



NORMA TÉCNICA

L5.405

Dez/1991
29 PÁGINAS

Vibrio parahaemolyticus: isolamento e identificação em amostras de águas marinhas - método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	<p style="text-align: center;">VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ÁGUAS MARINHAS</p> <p style="text-align: center;">Método de ensaio</p>	<p style="text-align: center;">L5.405</p> <p style="text-align: center;">Dez/91</p>
--------	--	---

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Documentos Complementares.....	2
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	3
5 Reagentes.....	7
6 Execução do ensaio.....	17
7 Resultados.....	26
Anexo A - Informações complementares.....	27
Anexo B - Referências bibliográficas.....	28

INTRODUÇÃO

O reconhecimento do potencial patogênico de bactérias do gênero Vibrio, outros que Vibrio cholerae, tem se ampliado nos últimos anos e, o primeiro dos vibrios não coléricos admitido como patógeno humano foi o Vibrio parahaemolyticus. Surtos de gastroenterite causados pelo consumo de alimentos marinhos têm sido descritos no Japão desde a década de 50, e estão associados a esse agente etiológico.

Estudos epidemiológicos estabeleceram Vibrio parahaemolyticus como um agente importante de gastroenterite, que está amplamente distribuído pelo mundo. Estudos ecológicos demonstram que essas bactérias são autóctones em águas marinhas e podem ser isoladas de alimentos marinhos, bem como em águas costeiras e estuarinas, neríticas, salobras e, mais recentemente, também de águas doces na Índia. O isolamento destas bactérias do meio ambiente em regiões temperadas está relacionado com a temperatura da água, enquanto que o isolamento em águas tropicais parece estar relacionado à estação (chuvosa ou seca) e com a salinidade.

A transmissão se dá através da ingestão de alimentos marinhos contaminados, geralmente crus ou mal cozidos. Os sintomas incluem diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos e febre e, em casos graves, presença de sangue e muco nas fezes diarréicas. Infecções extra-intestinais, apesar de raras, podem ocorrer, sendo a via de entrada principal feridas na pele. Nestes casos, o modo de transmissão ocorre sempre após exposição a ambientes marinhos aquáticos ou após manipulação de alimentos marinhos contaminados.

O mecanismo pelo qual o Vibrio parahaemolyticus causa gastroenterite em humanos ainda não é claro. Uma característica importante dos mecanismos de patogenicidade, embora variável, é a presença de uma hemolisina, que produz β -hemólise em placas de ágar sangue, conhecida como fenômeno Kanagawa (KP). A reação de Kanagawa nas cepas provenientes de amostras ambientais é predominantemente negativa, enquanto os isolados clínicos são positivos; na sua maioria gerando assim uma questão aparentemente inexplicável da relação entre KP, patogenicidade do organismo e reservatório natural. A predominância de cepas KP positivas em amostras clínicas deve-se provavelmente à multiplicação seletiva das poucas culturas deste tipo do ambiente aquático no intestino humano durante a infecção, devido a pressão seletiva. Realmente, cepas de Vibrio parahaemolyticus KP positiva crescem melhor a 37°C em ambientes ácidos, enquanto a sobrevivência das culturas KP negativa é melhor a 25°C. Tendo em vista a importância de Vibrio parahaemolyticus como patógeno intestinal, é recomendada sua pesquisa em águas marinhas destinadas à criação de animais marinhos, já que se tratam de bactérias autóctones desses ambientes e têm como principal veículo de transmissão ao homem alimentos marinhos contaminados.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método qualitativo para a detecção do Vibrio parahaemolyticus em amostras de águas marinhas, com a finalidade de:

- a) controlar a qualidade da água em áreas de exploração e criação de mariscos e ostras;
- b) avaliar a contaminação microbiológica de bivalvos;
- c) estabelecer programas de vigilância epidemiológica, quanto à possível ocorrência de infecções intestinais resultantes da ingestão de bivalvos contaminados;
- d) obter dados mais completos sobre determinadas fontes de poluição em áreas específicas e relacionar com os inquéritos epidemiológicos.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização em materiais de laboratório de microbiologia.
- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.
- CETESB - Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.5.

3.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Bacilos Gram-negativos, retos, algumas vezes encurvados com extremidades arredondadas, com 0,5 a 0,8 μm de diâmetro por 1,4 a 1,6 μm de comprimento. Anaeróbios facultativos, móveis por um flagelo polar, não produzem H_2S e são oxidase positivos. Fermentam a glicose sem produção de gás e não produzem acetona (VP negativos). Fermentam a galactose, levulose, maltose, manitol, manose, ribose e trealose, mas não fermentam adonitol, dulcitol, eritritol, inositol, lactose, melibiose, rafinose, ramnose, salicina, sacarose, sorbitol, sorbose e xilose. Descarboxilam a lisina e ornitina e são arginina hidrolase negativa. Reduzem nitrato a nitrito, produzem gelatinase, quitinase, amilase, lecitinase e indol, crescem a 40°C e toleram alcalinidade elevada (pH = 9,2). Utilizam L-leucina, etanol e putrescina como únicas fontes de carbono. São halofílicos, mas crescem somente em concentrações de até 7% de NaCl.

3.2 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica ou em bastonete.

3.3 Bactérias anaeróbicas facultativas

Bactérias que crescem tanto na presença como na ausência de oxigênio livre.

3.4 Halófilo

Microrganismo cujo crescimento é dependente de altas concentrações salinas.

3.5 Toxinfecção alimentar

Termo aplicado a enfermidades produzidas por microrganismos e inclui tanto enfermidades causadas pela ingestão de toxinas elaboradas pelos microrganismos, como aquelas devidas à infecção do homem através do trato intestinal.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.¹

¹ As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; devem ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento.

4.1.2 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de 55°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.²

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana,³ cuja condutividade deve ser inferior a 2 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ a 25°C e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa (1,05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²) produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara e a operação total desse equipamento deve durar no máximo uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.⁴

4.1.4.2 Estufa de esterilização

Deve manter a temperatura de 170 \pm 10°C durante o período de esterilização (mínimo de 2 horas).

