

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**ISOLAMENTO DE ENTEROCOCOS E COLIFORMES FECAIS DE OSTRAS
(*Crassostrea rhizophorae*) COMERCIALIZADAS NA PRAIA DO FUTURO,
FORTALEZA, CEARÁ**

ANA MÁRCIA DE FARIA MORELLI

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará

Fortaleza
2003

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho dessa dissertação será permitida, desde que seja de conformidade com as normas da ética científica.

Ana Márcia de Faria Morelli

Dissertação aprovada em 17/02/2003

Prof^a. Dr^a. REGINE SILVA DOS FERNANDES VIEIRA
Orientadora

Prof. Dr. GUSTAVO HITZSCHKY F. VIEIRA

Prof. Dr. EVERARDO ALBUQUERQUE MENEZES

A **DEUS**, que está presente em todos os momentos da minha vida me dando saúde, compreensão e força para buscar meus objetivos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais Jonas e Marisa pelo amor, compreensão e apoio em todas as horas difíceis, a minha mais profunda gratidão e agradecimento.

Aos meus irmãos Sandra, Gustavo e Andréa, por serem tão especiais na minha vida.

À minha sobrinha Giuliana, que me enche de alegria com seu amor.

Ào Magno, por seu carinho, companheirismo e grande ajuda prestada na elaboração deste trabalho durante este período.

À Dona Mirtes por ter sido uma segunda mãe durante esses 2 anos.

Ao professor Aduino Fonteles, pela contribuição no tratamento estatístico.

Aos professores Gustavo e Everardo que com simpatia aceitaram participar da banca de defesa desta dissertação.

À amiga Gardenny pela ajuda prestada durante minha ausência nos períodos de férias.

À querida Oscarina por todo conhecimento transmitido para que esse projeto pudesse ter sido realizado com êxito.

À Norma pela paciência e grande ajuda prestada na correção das referências bibliográficas.

À Regina por nunca negar esforços para ajudar em todos os momentos, demonstrando amizade e companheirismo.

As amigas do laboratório de Microbiologia do Pescado do Labomar que fazem com que o trabalho seja muito mais divertido e prazeroso: Isabel, Hilda, Susy, Elenice, Edite, Gleire, Cristiane, Leyla, Sandra, Daniele, Karla e Waleska.

Ao Ariel pela confecção do abstract.

Aos colegas de turma, em especial à Cristineide, pelo convívio e paciência durante a permanência em Fortaleza.

Aos professores e funcionários do Curso de Mestrado do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial, ao Paulo.

Ao LABOMAR, pelo uso de suas instalações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante os dois anos de curso.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação.

Protesto da ostra contra a poluição do mangue**Regine Limaverde**

Sou ostra e me orgulho da minha aparência.
Sou bivalve, guardo fortunas em jóias.
No oriente me têm para ostentar riquezas.
Visto princesas com parte do meu corpo
e realço belezas deitada no colo de mulheres bonitas.
Sou nobre no meu vestir
e dou de comer a muita gente.
No mangue sustento famílias,
mas estou triste.
Os homens estão em guerra contra mim.
Jogam detritos nas minhas terras,
metais pesados , sujeiras, lixo
e não querem que eu os coma.
Se vivo do que me cerca,
como posso mostrar limpeza?
Como posso ser limpa e sadia?
Não sou culpada se provoco doença
em criançinhas,
Não sou culpada se causo desconforto
em quem me aprecia.
A culpa é dos que não me respeitam.
A culpa é dos desavisados.
A culpa é do poluidor,
do desajustado, do mal informado.
Que não sabe que ele é
o maior prejudicado
o que ficará doente
o que sofrerá

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, que mesmo sem me conhecer, me aceitou em seu grupo, grande poeta, a quem devo meu aprendizado e desenvolvimento científico. Pela valiosa ajuda, e acima de tudo pela consideração e amizade a mim dedicadas, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1.	SURTOS E DOENÇAS MICROBIANAS	20
2.2.	RELAÇÃO COLIFORMES FECALIS/ <i>Enterococcus faecalis</i>	24
2.3.	<i>Escherichia coli</i>	25
2.3.1.	Habitat Natural	25
2.3.2.	Caracterização	26
2.3.3.	Taxonomia	26
2.3.4.	Significância Clínica	27
2.3.5.	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica	29
2.3.6.	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica	30
2.3.7.	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	31
2.3.8.	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágicas e outros sorogrupos	32
2.3.9.	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa	34
2.4.	<i>Enterococcus sp.</i>	34
2.4.1.	Caracterização	34
2.4.2.	Habitat Natural	35
2.4.3.	Taxonomia	37
2.4.4.	Patógenos Emergentes	38
2.4.5.	Significância Clínica	39
2.4.6.	Presença em Alimentos	41
2.4.7.	Bacteriocinas	43
3.	MATERIAL E MÉTODOS	46

3.1.	COLETA DAS AMOSTRAS	46
3.2.	DILUIÇÕES	46
3.3.	NMP DE COLIFORMES FECAIS OU TERMOTOLERANTES	47
3.3.1.	Prova Presuntiva	47
3.3.2.	Prova Confirmatória	48
3.3.3.	Prova Completa	48
3.3.4.	Provas Bioquímicas	49
3.4.	TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	51
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
3.6.	NMP DE <i>Enterococcus spp.</i>	54
3.6.1.	Prova Presuntiva	54
3.6.2.	Prova Confirmatória	55
3.6.3.	Isolamento e Identificação	55
3.6.4.	Produção de Bacteriocinas	60
4.	RESULTADOS	62
5.	DISCUSSÃO	73
6.	CONCLUSÕES	81
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	ANEXO 1	95
	ANEXO 2	96

LISTA DE TABELAS

- TABELA I - Número Mais Provável de coliformes fecais ou termotolerantes e enterococos no músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas em duas barracas da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. 65
- TABELA II Significância dos coeficientes de correlação parcial para os índices de indicadores de contaminação no músculo e líquido intervalvar das ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. 66
- TABELA III - Susceptibilidade a antibacterianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas do músculo e líquido intervalvar das ostras comercializadas na Barraca A , da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. 67
- TABELA IV - Susceptibilidade a antibacterianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas do músculo e líquido intervalvar das ostras comercializadas na Barraca B, da Praia de Futuro, Fortaleza, Ceará. 68

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema para quantificação e identificação de coliformes fecais ou termotolerantes isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras comercializadas nas barracas da Praia do Futuro (Fortaleza, Ceará). 53
- FIGURA 2 - Esquema para quantificação e identificação de cepas de *Enterococcus* spp. isoladas do músculo e líquido intervalvar de ostras comercializadas nas barracas da Praia do Futuro (Fortaleza, Ceará). 59
- FIGURA 3 - Fluxograma para investigação da produção de bacteriocinas sintetizadas por cepas de *Enterococcus* spp. isoladas do músculo e líquido intervalvar de ostras comercializadas nas barracas da Praia do Futuro (Fortaleza, Ceará). 61
- FIGURA 4 -- Log do NMP de coliformes fecais ou termotolerantes e de enterococos das amostras do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca A, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. 69
- FIGURA 5 - Log do NMP de coliformes fecais ou termotolerantes e de enterococos das amostras do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. 70
- FIGURA 6 - Percentual de Coliformes Fecais ou termotolerantes isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras

- (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca A ,
da Praia do Futuro ,Fortaleza, Ceará. 71
- FIGURA 7 - Percentual de Coliformes Fecais ou termotolerantes
isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras
(*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca B,
da Praia do Futuro ,Fortaleza, Ceará. 71
- FIGURA 8 - Percentual de *Enterococcus* isolados do músculo e líquido
intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*)
comercializadas na Barraca A, da Praia do Futuro
,Fortaleza, Ceará. 72
- FIGURA 9 - Percentual de *Enterococcus* isolados do músculo e líquido
intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*)
comercializadas na Barraca B, da Praia do Futuro,
Fortaleza, Ceará. 72

RESUMO

Foram estimados o Número Mais Provável (NMP) de enterococos e de coliformes termotolerantes de 60 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas em duas barracas: A e B, na Praia do Futuro em Fortaleza – CE, no período de setembro de 2000 a setembro de 2001. Cada amostra constava de 25 indivíduos, totalizando assim a análise de aproximadamente 1.500 ostras. Os NMPs de enterococos para as amostras coletadas na Barraca A variaram de <3,0 a >1100/g, enquanto os estimados nas amostras da Barraca B ficaram entre 3,0 e >1100/g. Para coliformes termotolerantes os valores encontrados nas amostras de ostra foram de <3,0 a 9300,0/g e <3,0 a >110000/g para as Barracas A e B, respectivamente. Do total de amostras analisadas, 40% na Barraca A e 43% na Barraca B mostraram valores de coliformes termotolerantes acima dos padrões estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para espécies destinadas a alimentação humana e que serão ingeridas cruas (BRASIL, 2001). Não houve correlação estatística entre os NMPs de enterococos e de coliformes termotolerantes ($p < 0,05$). Na Barraca A foram confirmadas 90 (71%) cepas de *E. faecalis*; 8 (6%) de *E. hirae*; 2 (2%) de *E. mundtii* e 1 (1%) de *E. durans*, enquanto na B foram confirmadas: 76 (63%) cepas de *E. faecalis*; 5 (4%) de *E. hirae* e 2 (2%) de *E. mundtii*. Com relação aos coliformes termotolerantes, foram confirmadas na Barraca A: 56 (82%) cepas de *E. coli*; 12 (17%) de *Enterobacter* e 1 (1%) de *Citrobacter* e na Barraca B, foram confirmadas 40 (63%) de *E. coli*; 19 (30%) de *Enterobacter*; 3 (5%) de *Citrobacter* e 1 (2%) de *Klebsiella*. Todas as cepas de *E. coli* da Barraca A foram sensíveis aos antimicrobianos: CIP, CN, CRO, FOX, IMP, NA e SXT enquanto, que 70% apresentaram resistência a ampicilina. Na Barraca B, As maiores sensibilidades (100%) foram detectadas aos antimicrobianos CRO, CIP, CN, FOX, F, IMP, NA. e NIT. Com relação à resistência a ampicilina, o resultado foi similar ao da Barraca A. Frente a *Escherichia coli*, nenhuma das cepas, das diferentes espécies de *Enterococcus*, testadas, mostrou capacidade de produzir substâncias inibidoras (bacteriocinas) de crescimento.

ABSTRACT

The Most Probable Numbers (NMPs) of enterococci and thermotolerant coliforms were estimated in 60 oyster samples (*crassostrea rhizophorea*) sold at two beach restaurants, A and B, at Praia do Futuro, Fortaleza City, Ceará state, during the period between september 2000 and september 2001. Each sample included 25 individuals, therefore reaching a total of approximately 1,500 tested oyster. The enterococci NMPs in the samples collected at A ranged between <3,0/g and >1,100/g, while those sampled at B were between 3,0/g and >1,100/g. For the thermotolerant coliforms the obtained values were between <3,0/g and 9,300/g for A, and between <3,0/g and >110,000/g for B. Of all the tested samples, 40% of the oyster sampled at A and 43% of those sampled at B showed thermotolerant coliforms NMPs values over the limits established by the National Health Safety Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) for human consumption of raw food (BRASIL, 2001). There was no statistical correlation between the enterococci and thermotolerant coliforms NMPs ($p < 0.05$). 90 strains of *E. faecalis* (71%), 8 of *E. hirae* (6%), 2 of *E. mundtii* (2%) and 1 of *E. durans* (1%) were isolated at A, while at B 76 strains of *E. faecalis* (63%), 5 of *E. hirae* (4%), 2 of *E. mundtii* (2%) were found. Regarding the thermotolerant coliform group, 56 strains of *E. coli* (82%), 12 of *Enterobacter* (17%) and 1 of *Citrobacter* (1%) were confirmed at A, while 40 strains of *E. coli* (63%), 19 of *Enterobacter* (30%), 3 of *Citrobacter* (5%) and 1 of *Klebsiella* (2%) were found at B. All the *E. coli* strains isolated at A were sensitive to the following antimicrobial agents: CIP, CN, CRO, FOX, IMP, NA and SXT. 70% of these strains showed resistance to ampiciline. At B, the higher sensitivities (100%) were observed for the following antimicrobial agents: CIP, CN, CRO, FOX, IMP, NA and NIT. The ampiciline-resistance values were similar to those at A. None of the *Enterococcus* species showed to be capable to produce growth inhibiting substances (bacteriocins) against *E. coli*.



1. INTRODUÇÃO

A utilização de moluscos bivalves como alimento, data da época Paleozóica (SANTOS, 1982).

