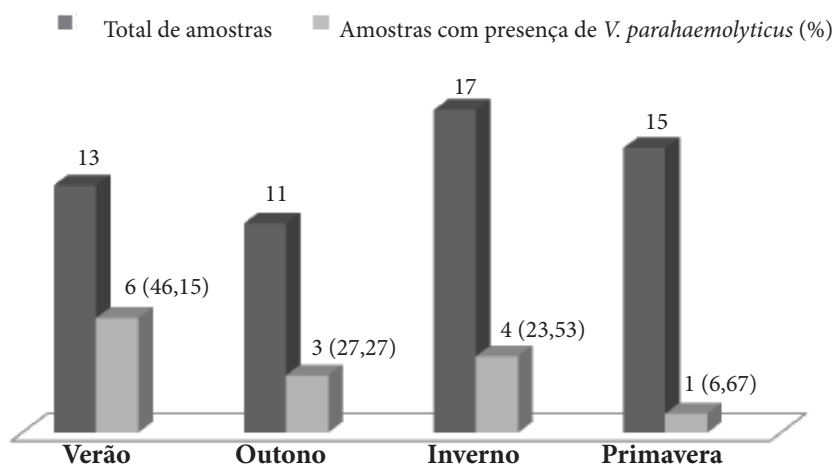


Figura 1. Relação da estação do ano com a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em pescados capturados no ambiente estuarino da Lagoa dos Patos

REFERÊNCIAS

1. Heitmann IG, Jofre LM, Hormazabal OJC, Olea A, Vallebuona C, Valdes C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev Chil Infectol*.2005;22(2):131-40. [DOI: 10.4067/S0716-10182005000200003].
2. Reis EG. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: História e administração pesqueira. *In*: Alves FN. Por uma história multidisciplinar do Rio Grande. Rio Grande: FURG; 1999. p.81-4.
3. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. Desembarque de pescados no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: CEPERG/Ibama; 2002.
4. Leal LCN, Bemvenuti AM. Levantamento e caracterização dos peixes mais freqüentes no mercado público do Rio Grande. *Cad Ecol Aquat*.2006;1(1):45-61.
5. Möller O, Fernandes E. Hidrologia e hidrodinâmica. *In*: Seeliger U, Odebrecht C. (Ed.). O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. Rio Grande: FURG; 2010.
6. Kaysner CA, Depaola J. *Vibrio*.U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM). [Internet]. [acesso em 27 out 2014]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>].
7. Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
8. Bilung ML, Radu S, Bahaman RA, Rahim AR, Napis S. Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadarageanosa*). *Am J Immunol*.2005;1:31-6. [DOI: 10.3844/ajisp.2005.31.36].
9. Melo LMR, Almeida D, Hofer E, Reis CME, Theophilo GND, Santos AFM et al. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2011;42(4):1463-9. [DOI: 10.1590/S1517-83822011000400032].
10. Chen J, Balian SC, Telles EO. *Vibrio parahaemolyticus* in tuna (*Thunnus* spp.) traded in the city of São Paulo. *Vet Zootec*.2005;12:89-95.
11. Bonilha LE, Asmus ML. Modelo ecológico do fitoplâncton e zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Publ ACIESP*.1994;87(1):347-62.
12. Anacleto EI, Gomes EAT. Relações tróficas no plâncton em um ambiente estuarino tropical: Lagoa dos Patos (RS), Brasil. *Saúde Amb Rev*.2006;1(2):26-39.
13. Magalhães V, Lima RA, Tateno S, Magalhães M. Human gastroenteritis associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Recife, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*.1991;33:64-8.
14. Ramos RJ, Miotto LA, Miotto M, Junior NS, Cirolini A, Silva HS, et al. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and Waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. *Rev Soc Bras Med Trop*.2014;47(3):327-33. [DOI: 10.1590/0037-8682-0069-2014].
15. Torres MR, Fernandez E. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in rawfish, oysters and shrimp. *Rev Latinoam Microbiol*.1993;35(3):267-72.