4.1.5 Equipamento para concentração em membrana filtrante

4.1.5.1 Vasilhame de pressão

De aço inoxidável, com capacidade para 5 a 10 litros.

4.1.5.2 Porta-filtro

De aço inoxidável, com diâmetro de 142 mm de diâmetro.

4.1.5.3 Mangueiras de borracha

Com parede espessa, resistentes à pressão.

² Devem ser feitos registros contínuos e periódicos de temperatura e os termômetros usados devem ser graduados com intervalo de escala de 0,1°C. As estantes a serem colocadas no banho-maria devem ser de aço inoxidável ou aço galvanizado.

³ A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1 000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal (Norma CETESB L5.215).

⁴ O controle da eficiência da autoclave é feito utilizando-se ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as entre os frascos ou materiais a serem esterilizados. Estas ampolas depois da autoclavação são incubadas em banho-maria a 55°C durante 24-48 horas. Se houver mudança de coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

4.1.5.4 Fonte de vácuo e pressão

Bomba de vácuo e pressão ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de 147,1 kPa.

4.1.6 Incubadora bacteriológica termostaticada

Deve manter a temperatura na faixa de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa entre 75 e 85%.⁵

4.1.7 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH = 4,0, pH = 6,86 ou pH = 9,18).

4.1.8 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 10°C .

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, com capacidade adequada para o preparo de meios de cultura.

4.2.2 Frascos para coleta de amostras

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 5 litros, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.3 Frascos de Erlenmeyer

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, com capacidade de 250 mL.

4.2.4 Frascos para solução fisiológica

De borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis.

4.2.5 Pipetas

Devem ser de borossilicato ("pyrex"), tipo Mohr, para 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 25%, com bocal para tampão de algodão.

4.2.6 Pipetas Pasteur

4.2.7 Placas de Petri de vidro

Devem ser de borossilicato ("pyrex") ou vidro neutro de boa qualidade, com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

⁵ A verificação da temperatura deve ser feita periodicamente (mínimo de 2 vezes ao dia) através de termômetros (com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral) colocados em pontos representativos da incubadora, sendo aconselhável também a colocação de um termômetro de máxima e mínima na parte central da mesma. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

4.2.8 Tubos de ensaio

De borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade adequada para conter o meio de cultura e o inóculo da amostra.

Nota: Usualmente são empregados tubos de ensaio de 18 x 180 mm, 16 x 150 mm e de 12 x 120 mm.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 70 a 80 mm de comprimento, com uma alça de 3 mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).

4.3.2 Bico de Bunsen ou similar

Deve ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

4.3.3 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.4 Estantes

De tamanho adequado para colocação dos tubos de ensaio empregados na análise.

4.3.5 Estojo para pipetas

Usar, para acondicionamento e esterilização das pipetas, estojos de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado. Opcionalmente, as pipetas podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft para esterilização.

4.3.6 Membranas de éster de celulose

Mistura de nitrato e acetato de celulose, com porosidade de 0,22 μm e 0,45 μm (previamente esterilizadas ou autoclaváveis). Devem ser de boa qualidade, apresentar retenção total de bactérias e velocidade de filtração satisfatória.

4.3.7 Papel alumínio

4.3.8 Papel Kraft

4.3.9 Pinças

De aço inoxidável, com extremidades arredondadas.

4.3.10 Pipetador de segurança ou pera de sucção

4.3.11 Tela de amianto

4.3.12 Termômetros

4.3.13 Tesoura

De aço inoxidável, com ponta fina.

4.3.14 Tripé

5 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

5.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções utilizados nes te ensaio, os reagentes necessários são os seguintes:

5.1.1 Reagentes

- Ácido ascórbico p.a.;
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA);
- Ácido ortofosfórico p.a.;
- Ágar;
- Água destilada;
- Álcool etílico absoluto p.a.;
- Alfa-naftol;
- Azul de bromotimol;
- Azul de timol;
- Bile de boi desidratada;
- Citrato férrico;
- Citrato de sódio p.a.;
- Cloreto de amônia p.a.;
- Cloreto de magnésio p.a.;
- Cloreto de sódio p.a.;
- Cloridrato de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina p.a.;
- Cristal-violeta;
- Eritrócitos humanos ou de coelho;
- Extrato de carne;
- Extrato de levedura;
- Fosfato de potássio dibásico p.a.;
- Fosfato de potássio monobásico p.a.;
- Glicose (dextrose) p.a.;
- Hidróxido de potássio p.a.;
- Hipoclorito de sódio;
- L-arginina;
- L-leucina;
- L-lisina;
- L-ornitina;
- Lactose p.a.;
- Manitol p.a.;

- Nitrato de amônia p.a.;
- p-dimetilamino benzaldeído p.a.;
- Peptona;
- Peptona de soja;
- Piridoxal;
- Proteose peptona;
- Púrpura de bromocresol;
- Putrescina;
- Sacarose p.a.;
- Sulfato ferroso p.a.;
- Sulfato de magnésio p.a.;
- Sulfato de potássio p.a.;
- Sulfato de sódio p.a.;
- Tiosulfato de sódio p.a.;
- Triptona;
- Vaselina líquida;
- Vermelho de cresol;
- Vermelho de fenol.

5.1.2 Meios de cultura desidratados⁶

- Ágar Kligler com ferro ("Kligler Iron Agar");
- Ágar TCBS ("TCBS Agar");
- Base de Moeller para descarboxilase ("Decarboxylase Base Moeller").
- Meio basal para oxidação e fermentação ("OF Basal Medium").
- Meio para prova de Voges-Proskauer ("MP-VP Medium");
- Caldo triptona de soja ("Tryptic soy broth").

5.2 Preparo dos meios de cultura

5.2.1 Água peptonada alcalina (concentração dupla)

Fórmula:

Peptona.....	20,0 g
Cloreto de sódio.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 8,8 ± 0,2 a 25°C	

⁶ Para o preparo dos meios de cultura, dá-se preferência à utilização de meios de cultura desidratados, de procedência idônea, visando maior uniformidade dos mesmos. Pode-se, no entanto, prepará-los no laboratório, sendo que os reagentes a serem utilizados devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar cor, odor e consistência inalterada, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos e outros carboidratos fermentáveis, que não os em testes, e fornecer os nutrientes necessários para os organismos pesquisados. Os frascos de meio de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens e mantidos em local fresco e seco, protegidos da luz.