O cultivo de moluscos foi realizado, inicialmente, pelos japoneses (2000 a.C) e romanos (100 a.C) e, nos dias atuais, alcança elevado nível tecnológico, tornando-se iguaria de real valor nutritivo e de elevado consumo. Entretanto, esse consumo tem registros na literatura especializada como responsável por inúmeros surtos epidêmicos, respondendo diretamente por problemas de Saúde Pública, principalmente, quando os moluscos são ingeridos crus e a qualidade sanitária do ambiente aquático onde eles são capturados está comprometida (JOSÉ, 1996).

Segundo ZAMARIOLI et al. (1997), as ostras oferecem um maior risco, pois esses moluscos são filtradores e bioacumuladores de microrganismos, sendo dessa forma muito utilizados como bioindicadores. Portanto, a microbiota da carne da ostra está diretamente relacionada ao ambiente do qual ela se origina .

De acordo com NUNES & PARSONS (1998), os moluscos bivalves (indivíduo adulto), filtram de 2 a 5 litros de água por hora em seu processo fisiológico de alimentação, e acumulam na massa visceral, lúmen do intestino e hepatopâncreas, todos os agentes biológicos e abióticos que se encontram na água onde vivem.



São considerados indicadores de microrganismos patogênicos algumas bactérias tais como *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* (BRASIL, 1990).

Organizações internacionais, como “ Food and Drug Administration – FDA”, têm procurado através de princípios e normas, estabelecer o controle das condições sanitárias da água onde são cultivados os moluscos, objetivando garantir sua qualidade como alimento.

A comissão de Código Alimentar da FAO/OMS, recomenda medidas para prevenir e controlar os ambientes aquáticos, sob o ponto de vista de Saúde Pública, tanto sob os aspectos físico-químicos, como microbiológicos (SINNEL, 1981).

A classificação e controle das áreas para produção de bivalves nos Estados Unidos da América ocorre desde 1925 (HOUSER, 1965), além disso são realizados cadastros dos coletores, com a finalidade de mantê-los atualizados com essa classificação. Os principais parâmetros para o controle são os níveis de coliformes fecais. No México, tanto os coliformes totais como os fecais são usados como indicadores da qualidade da água.

No Brasil, a legislação pertinente, que estabelece critérios e normas de qualidade, com o objetivo de proteger e preservar sanitariamente as águas



destinadas ao consumo e residuais, é bastante extensa e complexa. O Decreto nº 1695 de 31 de novembro de 1995 (BRASIL, 1995) regulamenta a exploração da aquicultura em águas públicas pertencentes a União, e determina as condições de controle para a exploração dos organismos aquáticos a serem cultivados, assim como, o monitoramento periódico da qualidade da água na área de influência do empreendimento (LIRA et al., 2000).

Segundo MACHADO et al. (2001), muitos países que comercializam ostras, desenvolveram um conjunto de normas próprias, baseadas em análises microbiológicas da água de seu cultivo e/ou da sua carne. A maioria desses padrões normativos está baseada na pesquisa de coliformes, pois esse grupo é indicador de contaminação fecal.

A resolução RDC nº 12, da ANVISA (2001), Artigo 22 letra b estabelece um padrão de 10^2 coliformes termotolerantes/g para pratos prontos para o consumo à base de carne, pescados e similares crus, o que representa uma elevada quantidade de microrganismos quando comparado aos padrões microbiológicos de outros países (GELLI et al., 1979).

O envolvimento de bactérias, tais como *Escherichia coli*, em casos ou surtos de infecção, provocados pelo consumo de pescado contaminado, é uma preocupação constante para o controle da qualidade dos produtos pesqueiros.



Os produtos pesqueiros são importantes disseminadores de agentes patogênicos, responsáveis por várias enfermidades na população, principalmente aquelas de veiculação hídrica. Assim, vários parâmetros de qualidade devem ser levados em consideração quando se processa peixes, crustáceos e moluscos, sendo o mais importante deles, a qualidade microbiológica, que deve ser observada, conforme padrões estabelecidos pela legislação.

Para GONÇALVES (1998), os alimentos podem servir como veículos de agentes patogênicos ao homem, ou como substrato para microrganismos que poderão elaborar substâncias nocivas que trarão prejuízos, quando ingeridas.

A prescrição de antimicrobianos é feita para combater determinados agentes bacterianos envolvidos no processo infeccioso. A indicação de drogas específicas para o tratamento de doenças seria muito bom, se todas as bactérias apresentassem sensibilidade constante às drogas. No entanto a maioria dos agentes apresenta variação de sensibilidade, sendo, assim, necessário conhecer a sensibilidade "in vitro" destes microrganismos (COSTA, et al., 2002).

Na maioria dos países os órgãos legisladores utilizam o grupo coliforme como indicador de contaminação fecal, tanto na água de coleta ou cultivo, como nas próprias ostras, para assegurar a saúde do consumidor.

Segundo HAGLER et al. (1986), apesar das amplas aplicações dos coliformes como indicadores de poluição fecal, existem controvérsias sobre sua utilização e,



estudos epidemiológicos sugerem a contagem de enterococos como uma alternativa, principalmente pelo fato desses microrganismos resistirem a várias condições adversas, como salinidade elevada, desidratação, uso de detergentes e desinfetantes, congelação, pH ácido e tratamento térmico moderado.

Uma pesquisa realizada pela Agência Americana de Proteção Ambiental-USEPA-USA estudou a incidência de doenças entre nadadores e não nadadores veiculadas por água, e a concentração de vários microrganismos usados como indicadores de contaminação fecal. Os resultados mostraram que de todos os microrganismos analisados, apenas as concentrações de enterococos em águas marinhas apresentavam correlação com a incidência de doenças diarréicas entre os nadadores (FUJIOKA, 1997).

Os enterococos são freqüentemente empregados como “indicadores complementares” do grupo coliformes na determinação da contaminação fecal. A relação existente entre as contagens de coliformes fecais e enterococos fecais pode indicar se a contaminação recente é de origem humana ou animal (HAGLER & HAGLER, 1988).

Uma outra característica importante dos enterococos é a capacidade de produzir bacteriocinas, um grupo de proteínas tóxicas para outras bactérias (ALCAMO, 1994). Estas substâncias foram detectadas pela primeira vez em *E. coli* (HARDY, 1975) e posteriormente em algumas bactérias Gram positivas (TAGG et al., 1976).



As bacteriocinas enterocócicas vêm ganhando atenção nos últimos anos porque são isoladas com facilidade, principalmente de alimentos fermentados, e também porque muitas delas apresentam ação contra patógenos veiculados por alimentos como é o caso da *Listeria monocytogenes* (GIRAFFA, 1995).

O elevado consumo de ostras nos mercados interno e externo (embora não exista dados estatísticos em nenhum órgão do Estado) e a importância econômica desse molusco para o Estado do Ceará, tornam importante a pesquisa e monitoramento de problemas que possam vir a pôr em risco a qualidade desse produto e a saúde do consumidor.

O objetivo desse trabalho foi quantificar enterococos e coliformes fecais ou termotolerantes em ostras através do Número Mais Provável (NMP), comparando o uso do primeiro grupo com o do segundo, como indicador de contaminação fecal nas ostras (*Crassostrea rhizophorea*) comercializadas em duas barracas da Praia do Futuro. Além disso, isolar e identificar cepas de coliformes fecais ou termotolerantes e de enterococos; enumerar aquelas produtoras de bacteriocinas; e avaliar o comportamento das cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de ostras frente à ação de antimicrobianos comerciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SURTOS E DOENÇAS MICROBIANAS



Doenças microbianas de origem alimentar (DTAs) ou toxinfecções alimentares constituem um grupo de doenças, no qual o alimento contaminado é o mais importante veículo do agente patogênico (PAIVA et al., 2000).

De acordo com ANDRADE & MACEDO (1996), os agentes etiológicos responsáveis por cerca de 200 diferentes tipos de doenças transmitidas ao homem através dos alimentos são: bactérias, fungos, vírus, parasitas, agentes químicos e substâncias tóxicas, sendo as bactérias os microrganismos de maior importância dentre esses fatores.

Nos países onde se mantêm registros apropriados das doenças veiculadas pelos alimentos, os produtos de pesca contribuem com uma significativa proporção dos surtos relatados, variando de um país para outro, dependendo do clima, costumes da dieta e outras diferenças sociais (MOHAMED HATHA & LAKSH MANAPERUMALSAMY, 1997).

Segundo VIEIRA (1989), o pescado torna-se uma fonte potencial de contaminação para o homem através dos diversos fatores que determinam uma condição de risco, que vão desde a contaminação do ambiente onde ele é capturado, acrescido do manuseio que sofre, até chegar ao consumidor.

Uma grande quantidade de microrganismos patogênicos para o homem pode ser veiculada pelo pescado. A descarga de esgotos nas águas de reservatório, nos



rios e no mar são as causas poluidoras mais comuns de ambientes aquáticos registradas no mundo inteiro (CONSTANTINIDO, 1994).

Na Índia, um país em desenvolvimento, produtos como peixes, moluscos e crustáceos marinhos foram implicados como veículos de muitos casos de surtos de doenças alimentares (MOHAMED HATHA & LAKSHMANAPERUMALSAMY, 1997).

Nos Estados Unidos, a estimativa é de que 24 a 81 milhões de pessoas tornem-se doentes a cada ano, a partir do consumo de comidas contaminadas. Essas doenças resultam numa estimativa de 10.000 mortes por ano, tendo um custo estimado entre 7,7 a 23 bilhões de dólares (FDA, 1997), afetando a cada ano, um em cada 10 habitantes (PAIVA et al., 2000).

No Brasil, devido à falta de notificação compulsória no país, torna-se extremamente difícil a coleta de dados que tenha significado estatístico. Assim, para se ter uma idéia dos agentes mais freqüentemente envolvidos em surtos de DTAs é necessário recorrer às estatísticas de países que possuem uma assistência médica mais eficaz e melhor organizada (RIEDEL, 1992).

Segundo FRANCO & LANDGRAF (1996), embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar seja bastante elevada.



PASSOS & KUAYE (1996) acreditam que além do fato destas doenças não serem obrigatoriamente notificadas, concorrem negativamente para esta situação, entre outros, a falta de pessoal técnico preparado nos locais onde ocorrem os surtos e a atitude bastante freqüente dos responsáveis pelos locais, onde tais incidentes ocorrem, que tratam de minimizar a importância do fato.

GERMANO et al. (1993) estimam que apenas 1 a 10% do número real de surtos de toxinfecções alimentares sejam confirmados, devido ao atual estado de desenvolvimento de vigilância epidemiológica do país e da falta de conscientização da população brasileira frente ao problema.

Enquanto JAY (1993) cita que, de cada caso de DTA registrado oficialmente, 30 a 100 outros casos ocorrem sem serem divulgados pelos serviços de vigilância sanitária.

Segundo COOK et al. (2001), a maior epidemia associada com o consumo de moluscos ocorreu em Shanghai, China, em 1988. Mais de 300.000 casos de hepatite A foram reportadas. A epidemia foi causada pelo consumo de moluscos crus capturados de um porto que, recebia despejos de esgotos domésticos, sem tratamento. Mais recentemente, gastroenterite viral tem se tornado a enfermidade mais comum associada com o consumo de moluscos.

CHUNG et al. (1998) analisando vírus entéricos em ostras capturadas no estuário do Rio Newport, perto da cidade de Morehead, NC, (USA) e suas relações



com indicadores em águas e ostras, detectaram-nos em 16 de 31 amostras de ostras(52%).

2.2 RELAÇÃO COLIFORMES FECALIS / *Enterococcus faecalis* (CF/EF)

A relação coliformes fecais (CF) / *Enterococcus faecalis* (EF), foi proposta por GELDREICH & KENNER (1969) para diferenciar a poluição de origem humana da não humana, baseado no fato de que os dois grupos indicadores ocorrem em proporções diferentes nas fezes humanas e de outros animais homeotermos. De acordo com estes pesquisadores, a razão CF/EF acima de 4,0 sugere contaminação humana e abaixo de 0,7 indicaria contaminação por outros animais. Os autores destacam que o índice CF/EF fornece resultados mais confiáveis, quando a determinação é feita dentro das primeiras 24 horas de ocorrência a poluição, devido aos diferentes períodos de sobrevivência de ambos indicadores.

FUJIOKA et al. (1988) ao determinarem as concentrações de CF e EF e a origem da contaminação fecal em rios havaianos, situados em locais não habitados, verificaram que a taxa CF/EF foi usualmente menor que 0,7 indicando poluição fecal de origem animal. As concentrações mais altas obtidas de CF (236 / 100 ml) e EF (217 / 100 ml) nesses rios foram correlacionados a ocorrência de chuvas, pois estas transportaram as bactérias dos terrenos circundantes para dentro desses cursos d'água, onde se multiplicaram, favorecidas pela temperatura constante das águas (18-24°C).