Preparo:

Pesar a peptona e o cloreto de sódio e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando o cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir assepticamente volumes de 100 mL em erlenmeyers com capacidade de 250 mL previamente esterilizados. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.⁷

5.2.2 Ágar TCBS (Ágar tiosulfato, citrato, sais biliares e sacarose)Fórmula:

Extrato de levedura.....	5,0 g
Peptona proteose.....	10,0 g
Citrato de sódio.....	10,0 g
Tiosulfato de sódio anidro.....	10,0 g
Bile de boi desidratada.....	8,0 g
Sacarose.....	20,0 g
Cloreto de sódio.....	10,0 g
Citrato férrico.....	1,0 g
Azul de bromotimol.....	0,04 g
Azul de timol.....	0,04 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 8,6 ± 0,2 a 25°C	
NÃO AUTOCLAVAR	

Preparo:

Pesar 89,0 g do meio desidratado "TCBS Ágar" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas contendo o meio de ágar TCBS devem ser armazenadas sob refrigeração.

5.2.3 Ágar Kligler com ferro com 3% NaCl

⁷ A esterilização de soluções ou de meios de cultura em autoclave deve ser feita em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

Fórmula:

Extrato de carne.....	3,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Peptona.....	15,0 g
Proteose peptona.....	5,0 g
Lactose.....	10,0 g
Glicose.....	1,0 g
Sulfato ferroso.....	0,2 g
Cloreto de sódio.....	30,0 g
Tiossulfato de sódio anidro.....	0,3 g
Vermelho de fenol.....	0,024 g
Ágar.....	12,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C

Preparo:

Pesar 55,0 g do meio desidratado "Kligler Iron Agar" e 25,0 g de cloreto de sódio. Acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso por aproximadamente 15 minutos. Aquecer agitando frequentemente até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm. Tamponar com algodão hidrófilo e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após esterilização e enquanto o meio estiver quente, impregnar o tampão com reativo para indol (ver 5.3.1). Deixar esfriar, inclinando de tal maneira que a base seja aproximadamente 1/3 da altura do ápice. Armazenar sob refrigeração.

5.2.4 Ágar nutriente modificado (ágar conservação) com 3% de NaClFórmula:

Extrato de carne.....	4,0 g
Peptona.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	30,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes

6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm. Tamponar com algodão hidrófilo e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após esterilização e enquanto o meio estiver ainda quente, colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

5.2.5 Meio para verificar a atividade das descarboxilases (Base de Moeller para descarboxilase) com 3% de NaCl

Fórmula:

Peptona.....	5,0 g
Extrato de carne.....	5,0 g
Glicose.....	0,5 g
Púrpura de bromocresol.....	0,01 g
Vermelho de cresol.....	0,005 g
Piridoxal.....	0,005 g
Cloreto de sódio.....	30,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 6,0 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar 10,5 g do meio desidratado "Decarboxylase Base Moeller" e 30,0 g de cloreto de sódio. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Dividir o meio em 3 porções de 300 mL e uma quarta porção de 100 mL. À primeira porção adicionar 3,0 g de L-lisina. À segunda porção, 3,0 g de L-arginina e à terceira porção, 3,0 g de L-ornitina (concentração final dos aminoácidos de 1%). A quarta porção funcionará como controle e, portanto, não receberá nenhum aminoácido. Não é necessário o ajuste de pH para a lisina e arginina. Para a ornitina que é altamente ácida, ajustar o pH 6,0 ± 0,2 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N). Distribuir volumes de 3 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração (2-8°C).

5.2.6 Meio de OF para oxidação e fermentação com 3% de NaCl

Fórmula:

Triptona.....	2,0 g
Cloreto de sódio.....	30,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro.....	0,3 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Ágar.....	2,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar 9,4 g do meio desidratado "OF Basal Medium" e 25,0 g de cloreto de sódio. Acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em reposo durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüente mente até a completa fusão do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 100 mL em balões de 250 mL e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar à temperatura de 50°C e adicionar para 100 mL do meio estéril, 10 mL de uma solução do açúcar a ser testado a 10%. Homogeneizar e distribuir volumes de 3 a 4 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm estéril, tamponados com algodão cardado. Conservar os tubos em posição vertical até que o meio se solidifique.

Nota: A solução de açúcar deve ser esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm estéril.⁸

5.2.7 Meio para a prova de Voges-Proskauer (VP) com 3% de NaClFórmula:

Peptona.....	7,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro.....	5,0 g
Glicose.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	30,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar 17,0 g do meio desidratado "MR-VP Medium" e 30,0 g de cloreto de sódio. Acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 5 mL em tubos de ensaio de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração (2 a 8°C).

5.2.8 Meio de crescimento com uma única fonte de carbono5.2.8.1 Solução A

⁸ A filtração de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábeis é feita com vácuo, usando-se membrana de éster de celulose com porosidade de 0,22 µm. Todos os materiais e equipamentos utilizados para filtração devem ser esterilizados previamente por autoclavação a 121°C durante 15 minutos.

Fórmula:

Cloreto de amônia.....	5,0 g
Nitrato de amônia.....	1,0 g
Sulfato de potássio.....	3,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro.....	3,0 g
Fosfato de potássio monobásico anidro.....	1,0 g
Cloreto de sódio.....	10,0 g
Água destilada.....	800,0 mL

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 800 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Tampar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Resfriar a 50°C.

5.2.8.2 Solução BFórmula:

Sulfato de magnésio hepta-hidratado.....	0,1 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado.....	4,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	200,0 mL

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 200,0 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Tampar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Resfriar a 50°C.

5.2.8.3 Preparo final do meio de crescimento com uma única fonte de carbono

Misturar as soluções A e B assepticamente e então distribuir o meio em 4 porções. Às 3 primeiras, adicionar separadamente soluções de L-leucina, putrescina e etanol em concentração final de 0,1%. A última funcionará como controle e não receberá nenhuma fonte de carbono. Distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas contendo os meios devem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C).