O uso do índice CF/EF para a diferenciação da origem da contaminação fecal foi questionada por McFETERS et al., (1974), devido as diferentes taxas de sobrevivência dos indicadores. Os autores verificaram que os *Enterococcus faecalis* sobrevivem mais tempo (22,2 h) que os coliformes fecais (18,4 h). No entanto FEICHEM (1975), propõe um novo valor igual ou superior a 2,0 como índice de contaminação humana em vez do valor 4,0, proposto originalmente por GELDREICH & KENNER (1969).

No Brasil, o uso deste índice para determinar a origem da contaminação fecal foi aplicado com bastante sucesso em rios e córregos da cidade de São Paulo (MARTINS et al., 1989) e em açudes no Estado da Paraíba (CEBALLOS, 1995).

2.3 *Escherichia coli*

2.3.1 Habitat natural

Escherichia coli é isolada de fezes humanas e de animais, e sua presença na água é considerada como indicadora de contaminação fecal (BOPP et al., 1999).



Sua concentração nas fezes de seres humanos varia de (10^6 a 10^9 /g), em cães e gatos (10^6 a 10^9 /g), em gado e galinha (10^4 a 10^7) e em coelhos, roedores e macacos (10^1 a 10^5 /g) (DUFOR, 1977).

2.3.2 Caracterização

As *E.coli* são anaeróbias facultativas e possuem motilidade através de flagelos ou são imóveis. A temperatura ótima de crescimento está na faixa dos 36 +/- 1°C. São oxidase negativas, podendo usar o acetato como única fonte de carbono, o mesmo não acontecendo com o citrato, o qual não é utilizado pela bactéria. A glicose e outros carboidratos são fermentados com produção de piruvato, que são então convertidos a ácido lático, acético e fórmico. Muitas cepas, especialmente aquelas isoladas dos tecidos extra-intestinais, possuem cápsulas ou microcápsulas polissacarídicas (BRENNER, 1984).

2.3.3 Taxonomia

Foi em homenagem a Theodor Von Escherich, descritor da *Escherichia*, que surgiu o nome do gênero da bactéria descrita por ele em 1885, como sendo microrganismos existentes na microbiota do cólon, não prejudiciais à saúde.



Desde então, as bactérias deste gênero têm sido associadas a uma variedade de doenças e infecções (EVANGELISTA, 1998).

A espécie *E. coli* pertence ao gênero *Escherichia*, classificado dentro da família Enterobacteriaceae. São bastonetes Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose, com produção de ácido e gás, embora algumas sejam anaeróbias (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

2.3.4 Significância Clínica

As linhagens de *E. coli* possuem três antígenos diferentes os quais estão associados com várias doenças e infecções intestinais e do trato urinário. Também estão ligados a infecções da meninge em recém-nascidos. São conhecidos como somáticos (O), antígenos de invólucro (K) e os flagelares (H) (MAHON & MANUSELIS JR., 1995).

BOPP et al. (1999) afirmam que a *E. coli* é parte comum da microbiota de indivíduos saudáveis, entretanto certas cepas podem causar infecções intestinais e extra intestinais em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. Infecções no trato urinário, bacteremia, meningites e doenças diarreicas são as síndromes clínicas,



mais comuns, causadas primariamente por um número limitado de cepas patogênicas de *E. coli*.

POLAKOVA, et al. (1972), na Checoslováquia, ao isolarem *E. coli* de produtos cárneos, leite e produtos de laticínio, verificaram que cerca de 67% delas eram resistentes a um ou mais antibióticos.

TURTURA, et al. (1990), constataram a resistência de *Escherichia coli* isolada de carcaças de frango, aos antimicrobianos ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, cefalotina, ácido nalidíxico e nitrofurantoína.

Da espécie *Escherichia coli* são conhecidos cerca de 164 antígenos O, 100 antígenos K e 56 antígenos H, contudo apenas 30 sorotipos, aproximadamente, têm sido associados com doenças diarreicas (JAY, 1991a).

Segundo NATARO & KAPER (1998), a bactéria foi dividida em seis grupos baseados em fatores definidos de virulência, manifestações clínicas produzidas, epidemiologia e sorotipagem. Os grupos que são reconhecidos como causadores de diarreias são: *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) também referida como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC). Existem vários outros grupos de *E. coli* diarreigênica, incluindo *E. coli* Enteroagregativa (EaggEC) e difusamente agregada (DAEC) e ainda várias outras cepas de *E. coli* produtoras de toxinas, mas o significado clínico desses organismos não é claro.



2.3.5 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

De acordo com JAY (1991a), foram realizados estudos na metade dos anos 40 que, correlacionaram *Escherichia coli* enteropatogênica com doenças diarréicas envolvendo epidemias em berçário, com alta taxa de mortalidade.

Segundo o mesmo autor, embora já houvesse relatos esporádicos relacionando *E. coli* com casos de gastroenterites de origem alimentar, anteriores a 1970, foi somente em 1971 que estudiosos focalizaram a atenção neste organismo como um patógeno veiculado por alimentos.

E. coli enteropatogênica provocou um surto nos estados Unidos em 1968, devido à ingestão de água não clorada, proveniente de poço artesiano, e provavelmente contaminada com fezes humanas. Vários surtos de origem alimentar ocorreram na Inglaterra. Um deles em 1967, através da ingestão de carne de porco previamente preparada, e outro em 1973, atribuído à ingestão de torta de carne contaminada (DOYLE & CLIVER, 1990). Entretanto, surtos de diarréia provocados por EPEC não têm sido freqüentes em adultos.

Segundo MAHON & MANUSELIS JR. (1995), o papel patogênico das linhagens de EPEC continua não definido, pois apenas alguns sorotipos H têm sido associados com infecções diarréicas.



Ainda segundo os mesmos autores, os sintomas característicos de infecções intestinais causados por *E. coli* enteropatogênica são: febre baixa, indisposição, vômito e diarreia. As fezes contêm grande quantidade de muco, raramente havendo presença de sangue.

2.3.6 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)

As infecções causadas por cepas de ETEC apresentam os seguintes sintomas: diarreia e dores abdominais, algumas vezes acompanhados de náuseas e dores de cabeça, mas usualmente com poucos vômitos ou febre. A doença pode durar de 1 a 5 dias (MAHON & MANUSELIS JR., 1995; BOPP et al., 1999).

As ETECs produzem enterotoxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST), ou ambas, e são uma importante causa de diarreia em países em desenvolvimento, particularmente entre crianças jovens, sendo também uma causa freqüente da “diarreia dos viajantes” (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Vários surtos de DTAs relacionados a ETEC têm sido relatados. No Estado de Wisconsin-USA, em 1980, mais de 400 pessoas se tornaram doentes após a ingestão de alimentos em um restaurante mexicano. Foi provado que a contaminação ocorreu através de um dos cozinheiros, que apresentava quadro



diarréico durante um período de duas semanas, antes do surgimento do surto (DOYLE & CLIVER, 1990).

EPEC tem sido responsável pelo aumento de doenças epidêmicas que ocorreram nos EUA e Japão, nos últimos anos. Nove surtos foram relatados ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em Atlanta-USA, entre os anos de 1992 e 1997, enquanto que apenas quatro surtos foram relatados nos 10 anos anteriores (BOPP et al., 1999).

2.3.7 *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Segundo MAHON & MANUSELIS JR. (1995), essas cepas são muito diferentes das cepas de EPEC e EPEC, e produzem diarreia, com penetração direta, invasão e destruição da mucosa intestinal, sendo muito parecidas com a produzida por *Shigella*. A infecção clínica é caracterizada por febre, severas dores abdominais, indisposição e diarreia aquosa acompanhada por toxemia.

Devido à grande semelhança entre cepas enteroinvasivas de *E. coli* e *Shigella*, acredita-se que muitos casos reportados como sendo provocados por *Shigella*, tenham sido provocados pela infecção de cepas de *E. coli* enteroinvasivas (DOYLE & CLIVER, 1990).



Humanos infectados são os principais reservatórios de EIEC. O microrganismo pode se difundir através da água, alimentos e pelo contato pessoa a pessoa. Poucos alimentos têm sido associados a surtos de DTAs provocados por este grupo, com salmão, carne de aves, leite e queijo Camembert, como veículos. Em 1971, nos Estados Unidos, aproximadamente 380 pessoas ficaram doentes após a ingestão de queijo Camembert. O queijo era de origem francesa e continha *E. coli* enteroinvasiva em contagens de $10^5 - 10^7$ microrganismos /grama (DOYLE & CLIVER, 1990).

2.3.8 *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) e outros Sorogrupos

São classificados por esse nome, por causa das toxinas que produzem e porque os fatores genéticos que definem organismos capazes de causar colites hemorrágicas e Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) não são claros ainda.

Os sorotipos *E. coli* O157:H7 e O157: não móvel (NM) (O157 STEC) produzem uma ou mais toxinas shiga, também chamadas Verocitototoxinas, e são em sua maioria, comumente identificadas como *E. coli* diarreia gênicas isoladas na América do Norte e Europa (BOPP et al., 1999).



A cepa O157 STEC é suspeita de causar pelo menos 80% dos casos de SUH e, na América do Norte é reconhecida como uma causa comum de diarreia sangüinolenta, em países desenvolvidos (BOPP et al., 1999)

Ainda segundo os mesmos autores, *E. coli* O157:H7 e outros sorotipos causam um amplo espectro de diarreias que vão desde diarreias simples, não sangüinolentas, diarreias sangüinolentas severas (colites hemorrágicas), até SUH. Sintomas adicionais desses tipos de infecções são dores abdominais e períodos de febre.

Com o aumento da inspeção para *Escherichia coli* O157:H7, diversas infecções têm sido reconhecidas em todas partes do mundo, como por exemplo no México, China, Argentina e Bélgica. Em janeiro de 1993, no Estado de Washington-USA, ocorreu um acidente fatal, envolvendo a contaminação de hambúrguer por *Escherichia coli* O157:H7, em uma cadeia de restaurantes chamada “Jack In The Box”. Várias crianças adoeceram e duas faleceram. O surto foi relacionado à ingestão de *hambúrguer* mal-cozido (KUSHNER, 1993; MERMELSTEIN, 1993).

Além das carnes vermelhas, outros meios de transmissão conhecidos são: leite cru, salsa, *roast beef*, água de abastecimento não clorada, cidra de maçã, vegetais crus, saladas e maioneses. Esta cepa passa de pessoa a pessoa facilmente, pois a dose de infecção é baixa. Surtos associados à transmissão pessoa-a-pessoa têm ocorrido em famílias, escolas, instituições de longa permanência e instalações, diariamente (BOPP et al., 1999).



2.3.9 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EaggEC)

As cepas Eagg EC causam diarréia, pela aderência à superfície da mucosa do intestino. Estes organismos produzem sintomas tais como diarréia aquosa, vômitos, desidratação e ocasionalmente dores abdominais (MAHON & MANUSELIS JR, 1995).

Segundo NATARO & KAPER (1998), a adesão se dá principalmente no cólon, não sendo observada no íleo ou no duodeno. As cepas de EaggEC parecem estar associadas com casos crônicos de diarréia (diarréia persistente, duração de 14 dias ou mais). Na Índia, estudos têm demonstrado a importância da EaggEC em diarréia pediátrica.

2.4 *Enterococcus* spp.

2.4.1 Caracterização

Os enterococos são bactérias lácticas na forma de cocos ou cocobacilos Gram positivos, catalases negativos e anaeróbios facultativos (SILVA et al., 1997).



As células esféricas apresentam-se em tamanhos de 0,6-2,0 x 0,6-2,5 μm , ocorrendo em pares ou cadeias curtas em meio líquido. Não formam endósporos, podem ser móveis (raros flagelos) e não possuem cápsula. Apresentam metabolismo homofermentativo; fermentam diversos carboidratos com produção de L(+) – ácido láctico principalmente, mas sem produção de gás, com pH final variando de 4,2 a 4,6. Possuem necessidades nutricionais complexas. Crescem geralmente a 10°C e a 45°C (com temperatura ótima a 37°C), em pH 9,6, com 6,5% de NaCl e na presença de sais biliares a 40%. Raramente reduzem nitrato e em geral fermentam a lactose (LEME & FERREIRA, 2001).

Os enterococos não contêm enzimas citocromo, mas em determinadas ocasiões o teste da catalase é positivo. A pseudocatalase é algumas vezes produzida, e uma fraca efervescência é observada no teste da catalase. Isso ocorre quando cepas de *E. faecalis* são crescidas em meio contendo sangue. Não é sabido se qualquer outra espécie de *Enterococcus* se comporta da mesma maneira (FACKLAM et al., 1999).