5.2.9 Ágar Wagatsuma

Fórmula:

Peptona.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	70,0 g
Manitol.....	10,0 g
Cristal violeta.....	0,001 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1 000,0 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 8,0. Resfriar a 50°C. Lavar eritrócitos humanos ou de coelho em solução fisiológica por 3 vezes. Reconstituir no volume de sangue original. Adicionar 2,0 mL dos eritrócitos lavados a 1 000 mL do meio esterilizado, a 50°C. Distribuir volumes de 12 a 15 mL em placas de Petri de 15 x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas contendo o ágar Wagatsuma devem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C).

5.2.10 Caldo triptonadoFórmula:

Triptona.....	10,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 6,9 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar a triptona e acrescentar 1 000,0 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 3 mL em tubos de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

5.2.11 Caldo T₁N₂Fórmula:

Triptona.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1 000,0 mL de água destilada fria.

Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 3 mL em tubos de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

5.2.12 Caldo triptona de soja com 3% NaCl

Fórmula:

Triptona.....	17,0 g
Soitona.....	3,0 g
Cloreto de sódio.....	30,0 g
Fosfato de potássio dibásico.....	2,5 g
Glicose.....	2,5 g
Água destilada.....	1 000,0 mL
pH final: 7,3 ± 0,2 a 25°C	

Preparo:

Pesar 30,0 g do meio desidratado "Tryptic soy broth" e 25,0 g de cloreto de sódio. Acrescentar 1 000,0 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 3 mL em tubos de 12 x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

5.3 Soluções⁹

5.3.1 Reativo para indol

Fórmula:

p-dimetilamino benzaldeído.....	1,0 g
Ácido ortofosfórico.....	20,0 g
Álcool etílico absoluto.....	50,0 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar o p-dimetilamino benzaldeído e acrescentar 50 mL de álcool etílico absoluto. Adicionar o ácido ortofosfórico à água e juntar o p-dimetilamino benzaldeído, dissolvido em álcool. Colocar em vidro com tampa esmerilhada ou de rosca. Para aplicação do reativo para indol no tampão de algodão devem ser observados os seguintes itens:

- Colocar aproximadamente 10 mL do reativo em uma placa de Petri esteril. mantida em posição inclinada, contendo papel de filtro esteril

⁹ As soluções são estocadas em geladeira (2 a 8°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolha de borracha ou tampa com rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a consequente absorção de substâncias, tais como a formalina e a amônia. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frasco de vidro por muito tempo, pois estes frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são posteriormente encontrados nessas soluções.

lizado no fundo.

- b) Não embeber o tampão de algodão diretamente no reativo, mas apenas tocar levemente no papel de filtro.
- c) Trabalhar rapidamente, com assepsia, de preferência em ambiente es téril.

5.3.2 Reagente para o teste de oxidase

Fórmula:

Cloridrato de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina...	1,0 g
Água destilada.....	100 mL

Preparo:

Pesar 1,0 g de cloridrato de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina, acrescentar 100 mL de água recém-destilada, homogeneizando bem até a completa dissolução do reagente. Guardar a solução em frasco âmbar, em geladeira (2 a 8°C), durante no máximo 2 dias.

Nota: A adição de ácido ascórbico a essa solução (na concentração de 0,1%) retarda a auto-oxidação do reagente.

5.3.3 Solução fisiológica

Fórmula:

Cloreto de sódio.....	8,5 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 8,5 g de cloreto de sódio e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Homogeneizar bem até completa dissolução do cloreto de sódio. Distribuir volumes de aproximadamente 50 mL em frascos de borossilicato ou vidro neutro. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente.

5.3.4 Reagentes para prova de VP

5.3.4.1 Solução de alfa-naftol a 5%

Fórmula:

Alfa-naftol.....	5,0 g
Álcool etílico absoluto.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 5 g de alfa-naftol e diluir em 100 mL de álcool etílico absoluto. Preparar a solução no dia do uso.

5.3.4.2 Solução de hidróxido de potássio a 40%

Fórmula:

Hidróxido de potássio.....	40,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de potássio e diluir em 100 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado ao abrigo da luz.

5.3.5 Solução de tiosulfato de sódio a 1,8%Fórmula:

Tiosulfato de sódio anidro.....	18,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 18 g de tiosulfato de sódio e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado.

5.3.6 Solução de EDTA a 15%Fórmula:

EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).....	150,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Ajustar o pH para 6,5. Armazenar em frasco bem vedado.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO6.1 Princípio do método

O método baseia-se na concentração de volumes representativos de amostras de águas marinhas através da técnica de membrana filtrante. As amostras são posteriormente submetidas a enriquecimento em água peptonada alcalina, para favorecer o crescimento do Vibrio parahaemolyticus. As colônias típicas, isoladas em placas contendo o meio ágar seletivo TCBS são confirmadas através de testes de triagem e provas bioquímicas.

6.2 Reações6.2.1 Água peptonada alcalina

Meio líquido utilizado para o enriquecimento de Vibrio parahaemolyticus, onde o pH alcalino (8,6) favorece o desenvolvimento rápido do Vibrio e inibe o crescimento de outras bactérias. O período de incubação não deve ser longo (12 a 15 horas), para que não haja predominância de outros microrganismos.

6.2.2 Ágar TCBS (ágar tiosulfato citrato sais biliares e citrato)

Meio seletivo diferencial largamente utilizado para o isolamento de Vibrio parahaemolyticus e outros vibrios patogênicos. O Vibrio parahaemolyticus não utiliza a sacarose e seu metabolismo nesse meio é essencialmente proteolítico, resultando na formação de produtos finais alcalinos, produzindo colônias verde-azuladas devido a viragem dos indicadores de pH, azul de timol e bromotimol. Os sais biliares incorporados no meio atuam na inibição do crescimento da maioria das bactérias gram positivas. O citrato de sódio retarda o desenvolvimento dos microrganismos gram positivos e serve para restringir alguns organismos gram negativos que são incapazes de utilizar citrato de sódio inorgânico como fonte de carbono. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a diferenciação dos vibriões das bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S).