2.4.2 Habitat Natural

Os enterococos podem ser encontrados no solo, alimentos, água, plantas, animais, aves e insetos (BLAIMONT et al., 1995; DEVRIESE et al., 1992; DUTKA et al., 1978; KIBBEY et al., 1978; MUNDT et al., 1967).



Habitam o trato gastrointestinal e o trato genital das fêmeas dos humanos e de outros animais. A prevalência de diferentes espécies de enterococos parece variar de acordo com o hospedeiro e é também influenciada pela idade, dieta, e outros fatores que devem ser relacionados a mudanças nas condições fisiológicas (DEVRIESE et al., 1992).

E. faecalis é uma das bactérias mais comuns isoladas do trato gastrointestinal de humanos, entretanto em alguns indivíduos e em alguns países, *E. faecium* é mais numeroso do que *E. faecalis* (RUOFF, 1990; DEVRIESE & POT, 1995).

Números de *E. faecalis* em fezes humanas alcançam de 10^5 a 10^7 UFC/g comparada com 10^4 a 10^5 UFC/g para *E. faecium* (NOBLE, 1978; CHENOWETH & SCHABERG, 1990). *E. faecalis* têm sido isolados de fezes de neonatais (NOBLE, 1978; MURRAY, 1990).

A limitada informação disponível sobre a distribuição de espécies de enterococos distintos em animais e fontes ambientais indica que existem diferenças na distribuição em humanos (DEVRIESE et al., 1990 e 1992; NIEMI et al., 1993).

2.4.3 Taxonomia

A identificação de enterococos tem sido problemática. Numerosos enterococos isolados, principalmente de fontes ambientais, freqüentemente permanecem sem identificação, quando esta é baseada somente em características



fenotípicas. É difícil categorizar isolados entre as espécies de enterococos por testes fisiológicos porque a heterogeneidade nas características fenotípicas é muito alta, independentemente da origem do isolado (DEVRIESE et al., 1993; TEIXEIRA et al., 1995; ULRICH et al., 1998; PARK et al., 1999).

Existe um problema com a taxonomia de enterococos, em função deles serem um grupo heterogêneo de cocos Gram positivos, dividindo muitas características com o gênero *Streptococcus* e *Lactococcus*. Isso explica o fato porque, enterococos associados a alimentos, têm sido frequentemente considerado pertencer à microbiota láctica. Com base na catalogação do 16S rRNA, o gênero *Streptococcus* foi separado durante o ano de 1980 em três gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Conseqüentemente, as bactérias previamente chamadas “*Streptococcus faecalis*”, *Streptococcus faecium*”, “*Streptococcus avium*” e “*Streptococcus gallinarum*” foram transferidas em 1984 para o revisado gênero *Enterococcus* como *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* e *E. gallinarum*, respectivamente (SCHLEIFER & KILLPER-BALZ, 1984).

Desde à transferência, o número total de espécies agora incluídos no gênero *Enterococcus* com base na quimiotaxonomia e estudos filogenéticos é 19, entre os quais se destacam: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. raffinosus* (TRABULSI et al., 1999).



Esta situação continua flutuando de tempos em tempos quando espécies individuais são movidas para outros gêneros ou novas taxonomias são descobertas. Mais recentemente, outras espécies de enterococos têm sido propostas com base em estudos de quimiotaxonomia e evidência filogenética fornecido pelo seqüenciamento 16S rDNA (De VAUX et al., 1998; MULLER et al., 2001).

É altamente provável que o sistema filogenético do gênero *Enterococcus* não tenha sido ainda completamente elucidado e que algumas reclassificações possam ser necessárias em um futuro próximo (GIRAFFA, 2002).

2.4.4 Patógenos emergentes

Nas duas últimas décadas, enterococos, anteriormente revisados como organismos de mínimo impacto clínico, têm emergido como importante patógeno adquirido em hospitais por pacientes imunocomprometidos e de unidades de terapia intensiva. Os enterococos não possuem o fator de virulência comum encontrado em muitas outras bactérias, mas eles têm um número de outras características, por exemplo, a resistência a agentes antimicrobianos, que pode contribuir para sua virulência e fazer deles patógenos oportunistas efetivos. Enterococos relacionados diretamente a surtos provocados por alimentos, não foi ainda comprovado (ADAMS, 1999).



Neste contexto, relatos de infecções adquiridas em hospital atribuídos a enterococos são difíceis de serem interpretadas porque essas bactérias são geralmente identificadas em culturas misturadas com outros patógenos (MORRISON, et al., 1997).

Os enterococos têm sido implicados em casos de envenenamento alimentar, por exemplo, pela produção de aminas biogênicas, baseado no seu isolamento em altos números de alimentos suspeitos, mas esta afirmação ainda não encontrou suporte direto (GIRAFFA, 2002).

2.4.5 Significância clínica

A incidência de infecções enterocócicas tem aumentado nos últimos anos somando aproximadamente 10% das infecções adquiridas em hospitais nos USA (MORRISON et al., 1997; CHENOWETH et al., 1990).

Os enterococos são novos entre os patógenos mais comuns adquiridos em hospitais. Eles têm sido implicados como uma importante causa de endocardite, bacteremia, infecções do trato urinário, do sistema nervoso central, infecções intra-abdominais e pélvicas (FRANZ et al., 1999).



Dados epidemiológicos também indicam que *E. faecalis* é a espécie mais comum entre os enterococos isolados de enfermidades humanas, enquanto *E. faecium*, o qual está associado com a maioria das infecções enterocócicas restantes, pode propor uma grande ameaça à resistência dos antibióticos (TAILOR et al., 1993; JETT et al., 1994; LOW et al., 1994; SIMJEE & GILL., 1997; HUYCKE et al., 1998).

Enterococos isolados de intestino de humanos são responsáveis por 5-15% dos casos de endocardite infecciosa e 4% dos casos de bacterímia, enquanto que as infecções do trato urinário são as infecções enterocócicas mais comuns adquiridas em hospital (ADAMS, 1999; MORRISON, et al., 1997).

Além disso, há forte indícios de que enterococos causando bacterímias são comumente originados do trato urinário. MALONE et al. (1986) observaram que em 24% das bacterímias enterocócicas, o isolado foi originado de uma infecção do trato urinário.

Além dessas infecções bem documentadas, a incidência de infecções intra-abdominal causada por enterococos, resistentes a vancomicina, está aumentando (PODUVAL et al., 2001).

2.4.6 Presença em alimentos

Os enterococos podem ser facilmente isolados de alimentos, incluindo um grande número de alimentos fermentados tradicionais. Uma figura clara da ecologia



dessa bactéria explica facilmente sua presença em alimentos. Os enterococos constituem uma grande proporção de bactérias autóctones associadas com o trato gastrointestinal de mamíferos. Uma vez rejeitados no ambiente, principalmente por fezes humanas ou dejetos de animais, eles são capazes de colonizar diversos nichos por causa de sua excepcional capacidade de resistir ou crescer em ambientes hostis. Portanto, enterococos não estão associados somente com animais de sangue quente, mas também ocorrem no solo, superfície de águas e em vegetais. Pela contaminação intestinal ou ambiental, eles podem então colonizar alimentos crus, tais como carne, leite e pescado e se multiplicar nesses alimentos durante a fermentação. Eles podem também contaminar produtos pesqueiros durante todo o processamento. Dessa forma, muitos alimentos fermentados feitos de carne, leite e pescado contêm enterococos (GIRAFFA, 2002).

Após o período de fermentação, para dar estabilidade biológica ao produto, carnes e pescados processados são tipicamente salgados ou defumados e então na maior parte, consumidos crus. Nessas condições, enterococos, que normalmente contaminam carnes e pescados crus na ordem de 10^2 a 10^4 UFC/g (TEUBER et al., 1996) e são muito resistentes a temperaturas extremas, pH e salinidade, podem se multiplicar em altos números e agir como agentes de deterioração em carnes e pescados processados.

Em muitos casos, entretanto, enterococos são um problema de deterioração também em carnes e pescados cozidos e processados porque eles são capazes de sobreviver em processamento a quente, especialmente se presentes inicialmente,



em altos números (FRANZ et al., 1999). Tanto *E. faecalis* quanto *E. faecium* têm sido implicados na deterioração de presuntos pasteurizados enlatados (HOUBEN, 1982; MAGNUS et al., 1986).

GORDON & AHMAD (1991) declararam que *E. faecium* pode sobreviver ao cozimento a 68°C por 30 minutos durante a produção de salsicha tipo “frankfurter”. Além disso, existe grande potencial de recontaminação com enterococos, tanto em produtos crus quanto em produtos apropriadamente cozidos, de fontes intestinais e ambientais. Portanto, as ostras se constituem em importantes fontes de contaminação, uma vez que são consumidas quase sempre cruas e são provenientes na maioria das vezes, de ambientes contaminados.

2.4.7 Bacteriocinas

As bacteriocinas constituem um grupo específico de substâncias bactericidas, que semelhante aos antibióticos, são altamente específicas, tanto quanto à natureza do microrganismo produtor, quanto à dos germes sobre os quais são letais.

A maior utilidade das bacteriocinas para o homem é constatada quando presentes nos alimentos. Um exemplo é o caso dos lactobacilos no iogurte, os quais se encarregam de produzir bacteriocinas, restringindo assim o número de contaminantes. NIELSEN et al., 1990 citam que a efetividade das bacteriocinas



parece depender da concentração das mesmas e do número de microrganismos alvos presentes na amostra.

As primeiras bacteriocinas descritas foram as colicinas, ativas contra *E. coli*, sendo produzidas também por determinadas cepas de *E. coli* e algumas enterobactérias, sendo hoje, a bacteriocina mais intensamente pesquisada. Outras bacteriocinas foram denominadas em função dos microrganismos produtores, como a aerocina (*Enterobacter aerogenes*), a perticina (*Yersinia pertis*) e a piocina (*Pseudomonas aeruginosa*) (PELCZAR, 1916).

Os métodos de antagonismo simultâneo ou direto, com ou sem inversão do ágar, podem ser utilizados para a avaliação preliminar de um grande número de culturas e envolvem o crescimento da cultura indicadora simultaneamente com o da cultura produtora. Nestas técnicas, a cultura produtora é inoculada em forma de pontos ou de estrias na superfície de ágar sólido contido em placas de Petri inundado com ágar semi-sólido, previamente inoculado com a cepa indicadora. Após o período de incubação nas condições ótimas das culturas, a formação de halos de inibição ao redor dos pontos ou de das estrias indicam a presença de substâncias inibitórias (KÉKESSY & PIGUET, 1970; SHILLINGER & LÜCKE, 1989).

Variações dessa técnica incluem uso de discos de ágar (RYSER & RYCHARD, 1992), estrias perpendiculares (KÉKESSY & PIGUET, 1970; TAGG, et al., 1976), membranas hidrofóbicas (RYSER & RYCHARD, 1992) de poços (TAGG & MCGIVEN, 1971; SCHILLINGER & LÜCKE, 1989).



Espécies de enterococos, incluindo *E. faecium* e *E. faecalis*, são conhecidas por produzirem bacteriocinas, que são chamadas de enterocinas e geralmente pertencem a classe dos não-lantibióticos (FRANZ et al., 1999).

As enterocinas são geralmente ativas contra enterococos, tanto quanto contra espécies de *Listeria monocytogenes* (GIRAFFA, 1995). A atividade anti-*Listeria* pode ser explicada pelo fato de que enterococos e listeria são estritamente filogenéticos (DEVRIESE & POT, 1995).

Algumas enterocinas são ativas contra BAL, assim como contra *Clostridium spp.*, incluindo *C. botulinum*, *C. perfringens* e *C. tyrobutyricum* (TORRI TARELLI et al., 1994; FRANZ et al., 1996).

Os enterococos bacteriocinogênicos têm sido isolados de uma variedade de fontes, incluindo carnes fermentadas (AYMERICH et al., 1996; CASUS et al., 1997), produtos leiteiros (OLASUPO et al., 1994; TORRI TARELLI et al., 1994; VLAEMYNCK et al., 1994; FARIAS et al., 1996), e vegetais (McKAY, 1990; VILLANI et al., 1993; FRANZ et al., 1996).



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram realizadas 30 coletas em duas barracas na Praia do Futuro: A e B. Cada coleta correspondeu a duas amostras de ostras. O número de indivíduos em cada amostra era de aproximadamente 25, totalizando assim a análise de ± 1500 ostras.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC) , para a realização das análises microbiológicas.