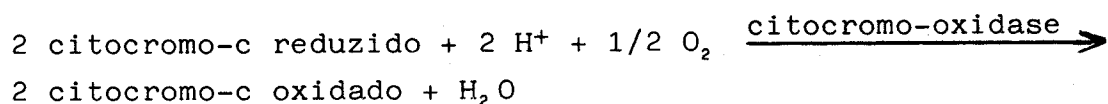
6.2.3 Ágar Kligler com ferro (Kligler Iron Agar)

- a) glicose (dextrose) - o V. parahaemolyticus fermenta a glicose, com produção de ácido, o que determina o aparecimento da coloração amarela no meio, decorrente da viragem do indicador de pH. Na superfície do meio, no entanto, a proliferação é muito abundante e a acidez resultante da fermentação da glicose é neutralizada pelos produtos do metabolismo proteico, o que determina o aparecimento da coloração vermelha. Na base do meio, onde o crescimento é menor em relação à superfície, os produtos do metabolismo proteico não são suficientes para neutralizar a acidez, permanecendo a coloração amarelada do meio;
- b) lactose - o V. parahaemolyticus não fermenta a lactose, permanecendo inalterado o ápice do meio (coloração vermelha);
- c) sulfeto de hidrogênio (H₂S) - o V. parahaemolyticus é incapaz de reduzir o tiosulfato a sulfeto de hidrogênio, portanto, não haverá formação de sulfeto férrico, resultante da combinação do íon ferro presente no sulfato ferroso com o sulfeto de hidrogênio, responsável pelo enegrecimento do meio;
- d) gás - o V. parahaemolyticus não produz gás; portanto, não apresentará nenhuma formação de bolhas no meio;
- e) indol - V. parahaemolyticus produz enzima triptofanase, sendo portanto capaz de degradar o aminoácido heterocíclico triptofano e formar o indol. A formação do indol é verificada pela presença da cor vermelha nos tampões do meio Kligler que

contém o reativo p-dimetilaminobenzaldeído.

6.2.4 Oxidase

O V. parahaemolyticus possui a enzima citocromo-oxidase, necessária para a oxidação do citocromo-c na cadeia respiratória, segundo a seguinte reação:



No teste de oxidase, o citocromo-c em sua forma oxidada, catalisa a oxidação do tetrametil-p-fenilenodiamina, formando-se uma substância de coloração azul.

6.3 Amostragem

Os locais de coleta de amostras devem ser estabelecidos em regiões de águas marinhas, principalmente naquelas em que haja criação de moluscos bivalvos e também nos locais de despejos de esgoto próximos às regiões de criação destes animais. Quando há suspeita de contaminação que possa levar a surtos epidêmicos, devem ser amostrados pontos de água de abastecimento.

6.4 Técnicas de coleta

Basicamente, as amostras para pesquisa de V. parahaemolyticus são obtidas pela coleta de amostras líquidas.

6.4.1 Coleta de amostras líquidas

A coleta de amostras de água deve ser realizada segundo o Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB/SEMA-1988).

6.4.1.1 Agente neutralizador do cloro residual

Para a coleta de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiosulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiosulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

6.4.1.2 Agentes quelantes

Para a coleta de amostras de águas poluídas e de esgoto, suspeitas de conter concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

6.4.1.3 Transporte e conservação

Após a coleta, a amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a amostragem e o início do exame não deve exceder a 8 horas, sendo que o tempo limite não deve exceder a 24 horas.

6.4.1.4 Volume da amostra

O volume da amostra a ser coletada deve ser no mínimo de 5 litros.

6.5 Método de concentração através da técnica de membrana filtrante¹⁰

O método mais comumente utilizado para análise de V. parahaemolyticus é a técnica de membrana filtrante, que tem a vantagem de poder processar grandes volumes de água, principalmente para águas com baixa turbidez, aumentando a probabilidade de isolamento do Vibrio.

6.5.1 Dispor sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução de análise, a saber:

- a) vasilhame de pressão, conectado à bomba de pressão positiva;
- b) porta-filtro de 142 mm de diâmetro, previamente esterilizado, conectado ao vasilhame de pressão;
- c) membranas filtrantes estéreis com 142 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade;
- d) um erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de água peptonada alcalina de concentração;
- e) pinça e tesoura com as extremidades mergulhadas em álcool;
- f) bico de Bunsen.

¹⁰ O analista indicado para execução desta tarefa deve ser devidamente treinado e adequadamente protegido, de modo a evitar problemas de contaminação.

6.5.2 Preparo do porta-filtro

- a) retirar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça flambada e esfriada, colocar uma membrana filtrante estéril, centralizando-a sobre a parte inferior do porta-filtro;
- b) acoplar a parte superior do porta-filtro, tendo o cuidado para não danificar a membrana.

6.5.3 Filtração da amostra

Homogeneizar a amostra e verter cuidadosamente o volume a ser examinado no vasilhame de pressão. Fechar o vasilhame de pressão, ligar a bomba de pressão positiva e proceder à filtração, a uma pressão de 147,1 kPa. Desligar a bomba ao finalizar a operação. Abrir a válvula de segurança do vasilhame de pressão e do porta-filtro. Retirar a parte superior do porta-filtro, tendo cuidado para não danificar a membrana.

6.6 Enriquecimento, isolamento e identificação

6.6.1 Procedimento

- a) dobrar cuidadosamente a membrana com auxílio da pinça e tesoura, devidamente flambadas e esfriadas, e transferi-la para um erlenmeyer contendo 100 mL de água peptonada alcalina concentração dupla;
- b) incubar a 35-37°C, durante 18 a 20 horas.

6.6.2 Após o período de incubação, retirar cuidadosamente o erlenmeyer da incubadora, evitando agitação.

6.6.3 Com auxílio de uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, colher o material da superfície do meio de enriquecimento (APA)¹¹ e semear em duas placas de ágar TCBS, conforme descrito abaixo:

- a) depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa contendo o meio seletivo e diferencial TCBS, girar a placa e iniciar o espalhamento do inóculo na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando ferir o ágar (ver Figura 1);
- b) girar novamente a placa, flambar a alça de inoculação, esfriar e continuar o espalhamento no 2º quadrante a partir do inóculo do 1º quadrante (ver Figura 2);
- c) proceder desta maneira até completar a semeadura em toda a superfície do ágar, com a finalidade de obter isolamento completo no 4º quadrante (ver Figuras 3 e 4).