3.2 DILUIÇÕES

As ostras, depois de passarem pelo processo de limpeza com lavagem em água corrente, foram abertas assepticamente, pesadas 50 g de carne e homogeneizadas com 450 mL de salina a 0,85%, sendo esta correspondente à diluição 10^{-1} . As demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}) também foram feitas com salina a 0,85%.



3.3 NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES FECAIS OU TERMOTOLERANTES

O NMP para coliformes fecais ou termotolerantes foi determinado através da técnica de fermentação em tubos múltiplos, segundo FENG, et.al.,(2002). O exame foi processado em três etapas distintas: prova presuntiva, confirmatória e completa ou bioquímica, sendo o método baseado em probabilidade, usada para se obter uma estimativa do NMP (Fig. 1).

3.3.1 Prova Presuntiva

Para o teste presuntivo foram utilizadas sequências de três tubos contendo diluições variando de 10^{-1} a 10^{-6} , inoculadas em caldo Lauryl Triptose-Difco com tubos de Durham invertidos.

A partir da homogeneização da amostra (diluição 10^{-1}) foram feitas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}) com salina 0,85%. Todos os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas. Após este período, os tubos que apresentassem reação positiva (meio turvo e produção de gás com formação de bolha) foram submetidos aos demais testes (JAKABI & FRANCO, 1991).



3.3.2 Prova Confirmatória

De cada tubo que apresentou resultado positivo no teste presuntivo, foram inoculados novos tubos contendo caldo EC-Difco, com tubos de Durham invertidos, os quais foram incubados a 45°C por 24 horas. A prova foi considerada positiva nos tubos onde houve turvação do meio e produção de gás. O cálculo do NMP foi feito através da consulta à tabela do NMP (GARTHRIGHT, 2001).

3.3.3 Prova Completa

De cada tubo contendo caldo EC, com resultado positivo, foi retirada uma alçada e transferida para placas do meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB)-Difco, através de um estriamento sobre a superfície, sendo então incubados em estufa a 35°C por 24 horas. Após esse tempo de incubação, foram isoladas em Tryptic Soy Agar (TSA)-Difco inclinado, três colônias de cada placa, as quais foram crescidas, por 24 horas, em estufa a 35°C. A cultura crescida em TSA foi usada para identificação morfológica (coloração de Gram) e para as provas bioquímicas.



3.3.4 Provas Bioquímicas

Segundo SOARES et al. (1987), a identificação de um tipo de bactéria, requer a observação e interação de uma variedade de características, sejam estas morfológicas, bioquímicas, sorológicas, etc. Porém não é necessário o exame de todas as características, pois para cada grupo de bactérias, existem dados relativos à sua caracterização de maior importância em relação a outras. Para as bactérias, o estudo de suas características bioquímicas é o mais importante, e para se justificar a origem dos coliformes, foi realizado o método IMVIC, o qual consiste no teste do Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e teste do Citrato.

➤ Prova de Produção de Indol

A partir do crescimento de cepas no meio TSA, foi retirada uma alíquota do cultivo, com a utilização de uma agulha previamente flambada e esfriada e então, foi perfurado o meio ágar SIM-Difco, o qual foi mantido em estufa por 48 horas a 35°C. Uma turvação uniforme a partir dessa picada no meio SIM, indica motilidade .

A bactéria *E. coli* utiliza o triptofano, para a produção de indol, que ao reagir com 0,2 mL do reativo 4-dimetilaminobenzaldeído (KOVACS), que foi adicionado ao meio, forma um anel róseo, indicando prova positiva (FENG, et al.,2002).



➤ Prova de Utilização do Citrato de Simmons

Da cepa crescida em TSA, foi retirada uma alíquota com uma alça de níquel cromo, previamente flambada e então, foi realizado um estriamento sobre o meio inclinado de ágar Citrato de Simmons-Difco. Após 96 horas em estufa a 35°C, algumas bactérias utilizam o citrato como única fonte de carbono, os quais provocam a elevação do pH do meio de cultivo devido à metabolização do íon citrato. O crescimento é indicado pela mudança na coloração do meio, principalmente no ápice que se torna azul intenso, (FENG, et al.,2002). A *E.coli* é negativa para esta prova.

➤ Prova do Vermelho de Metila (VM)

Para a realização desta prova, foi retirada uma alíquota da cepa crescida em TSA com uma alça de níquel cromo que foi então adicionada ao caldo VM-VP-Difco, e incubada por 96 horas a 35°C.

Esta prova testa a habilidade de certos microrganismos de produzirem e manterem estáveis, produtos ácidos finais da fermentação da glicose (SIQUEIRA, 1995). Após o período de incubação, são adicionadas 5 gotas do reagente Vermelho de Metila que indica o resultado da prova. A viragem de cor vermelha, resulta em prova positiva (FENG, et al., 2002). A *E. coli* é positiva para esta prova.



➤ Prova de Voges Proskauer (VP)

Esta prova testa a habilidade de certos microrganismos em produzirem um produto final neutro, acetilmetilcarbinol, durante a fermentação da glicose (SIQUEIRA, 1995).

Da mesma cepa obtida no TSA, foi retirada uma alíquota com a alça de níquel cromo e adicionada ao caldo VM-VP-Difco, posteriormente, incubado por 48 horas a 35°C. Após o período de incubação, foi adicionado para cada mL do meio, 0,6 mL do reagente Barrit I e 0,2 mL do reagente Barrit II. O desenvolvimento de uma coloração rósea a vermelho rubro, indica prova VP positiva(FENG, et al, 2002). A *E. coli* é positiva para esta prova.

3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Após isoladas e identificadas, as cepas de *E. coli* foram enviadas para a FIOCRUZ e analisadas frente a 12 drogas antimicrobianas (NCCLS, 1999). Os antimicrobianos empregados foram: ampicilina (AMP), ceftriaxon (CRO), ciprofloxacina (CIP), imipenem (IMP), cefradina (CN), cloranfenicol (CLO),



tetraciclina (TE), cefalotina (CEP), cefoxitina (FOX); ácido nalidíxico (NA), sulfametoxazol trimetoprim (SXT), nitrofurantoína (NIT).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados de NMP foram convertidos para uma escala logarítima de base decimal para a realização da análise estatística. Para testar a existência de correlação entre os parâmetros foi feita regressão e aplicada análise de variância (ANOVA). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

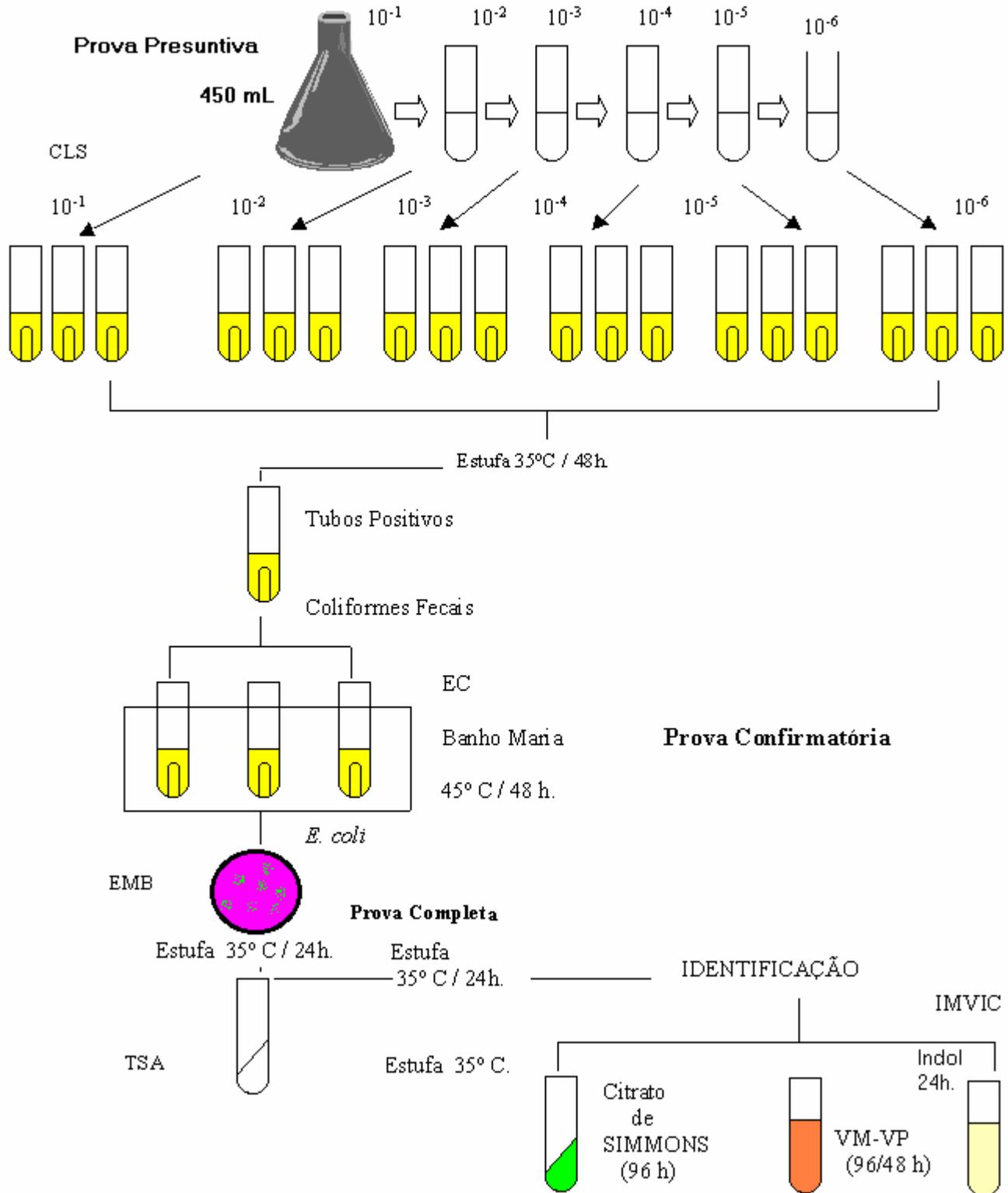


Figura 1: Esquema para quantificação e identificação de coliformes fecais ou termotolerantes isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras comercializadas nas barracas da Praia do Futuro (Fortaleza, Ceará).



3.6 NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE *Enterococcus* spp.

A estimativa do NMP de enterococos foi também realizada através da técnica de tubos múltiplos proposta pelo Bergey's manual (BRENNER, 1984) utilizando o caldo Dextrose Azida-Difco e o Ágar M-enterococcus-Difco.

O exame foi processado em três etapas distintas: prova presuntiva, prova confirmatória e isolamento e identificação.

3.6.1 Prova presuntiva

Para o teste presuntivo, foram utilizadas sequência de três tubos contendo diluições variando de 10^{-1} a 10^{-3} , inoculadas em caldo Azida Dextrose e incubados por 48 horas a 35°C . Após esse período foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação(Figura 2).

3.6.2 Prova Confirmatória



Em seguida, cada tubo positivo foi inoculado por estriamento em placas contendo o ágar M-Enterococcus-Difco e incubado por 48 horas a 35°. Foram consideradas positivas as placas que apresentaram colônias pequenas e de cor vermelha.

A estimativa do número de enterococos é feita levando-se para a tabela a combinação de placas de M-Enterococcus com crescimento característico (BRENNER, 1984).

3.6.3 Isolamento e Identificação

As colônias típicas de enterococos isoladas sobre o ágar M-Enterococcus foram submetidas a testes de confirmação partindo de crescimento em caldo Infusão Cérebro Coração-Difco (BHI), incubados a 35°C, por 18-24 horas (SILVA et al., 1997; FACKLAM, 1999).

As provas realizadas foram as seguintes:

➤ **Teste de Crescimento em 6,5% de NaCl**



Foi inoculado uma alçada da cultura em tubos com caldo BHI-Difco contendo 6,5% de NaCl e incubados a 35°C por 72 horas. O resultado positivo é constatado pela turvação do meio. A maioria dos enterococos crescem em 6,5% de NaCl .

➤ **Teste de Crescimento nas Temperaturas de 10 e 45° C**

Foi inoculado uma alçada da cultura em dois tubos de caldo BHI e em seguida, foram incubados, um tubo a 10°C por 10 dias e o outro a 45°C por 72 horas. O resultado positivo é observado pela turvação do meio. Todos os enterococos crescem a 45°C e a maioria cresce a 10°C.

➤ **Prova da Catalase**

Após a incubação dos meios teste, foi utilizada a cultura em BHI para coloração de Gram e para o teste de catalase.