¹¹ O meio de cultura apresenta uma turvação homogênea, com ou sem película.

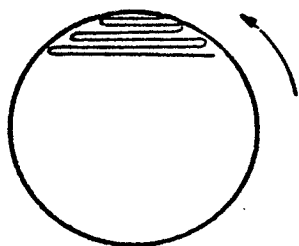


FIGURA 1

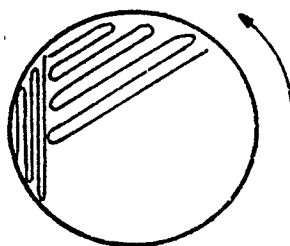


FIGURA 2

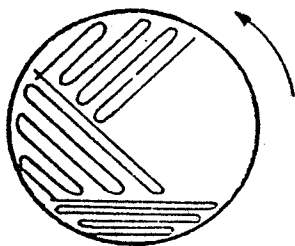


FIGURA 3

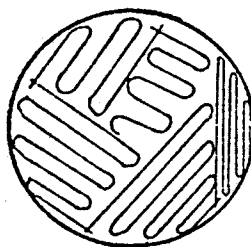


FIGURA 4

d) fechar e incubar a placa em posição invertida. a 35-37°C, num período de 18 a 24 horas.

6.6.4 Após 18-24 horas efetuar a leitura das placas de ágar TCBS se parando aquelas que apresentarem colônias típicas de V. parahaemolyticus (colônias verde azuladas e ligeiramente convexas).

6.6.5 Com todos os cuidados de assepsia e utilizando uma alça devidamente flambada e esfriada, selecionar do ágar TCBS 10 colônias verdes típicas de V. parahaemolyticus (sacarose negativa) e transferir para o meio de "Kligler Iron Agar" com 3% NaCl. A inoculação do meio de triagem é feita por picada em profundidade e estrias na superfície inclinada, e a incubação é realizada a 35-37°C durante 18 a 24 horas.

6.6.6 Após o período determinado de incubação efetuar a leitura dos resultados.

6.6.7 Leitura das características bioquímicas do V. parahaemolyticus no meio "Kligler Iron Agar".

a) ápice

- lactose negativa: evidenciada pela coloração vermelha no ápice do meio.

b) Base

- glicose positiva: evidenciada pela coloração amarela na base do meio.

- gás negativo: ausência de bolhas no meio.
- sulfeto de hidrogênio negativo (H₂S): ausência da cora
ção negra no meio.

c) Tampão de algodão com reativo de indol

- indol positivo: coloração vermelha no tampão.

6.6.8 Realizar o teste de oxidase apenas com as culturas que apresen
tarem reações características de V. parahaemolyticus no meio "Kligler
Iron Agar" e descartar os tubos restantes.

6.6.9 Pesquisa da oxidase: com uma agulha de inoculação de platina,
devidamente flambada e esfriada, retirar do meio de Kligler com 3% NaCl
um pequeno inóculo da cultura de 18 a 24 horas e tocar o papel de fil
tro embebido em solução de cloridrato de N, N, N', N', tetrametil-p-fe
nilenodiamina a 1%. A reação positiva é evidenciada pelo desenvolvimen
to de coloração púrpura intensa em aproximadamente 30 segundos. Se ne
nhuma ou discreta reação se desenvolver no período de dois minutos de
observação, considerar a prova como negativa.

6.6.10 Prosseguir com as culturas que apresentaram reação de oxidase
positiva e descartar as restantes.

6.6.11 A partir de cada cultura oxidase-positiva e, com auxílio de uma
agulha de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir do meio
de Kligler um inóculo do crescimento para um tubo contendo ágar conser
vação com 3% NaCl, previamente identificado. A inoculação é feita atra
vés de estria no ápice. Após a transferência, incubar os tubos de ágar
conservação a 35-37°C durante 18-24 horas.

6.6.12 Identificação bioquímica de *Vibrio parahaemolyticus*¹² (Tabela 1)

6.6.12.1 Teste para verificar a atividade das descarboxilases
(Descarboxilase Base Moeller)

Com uma alça de inoculação, devidamente flambada e esfriada, retirar
uma pequena quantidade do crescimento do ágar conservação de 18 a 24
horas e inocular em um tubo com meio para teste da lisina descarbo
xilase, um tubo para ornitina descarboxilase, outro tubo com o meio
para o teste da hidrólise da arginina e um quarto tubo contendo a base
sem nenhum aminoácido, funcionando como controle do teste. Acrescentar
a cada um dos tubos algumas gotas de vaselina líquida estéril, a fim de

¹² Em determinadas circunstâncias específicas se faz necessário uma identificação bioquímica mais com
pleta para a diferenciação do V. parahaemolyticus das demais espécies do gênero Vibrio sendo neste
caso utilizadas as provas bioquímicas recomendadas por Colweel, R.R. (1984) e Baumann et al (1984).

formar uma fina camada na superfície. Incubar a 35°C e observar diariamente durante 4 dias.

Efetuar a leitura considerando:

- descarboxilação da lisina: coloração roxa (alcalinização do meio) prova positiva;
- descarboxilação da ornitina: coloração roxa (alcalinização do meio) prova positiva;
- hidrólise da arginina: coloração amarela (acidificação do meio) prova negativa;
- controle: coloração amarela (ácida)- fermentação da glicose. O tubo controle deverá permanecer sempre ácido em todo o período de observação.

TABELA 1 - Provas bioquímicas para identificação de *V. parahaemolyticus*

Reações bioquímicas		<u>Vibrio parahaemolyticus</u>
descarboxilação	lisina	+
	ornitina	+
hidrólise arginina		-
sacarose (fermentação)		-
caldo triptonado com 0% NaCl		-
VP		-
única fonte de carbono	L-leucina	+
	etanol	+
	putrescina	+
Fenômeno Kanagawa		V

6.6.12.2 Teste para verificar a fermentação de carboidratos

Para o teste de fermentação, os tubos contendo o meio de Hugh & Leifson (OF) com sacarose (1%) são previamente aquecidos em banho-maria durante aproximadamente 10 minutos para remover o oxigênio existente em seu interior e esfriados rapidamente antes do uso. Inocular a cultura em teste pelo procedimento de picada em profundidade. Logo após a inoculação, acrescentar algumas gotas de vaselina líquida estéril a fim de formar uma camada de aproximadamente 5 mm sobre a superfície do meio.

Incubar a 35°C e observar diariamente durante 14 dias. Efetuar a leitura considerando:

- a) coloração amarela: fermentação do açúcar
- b) coloração verde: ausência de fermentação

6.6.12.3 Crescimento na ausência de NaCl

Inocular um tubo com caldo triptonado com a cultura em teste e incubar à 35-37°C durante 48 horas.

A ausência de crescimento no caldo sem cloreto de sódio indica tratar-se de um organismo halófilo.

6.6.12.4 Prova de Voges-Proskauer

Inocular um tubo com meio de "MR-VP" (Clark Lubs) com a cultura em teste e incubar a 35°C durante 24 horas. Transferir 1 mL da cultura para um tubo de ensaio. Adicionar 0,6 mL da solução alcoólica de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de uma solução de hidróxido de potássio a 40% agitando bem após a adição de cada solução. Efetuar a leitura considerando:

- a) coloração vermelha: produção de acetoína (positiva)
- b) coloração alaranjada ou amarela: não produção de acetoína (negativa)

Nota: realizar a leitura no período inferior a 5 minutos.

6.6.12.5 Teste para verificação de crescimento com uma única fonte de carbono

Inocular um tubo com caldo T₁N₂ com a cultura em teste e incubar a 35-37°C durante 6-8 horas.

Em cada uma das placas contendo as fontes de carbono (L-leucina, etanol e putrescina) e na placa sem fonte de carbono (que funcionará como controle), semear 2 µL na forma de "spots". Fechar e incubar as placas em posição invertida a 35-37°C e observar diariamente durante 7 dias.

Efetuar a leitura considerando crescimento nas placas que contêm as fontes de carbono (L-leucina, etanol e putrescina) e ausência de crescimento na placa controle.

Nota: Várias culturas podem ser testadas em uma mesma placa.

6.6.12.6 Teste para verificação de atividade hemolítica (fenômeno Kanagawa)

Inocular um tubo com caldo triptonato de soja com 3% NaCl com a cultura em teste e incubar a 35-37°C durante 18-20 horas. Semear 2 µL da cultura em ágar Wagatsuma, incubar a 35-37°C durante no máximo 24 horas.

O resultado positivo consiste em ocorrência de β-hemólise, que se caracteriza pela formação de um halo transparente ao redor do crescimento da colônia. Leituras realizadas após 24 horas devem ser descartadas.

Nota: Várias culturas podem ser testadas em uma mesma placa.

7 RESULTADO

O resultado final é emitido com base nas provas bioquímicas. Relatar o resultado como: ausência ou presença de Vibrio parahaemolyticus na amostra analisada.

Nota: O esquema de procedimento completo é apresentado na Figura 5.

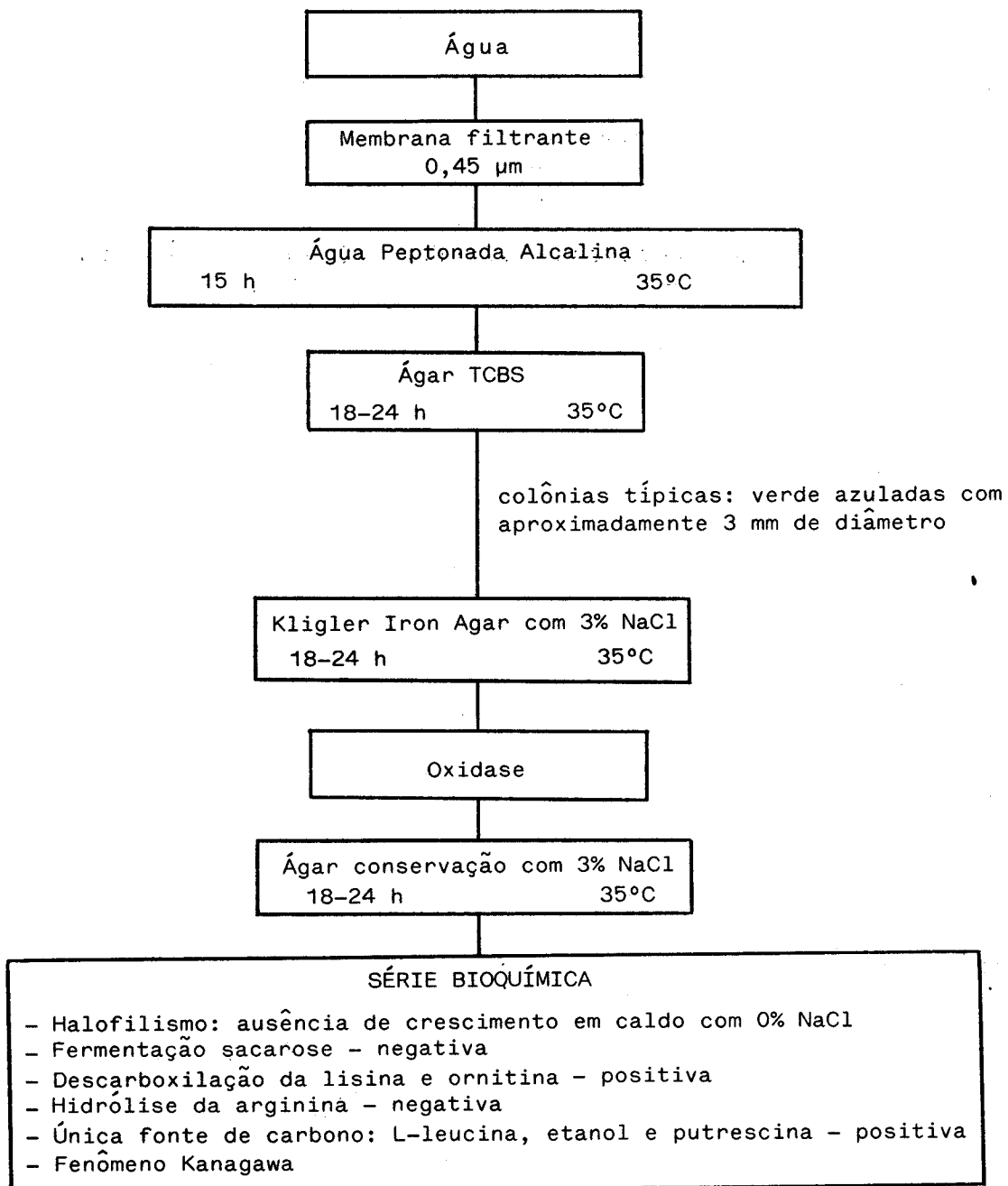


FIGURA 5 - Esquema de procedimento

ANEXO A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARESA-1 Seleção de meios de cultura para recuperação de *Vibrio parahaemolyticus*