Foi adicionado ao tubo de cultura, 1 mL de peróxido de hidrogênio 3%. O borbulhamento imediato indica teste positivo. Os enterococos são cocos Gram positivos, arranjados em pares ou pequenas cadeias, catalase negativos.

➤ **Crescimento em 0,04% de Telurito**

A partir das culturas de 24 horas a 35°C em ágar BHI, cada cepa foi inoculada em tubos contendo o caldo BHI acrescido de 0,04% de telurito. A reação positiva é



indicada pelo escurecimento do meio. Dentre os enterococos, apenas o *E. faecalis* tolera o telurito.

➤ **Crescimento em pH 9,6**

A partir das culturas de 24 horas a 35°C em ágar BHI, foi inoculado cada cepa em tubos contendo o caldo BHI em pH 9,6. A reação positiva é indicada pela turvação do meio. Todos os enterococos crescem em pH 9,6.

➤ **Prova para dihidroxilação de arginina**

As culturas crescidas por 24 horas a 35°C em ágar BHI, foram inoculadas em tubos contendo o meio basal os quais foram então, posteriormente, adicionados de arginina, e acrescidos de 1 cm de óleo mineral. Paralelamente, cada cepa foi inoculada em um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem qualquer aminoácido (controle) e então procedeu-se a incubação dos tubos a 35°C por 4-5 dias.

O meio inoculado se torna amarelo como resultado da produção de ácido oriundo da glicose existente no meio basal.

Na reação positiva, o meio se torna alcalino, de cor púrpura e, o tubo de controle permanece ácido, de cor amarela.

➤ **Fermentação de Carboidratos: Sacarose, Arabinose e Manitol**



A partir das culturas de 24 horas a 35°C em ágar BHI, cada cepa foi inoculada em tubos contendo caldo Púrpura de Bromocresol-Difco, pH 7.0, acrescido de sacarose, arabinose e manitol, separadamente. Após inoculação, os tubos foram incubados a 35°C por 4-5 dias. A reação ácida é visualizada através da mudança na cor do carboidrato, de púrpura para amarelo.

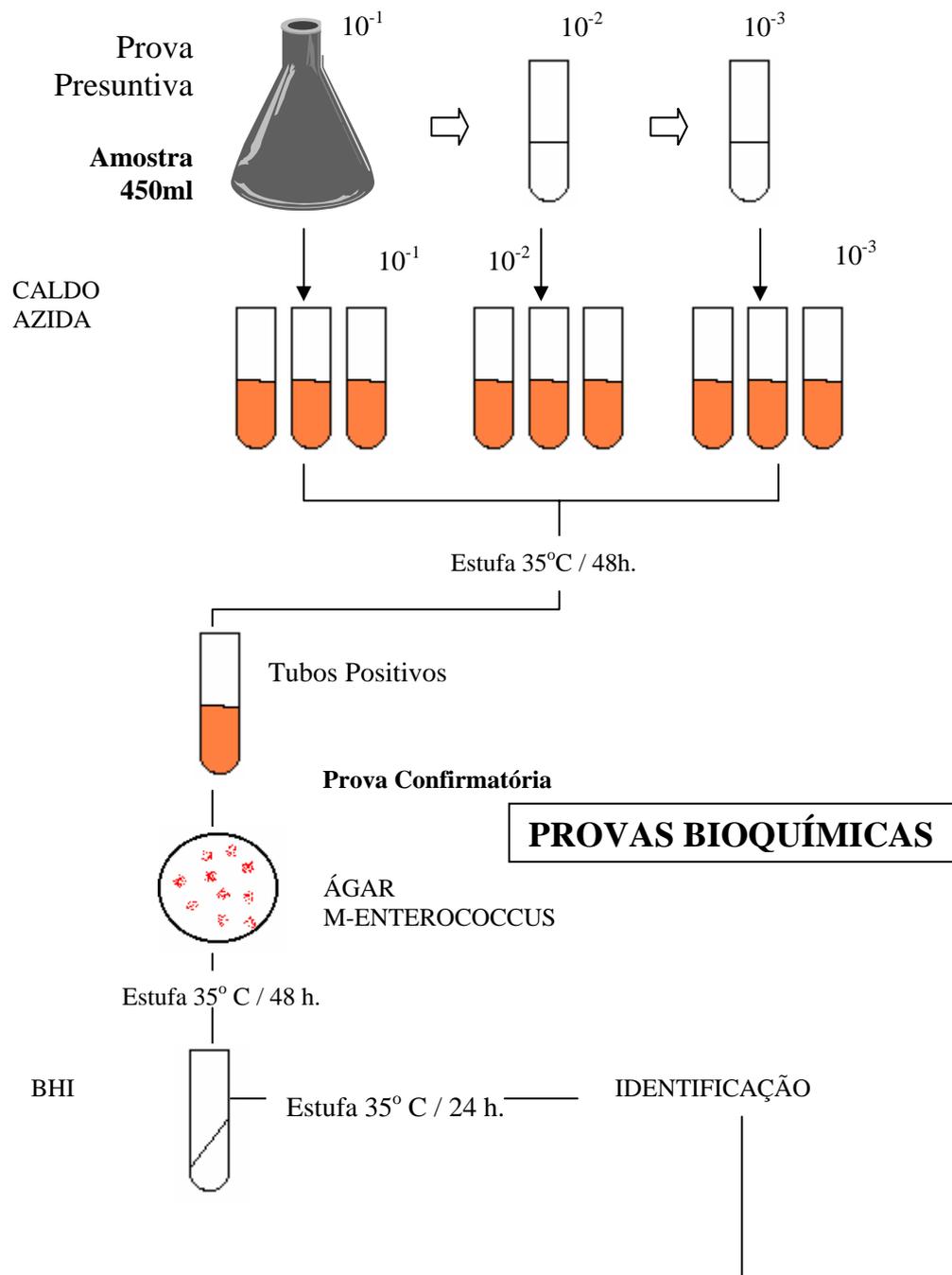


Figura 2: Esquema para quantificação e identificação de cepas de *Enterococcus* spp. isoladas do músculo e líquido intervalvar de ostras comercializadas nas barracas da Praia do Futuro (Fortaleza, Ceará).



3.6.4 Produção de Bacteriocinas

A verificação da capacidade de produção de bacteriocinas pelas cepas do gênero *Enterococcus*, isoladas das amostras de ostras foi realizada baseada na técnica de GRATIA (1946) descrita por KEKESY & PIGUET (1970).

As cepas crescidas em ágar BHI foram inoculadas sobre a superfície de ágar Triptona de Soja (TSA) em placas. Após crescimento a 35°C por 24 horas, elas foram eliminadas com o uso de vapores de clorofórmio.

No passo seguinte, foi colocada uma segunda camada de ágar semi-sólido, inoculado com uma cepa indicadora (*Escherichia coli* ATCC 25922), sobre a primeira e novamente as placas foram incubadas por 24 horas a 35°.

Um resultado positivo pode ser visualizado pela formação de uma zona clara, sem crescimento de bactérias, na segunda camada de ágar.

Essa técnica baseia-se no fato de que as bacteriocinas produzidas podem se difundir em meio de cultura sólido ou semi-sólido, sendo possível, a visualização através de um halo. Esta inibição de crescimento se dá através do uso de uma cepa indicadora.



* Todos os meios utilizados no presente trabalho têm sua fórmula e modo de preparar descritos nos Anexos I e II.

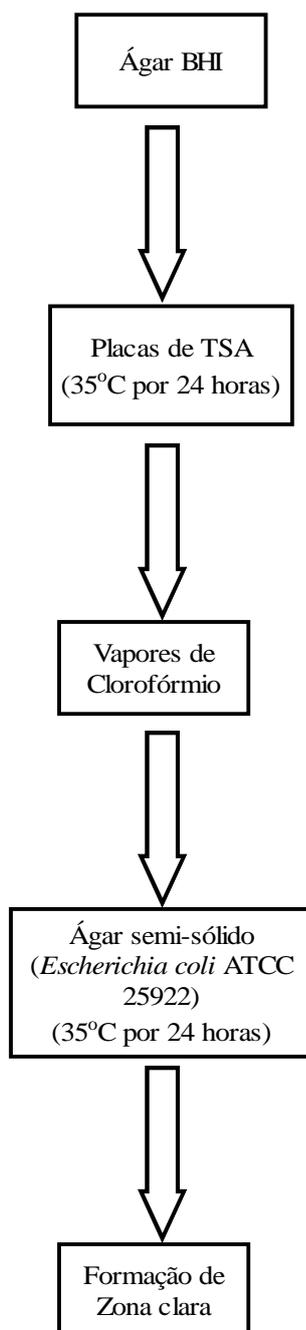


Figura 3: Fluxograma para investigação da produção de bacteriocinas sintetizadas por cepas de *Enterococcus* spp. isoladas do músculo e líquido intervalvar de ostras comercializadas nas barracas da Praia do Futuro(Fortaleza ,Ceará).



4 RESULTADOS

De acordo com a metodologia citada e seguindo o exposto no item anterior foram obtidos os resultados que serão apresentados em seguida:

1. Os NMPs de Enterococos para as amostras de ostras coletadas na Barraca A variaram de $<3,0$ a $>1100/g$, enquanto os detectados nas amostras da Barraca B ficaram entre $3,0$ e $>1100/g$ (Tabela I).
2. Para coliformes fecais ou termotolerantes, os valores encontrados para as amostras foram de $<3,0$ a $9300/g$ e $<3,0$ a $>110000/g$ para as Barracas A e B, respectivamente (Tabela I).
3. Os NMPs de enterococos e coliformes fecais ou termotolerantes, logaritmizados, do músculo e líquido intervalvar das ostras, ao longo das 30 coletas, nas Barracas A e B, podem ser visualizados, respectivamente, nas Figuras 4 e 5.
4. Não houve correlação estatística entre os NMPs de coliformes fecais ou termotolerantes e *Enterococcus* nas amostras do músculo e líquido intervalvar das ostras comercializadas nas duas barracas da Praia do Futuro (Tabela II).



5. Foram confirmadas nas amostras de ostras da Barraca A: 56 cepas (82%) de *E. coli*, 12 (17%) de *Enterobacter* e 1 (1%) de *Citrobacter* (Figura 6), enquanto que, na Barraca B, das 63 cepas isoladas das amostras, foram confirmadas 40 (63%) de *E. coli*, 19 (30%) de *Enterobacter*, 3 cepas (5%) de *Citrobacter* e 1 (2%) de *Klebsiella* (Figura 7).

6. As cepas de *Escherichia coli* isoladas do músculo e líquido intervalvar das ostras coletadas da Barraca A foram sensíveis ao antimicrobianos: CIP, CN, CRO, FOX, IMP, NA e SXT, enquanto que 70% apresentaram resistência a ampicilina (Tabela III) .

7. Na Barraca B, as maiores sensibilidades (100%) das cepas de *E.coli* foram detectadas aos antimicrobianos CRO, CIP, CN, FOX, F, IMP, NA. e NIT. Com relação à resistência a ampicilina, o resultado foi similar ao da Barraca A (Tabelas IV).

8. Na Barraca A, das amostras, foram confirmadas 90 (71%) cepas de *E. faecalis* ; 8 (6%) cepas *E. hirae* ; 2 (2%) cepas de *E. mundtii*; e 1 (1%) cepa de *E. durans*. Os resultados das provas bioquímicas das 25 cepas restantes não coincidiram com, no mínimo, 80% das espécies do gênero *Enterococcus* (Figura 8).

9. Na Barraca B, das amostras, foram confirmadas 76 (63%) cepas de *E. faecalis*; 5 (4%) cepas de *E. hirae*; e 2 (2%) cepas de *E. mundtii*. Os resultados das



provas bioquímicas das 37 cepas restantes não coincidiram com, no mínimo, 80% das espécies do gênero *Enterococcus* (Figura 9).

10. Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, nenhuma das cepas, das diferentes espécies de *Enterococcus*spp. testadas, mostrou capacidade de produzir substâncias inibidoras do crescimento da bactéria.