A literatura cita o caldo GSTB como melhor meio de enriquecimento para *Vibrio parahaemolyticus* para amostras de alimentos e conseqüentemente foi utilizado para amostras de águas e moluscos. Atualmente, para amostras ambientais é preferível a utilização de Água Peptonada Alcalina, pois trata-se de um meio de enriquecimento adequado para recuperação de *Vibrio parahaemolyticus*, além de ser um meio de cultura de fácil preparo. (B-11, B-14). Em relação aos meios de cultura de triagem podem ser utilizados outros meios de triagem como: o meio Rugai e Lisina-motilidade (IAL), TSI, LIA, todos acrescidos de 3% de NaCl.

A-2 Realização de testes sorológicos

A identificação de *Vibrio parahaemolyticus* pode ser realizada através de testes sorológicos, a qual é comumente realizada pelos laboratórios de referência para *Vibrio parahaemolyticus* sendo utilizados os antissoros polivalentes *V. parahaemolyticus* somático (O) e capsular (K).

A-3 Controle de esterilidade das soluções e meios de cultura

Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura devem ser testados, quanto à presença de fungos ou de bactérias contaminantes.

A-4 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma CETESB M1.001.

A-5 Lavagem e esterilização do equipamento de filtração

(Vasilhame de pressão e porta-filtro) Ver Norma CETESB M1.001.

A-6 Desinfecção do equipamento de filtração (vasilhame de pressão, porta-filtro e mangueiras)

Após a concentração da amostra, fazer passar pelo sistema de filtração 5 L de uma solução de hipoclorito de sódio a 2% de cloro livre por litro e deixar esta solução em contato durante 1 hora. Esgotar então a solução de hipoclorito de sódio e fazer passar 5 L de uma solução de tiosulfato de sódio a 0,5% para neutralizar o cloro residual. A verificação desta neutralização é feita colocando, em um volume de 9,5 mL da água que sai do sistema, 0,5 mL de solução de ortotoluidina. A ausência de coloração na água indica que o cloro residual foi neutralizado. Esgotar então a solução de tiosulfato de sódio e fazer passar cerca de 5 litros de água destilada. Esgotar a água do sistema e vedar a entrada e saída das mangueiras com folha de alumínio.

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17ª ed, Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989, parte 9000.
- B-2 BLAKE, P.A.; WEAVER, R.E. & HOLLIS, D.G. Diseases of humans (other than cholera) caused by Vibrios. Ann.Rev. Microbiol., 34: 341-367, 1980.
- B-3 CETESB - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985 (Norma Técnica L5.215, 1ª revisão)
- B-4 CETESB - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de Microbiologia. São Paulo, 1986 (Norma Técnica M1.001, 1ª revisão).
- B-5 CETESB - Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216).
- B-6 CETESB - Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1988, 150p.
- B-7 CHOWDHURY, M.A.R.; YAMANAKA, H.; MIYOSHI, S. & SHINODA, S. Ecology and seasonal distribution of Vibrio parahaemolyticus in aquatic environments of a temperate region. FEMS Microbiol. Ecol., 74: 1-10, 1990.
- B-8 COLWELL, R.R.; WEST, P.A.; MANEVAL, D.; BEMMERS, E.F.; ELLIOT, EL. & CARLSON, N.E. Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay. In: COLWELL, R.R. Vibrios in the environment, New York, John Wiley & Sons, 1984, p. 367-387.
- B-9 De PAOLA, A.; HOPKINS, L.H.; PEELER, J.T.; WENTZ, B. & McPHEARSON, R.M. Incidence of Vibrio parahaemolyticus in U.S. Coastal Waters and Oysters. Appl. Environ. Microbiol., 56 (8): 2299-2302, 1990.
- B-10 DIFCO LABORATORIES Difco Manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10ª ed, Detroit, 1984, 115p.
- B-11 DUPRAY, E. & CORMIER, M. Optimal enrichment time for isolation of Vibrio parahaemolyticus from seafood. Appl. Environ. Microbiol., 46: 1234-1235, 1983.
- B-12 JOSEPH, S.W.; COLWELL, R.R. & KAPER, J.B. Vibrio parahaemolyticus and related halophilic vibrios. CRC Critical Reviews of Microbiology, 10: 77-124, 1982.

- B-13 MOLITORIS, E.; JOSEPH, S.W.; KRICHEVSKY, M.I.; SINDHUHARDIA, W. & COLWELL, R.R.- Characterization and distribution of Vibrio alginolyticus and Vibrio parahaemolyticus isolated in Indonesia. Appl. Environ. Microbiol., 50: 1388-1394, 1985.
- B-14 SHIARIS, M.P.; REX, A.C.; PETTIBONE, G.W.; KEAY, K.; McMANUS, P.; REX, M.A.; EBERSOLE, J. & GALLAGHER, E. Distribution of indicator bacteria and Vibrio parahaemolyticus in sewage-polluted intertidal sediments. Appl. Environ. Microbiol., 53 (8): 1756-1761, 1987.
- B-15 WATKINS, W.D. & CABELLI, V.J. Effect of fecal pollution on Vibrio parahaemolyticus densities in an estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol., 49(5): 1307-1313, 1985.
- B-16 WEST, P.A. The human pathogenic vibrios - a public health update with environmental perspectives. Epidem. Inf., 103: 1-34, 1989.
-