Tabela I: Número Mais Provável de coliformes fecais ou termotolerantes e enterococos no músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas em duas barracas da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

COLETAS	Coliformes fecais		Enterococos	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
1 ^a	3,6	4300	3,6	240
2 ^a	230	9300	43	240
3 ^a	230	230	> 1100	93
4 ^a	930	2300	460	15
5 ^a	3,6	150	240	9,2
6 ^a	93	230	3,6	9,2
7 ^a	40	3,6	9,2	15
8 ^a	930	930	3,6	3,6
9 ^a	< 3	< 3	3,6	3,6
10 ^a	93	> 110000	< 3	7,4
11 ^a	3,6	93	< 3	9,2
12 ^a	430	93	20	43
13 ^a	93	230	3,6	9,2
14 ^a	23	2300	9,2	9,2
15 ^a	43	93	29	21
16 ^a	750	1500	> 1100	240
17 ^a	2300	93	9,2	3,0
18 ^a	150	930	460	460
19 ^a	43	93	43	43
20 ^a	23	75	23	3,6
21 ^a	3,6	43	< 3	3,6
22 ^a	43	1500	240	9,2
23 ^a	150	93	7,4	7,4
24 ^a	240	9,2	43	23
25 ^a	3,6	93	23	9,2
26 ^a	430	23	93	23
27 ^a	9300	< 3	> 1100	> 1100
28 ^a	< 3	< 3	3,6	3,6
29 ^a	23	3,6	> 1100	> 1100
30 ^a	9,2	3,6	> 1100	43



Tabela II: Significância dos coeficientes de correlação parcial para os índices de indicadores de contaminação no músculo e líquido intervalvar das ostras (*Crassostrea rhizophorae*) coletadas na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

	<i>Enterococcus spp.</i>
Coliformes fecais	Barraca A 0,0667
Coliformes fecais	Barraca B 0,9529

* existe correlação em $p < 0,05$



21	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
22	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
23	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
24	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP = Ampicilina; CLO = Cloranfenicol; TE = Tetraciclina; CEP = Cefalotina; FOX = Cefoxitina; CRO = Ceftriaxon; CIP = Ciprofloxacina; IMP = Imipenem; NA = Ácido nalidíxico; CN = Cefradina, SXT = sulfametoxazol trimetoprim; NIT = nitrofurantoína
R = Resistente, I = Intermediário, S = Sensível

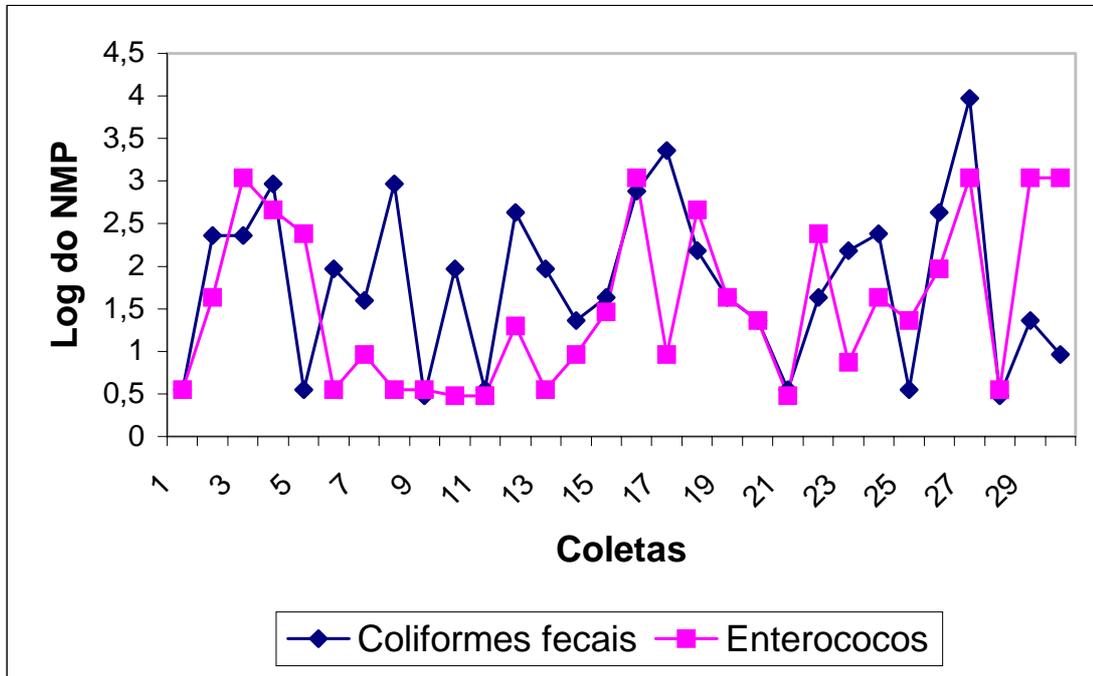


FIGURA 4: Log do NMP de coliformes fecais ou termotolerantes e de enterococos das amostras do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca A, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

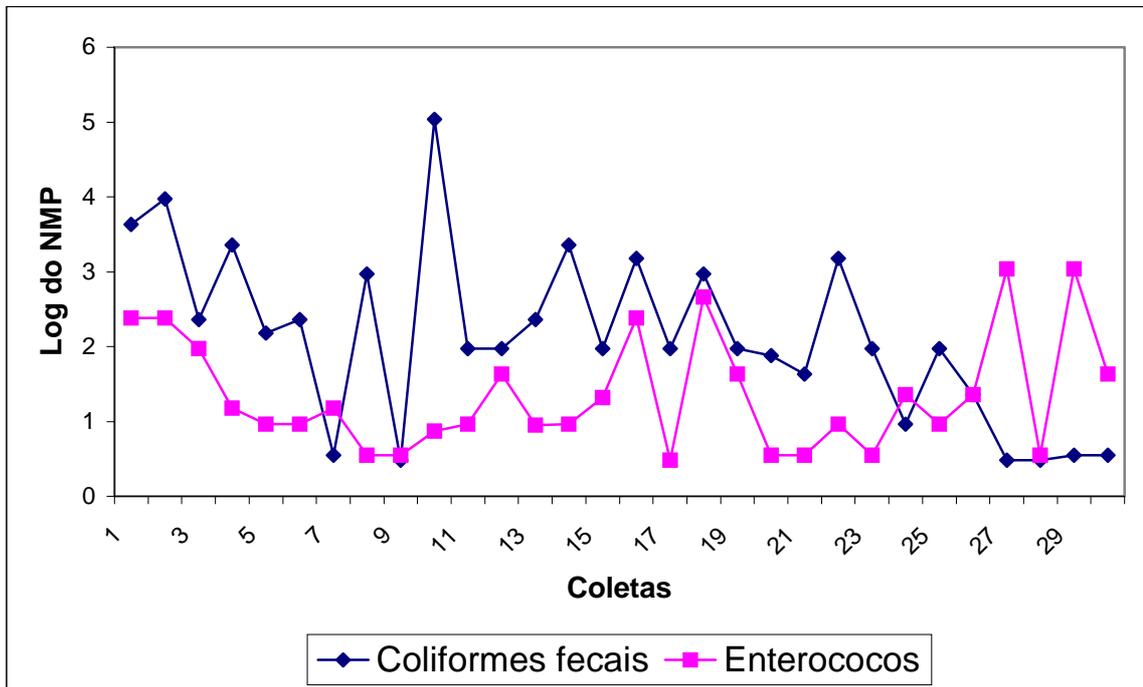
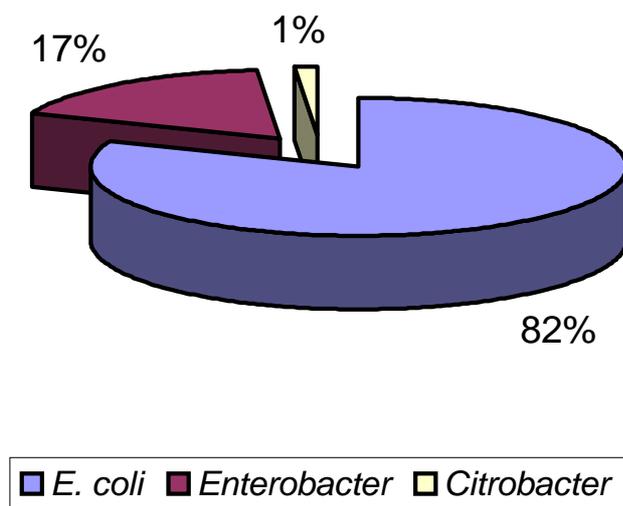


FIGURA 5: Log do NMP de coliformes fecais ou termotolerantes e de enterococos das amostras do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.



.Figura 6: Percentual de Coliformes Fecais ou termotolerantes isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca A, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

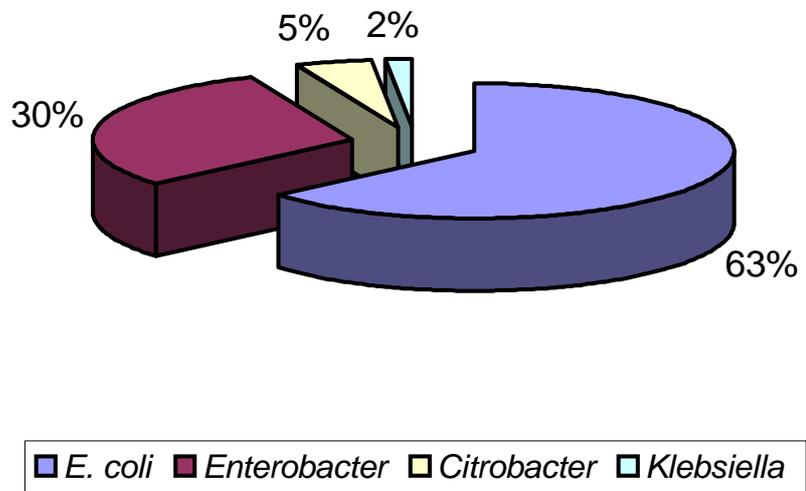


Figura 7: Percentual de Coliformes Fecais ou termotolerantes isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

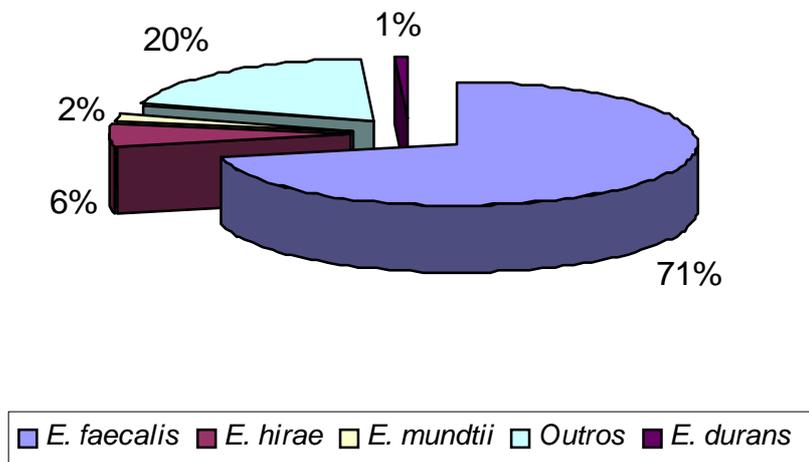


Figura 8: Percentual de *Enterococcus* isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca A, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.

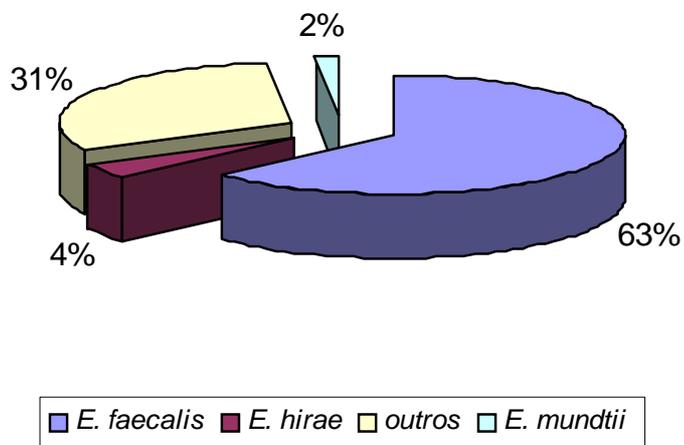


Figura 9: Percentual de *Enterococcus* isolados do músculo e líquido intervalvar de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) comercializadas na Barraca B, da Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará.



5. DISCUSSÃO

As amostras do músculo e líquido intervalvar das ostras comercializadas nas duas barracas na Praia do Futuro apresentaram altos níveis de contaminação de enterococos. Os valores de enterococos para as amostras coletadas na Barraca A se mostraram dentro dos intervalos de <3 a >1100/g, enquanto que, na Barraca B esses valores ficaram nos intervalos de 3,0 a >1100/g (Tabela I).

Apesar de não existirem padrões de enterococos para ostras na legislação brasileira, a presença desse grupo nas amostras, em níveis elevados, confirma o alto grau de contaminação das águas por esgotos domésticos. HAGLER et al. (1986) sugeriram o uso do grupo enterococos como uma alternativa efetiva para indicadores microbiológicos de contaminação fecal em águas superficiais marinhas tropicais e subtropicais. A agência americana de proteção ambiental (USEPA) recomenda o uso desse grupo para avaliação da contaminação fecal em águas marinhas e estuarinas (GRAY, 1999).

Do total das amostras de ostras analisadas (Tabela I) 40% na Barraca A e 43% na Barraca B mostraram valores de coliformes fecais ou termotolerantes acima de 10^2 /g. No entanto, os padrões estabelecidos pela Resolução 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2001) não regulam bivalves “*in natura*” que serão consumidos crus. Porque ostras são moluscos que normalmente são ingeridos sem nenhum cozimento, pode-se valer do artigo 22, alínea d, da



mesma resolução (limites bacteriológicos para pratos que serão consumidos prontos) nos quais os índices máximos aceitáveis para coliformes são de $10^2/g$. É estranho, verificar-se que a resolução acima citada, tenha retirado os índices microbiológicos para bivalves “in natura” crus da Portaria anterior, nº 451 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997) a qual especificava limites bacteriológicos para o alimento em questão (o item IV, alínea “a”), inclusive para coliformes fecais. E ainda mais, porque na Resolução 20 (CONAMA, 1986), Art.10, alínea h, nenhuma água destinada a criação natural ou intensiva de espécies destinada à alimentação humana e que serão ingeridas cruas, deverão exceder 14 coliformes fecais por 100 mililitros. Essa Resolução não se aplica aos presentes resultados, porque nele foi estudada a ostra e não a água, entretanto, serve de chamada para a necessidade de padrões claros para moluscos “in natura” que serão consumidos crus.

Segundo MACHADO et al. (2000), a tarefa de se estabelecer normas para a oferta de moluscos ao consumo humano não é simples, especialmente quando se considera que o Brasil não tem tradição como produtor desse tipo de alimento .

Segundo WOOD (1996), a colimetria de águas provenientes de áreas onde são coletados bivalves destinados ao consumo, se constitui subsídio científico útil para as autoridades sanitárias envolvidas na fiscalização e controle da qualidade desses alimentos, tendo em vista que é um motivo de preocupação o hábito dos consumidores de moluscos ingerí-los crus ou mal cozidos,



Na presente pesquisa os resultados para NMP de coliformes e enterococos não apresentaram correlação estatística ($P < 0,05$) (Figura 4 e 5, Tabela II).

Os valores do NMP de coliformes fecais ou termotolerantes foram quase sempre superiores aos do NMP de *Enterococcus* (Tabela I). Isso pode ser explicado pelo fato de que as ostras eram analisadas no momento em que chegavam nas barracas, ou seja, sem resfriamento prévio. Segundo (JAY, 1991b), os *Enterococcus* são encontrados em maiores números em relação aos coliformes, quando alimentos congelados são analisados.

A regulamentação da atividade de produção de moluscos bivalves por extração, manejo ou cultivo é realizada, em muitos países, através da análise da água dos locais de origem destes organismos, podendo a influência de fatores como correntes, ventos, chuvas, etc na dinâmica das zonas costeiras e estuarinas promover a variabilidade dos níveis de coliformes nessas águas (MACHADO, et al., 2000). Essas interferências, segundo os autores, mostra a inadequação desse parâmetro como principal, único ou referencial para normatização da atividade, podendo a qualidade da água das áreas produtoras ser utilizada como uma informação adicional.

No estudo de 376 amostras de vegetais congelados, BURTON (1949) verificou que os coliformes foram indicadores de sanitização mais eficientes que os *Enterococcus* antes do congelamento, enquanto os *Enterococcus* foram indicadores superiores depois do congelamento e armazenamento. Em amostras armazenadas



a – 20°C por 1 a 3 meses, 81% dos *Enterococcus* e 75% de coliformes sobreviveram.

Tanto os CF (*Escherichia coli*) como os *Enterococcus*, podem ser considerados indicadores de níveis gerais de higiene e qualidade (MAGGI & CENSI, 1988).

JAY (1991b) avaliando as duas bactérias como indicadores da qualidade sanitária de alimentos constatou que os coliformes são mais fáceis de serem isolados e identificados, além de estarem mais relacionados a infecções intestinais do que os *Enterococcus*, embora esses últimos sejam mais resistentes às condições ambientais adversas, ao congelamento e sobreviverem mais tempo em alimentos congelados.

As cepas isoladas das amostras de ostras de ambas as barracas foram submetidas a identificação bioquímica sendo confirmadas na Barraca A: 56(82%) cepas de *E. coli*, sendo as restantes: *Enterobacter* e *Citrobacter* (Figura 6). O mesmo procedimento foi realizado para a Barraca B, onde foram confirmadas 40(63%) cepas de *E. coli* e mais: *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (Figura 7).

Segundo FRANCO (1976), a presença de *E. coli* está relacionada a surtos de gastroenterite, razão pela qual sua quantificação em alimentos reveste-se da maior importância.



CERRUTTI & BARBOSA (1991), analisando amostras de ostras e águas de uma baía, não encontraram relação na quantidade de enterobactérias entre as amostras. Afirmaram que enquanto a amostra de água fornece resultados no momento da coleta, a amostra de ostra informa sobre a integração total ou parcial do molusco com as condições bacteriológicas e ambientais das águas, antes da coleta.

Em um estudo com ostras (*Crassostrea virginica*) BURKHARDT III & CALCI (2000) encontraram níveis de CF nesses moluscos 4,4 vezes maiores que aqueles achados na água do estuário.

Segundo POMMEPUY et al. (1996) esse fato pode ser explicado pela manutenção da culturabilidade da *E. coli* e outras enterobactérias ingeridas pelos moluscos, enquanto as mesmas bactérias expostas a luz solar no ambiente marinho podem estar viáveis porém não cultiváveis levando a uma disparidade entre as contagens.

A determinação de coliformes de origem fecal nos tecidos moles e líquido intervalvar, para avaliar a qualidade dos moluscos, apresenta maiores possibilidades como padrão de normatização no cultivo, do que a análise da água das áreas produtivas (MACHADO et al., 2001).

As diversas cepas de *Escherichia coli*, isoladas das amostras de ostras, apresentaram um padrão de resistência múltiplo aos diferentes antimicrobianos testados.



As cepas de *E. coli* isoladas a partir das amostras do músculo e líquido intervalvar das ostras comercializadas na Barraca A apresentaram um percentual de 70% de resistência ao antimicrobiano ampicilina, enquanto que 100% se mostraram sensíveis aos antimicrobianos, cefoxitina, ceftriaxon, ciprofloxacina, imipenem, ácido nalidíxico, cefradina e sulfametoxazol trimetoprim. Com relação as demais drogas testadas, a sensibilidade foi variável (Tabela III).

Nas amostras da Barraca B, em relação à resistência a ampicilina, foram encontrados resultados semelhantes às isoladas da Barraca A. As maiores sensibilidades apresentadas pelas cepas isoladas das ostras comercializadas nessa barraca (100%) foram detectadas aos antimicrobianos cefoxitina, ceftriaxon, ciprofloxacina, imipenem, ácido nalidíxico, cefradina e nitrofurantoína, sendo variável a sensibilidade às demais drogas testadas (Tabela IV).

Coliformes antibiótico-resistentes podem ser importantes não só por sua potencialidade de patogenia como por transmitirem resistência para outras bactérias patogênicas (COOKE, 1985), podendo se converter em um problema de saúde Pública (JOHNSTON et al., 1983).

SILVA & HOFER (1995) descreveram *E. coli* isoladas de peixes marinhos capturados ao longo de praias da cidade do Rio de Janeiro, as quais apresentavam resistência a antibióticos e metais pesados.



A Figura 8 mostra a distribuição dos enterococos nas amostras de ostras após identificação bioquímica. Foram confirmados na Barraca A 90(71%) cepas de *E. faecalis*, 8(6%) cepas de *E. hirae*, 2(2%) cepas de *E. mundtii* e 1(1%) cepa de *E. durans*. Os resultados das provas bioquímicas das 25 cepas restantes não coincidiram com, no mínimo, 80% das espécies do gênero *Enterococcus* .

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras da Barraca B. Nesta foram confirmadas 76(63%) cepas de *E. faecalis*, 5(4%) de *E. hirae* e 2(2%) de *E. mundtii*. Os resultados das provas bioquímicas das 37 cepas restantes não coincidiram com, no mínimo, 80% das espécies do gênero *Enterococcus* (Figura 9).

Analisando os resultados encontrados nas amostras de ostras, tanto para *Escherichia coli* como para *Enterococcus*, constata-se que os primeiros representam maior perigo à saúde, em potencial, dos consumidores deste alimento. Isto por se apresentarem em maior número.

Das 246 cepas de *Enterococcus* spp. isoladas do músculo e líquido intervalvar das ostras comercializadas nas duas barracas e testadas para a produção de bacteriocinas, nenhuma cepa apresentou resultado positivo, isto é, inibição do crescimento da bactéria teste (*Escherichia coli* ATCC 25922).

DU TOIT et al (1999) analisando 92 cepas de enterococos isoladas de fezes de leitões, observaram que apenas 04 cepas de *E. faecalis* produziram ação inibitória contra outros *Enterococcus* spp.



LAUKOVÀ et al. (1993) e VIGNOLO et al. (1993) constataram em seus experimentos a inibição de bactérias gram-positivas por bacteriocinas produzidas por *Enterococcus faecium*. Diferente da presente pesquisa, quando testamos a ação bacteriocinogênica de *Enterococcus* spp., uma bactéria gram positiva contra *Escherichia coli*, uma bactéria Gram negativa.

Como alternativa para minimizar problemas de saúde relacionado ao consumo de moluscos contaminados, segere-se que as ostras passem por um processo de depuração natural antes de submetidas ao consumo humano, como acontece em muitos países. Além de diminuir as bactérias por ventura presentes na ostra, também vai reduzir seu teor de sílica o que melhorará sobremaneira, o saborear do alimento.

Porém, a segurança dos moluscos após a depuração depende do grau inicial de contaminação fecal e da qualidade da água na qual eles serão depurados(BELLA & TAM, 2000).



6 CONCLUSÕES

1. Há necessidade urgente de uma Legislação clara e específica, no Brasil, para moluscos que serão ingeridos crus.
2. Apesar de *Enterococcus* e coliformes fecais ou termotolerantes serem resultantes de contaminações fecais, os resultados referentes à quantificação desses indicadores não apresentaram correlação estatística significativa entre as estimativas de suas populações.
3. O marco de resistência a ampicilina (70% dos isolados das duas barracas) se constitui de importância em Saúde Pública, pois indica que há circulação de genes de resistência no músculo e líquido intervalvar das ostras comercializadas nas duas barracas estudadas da Praia do Futuro e que, oportunamente, poderão afetar o consumidores desse molusco.
4. *Enterococcus* spp. e coliformes fecais não competem quando infectam as ostras, fato comprovado quando foi testado o efeito bacteriocinogênico negativo daquelas, isoladas do músculo e líquido intervalvar das ostras, contra uma cepa ATCC de *Escherichia coli*.



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R. Safety of industrial lactic acid bacteria. **Journal of Biotechnology** Amsterdam, v. 68, p. 171-178, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 10 jun. 2002.

ALCAMO, I.E. Bacterial genetics. In: **Fundamentals of microbiology**. 4th ed. New York: Benjamim-cummings publishing, 1994. p. 153-190.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

AYMERICH, T. et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1676-1682, 1996.

BELLA, S.W.; TAM, T.Y. Natural depuration of shellfish for human consumption: a note of caution. **Water Research**, Oxford, v. 34, n.4, p. 1401-1406, 2000.

BLAIMONT, B.; CHARLIER, J.; WAUTERS, G. Comparative distribution of *Enterococcus* species in faeces and clinical samples. **Microbial Ecology in Health and Disease**, Oslo, v. 8, p. 87-92, 1995.

BOPP, C.A. et al. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R., et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7 ed. Washington: ASM, 1999. p. 459-482.

BRASIL. Decreto nº 1695, de 13 de novembro de 1995. Regulamenta a Exploração de Aqüicultura em Águas Públicas Pertencentes à União e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.lei.adv.br/1695-95.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2003.

BRASIL. Decreto-Lei n.º 74/90 de 07 de março de 1990. Aprova as normas de qualidade da água.< http://www.diramb.gov.pt/data/basedoc/FCH_1825_LN.htm>. Acesso em: 21 jan. 2003.



BRENNER, D.J. *Enterobacteriaceae*. In: KRIEG, N.R.; HOLTZ, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 409-423.

BURKHARDT III, W.; CALCI, R.C. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1375-1378, 2000.

BURTON, M. C. Comparison of coliform and *Enterococcus* organisms as indices of pollution in frozen foods. **Food Research**, Chicago, v. 14, p. 434-448, 1949.

CASUS, P. et al. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 143, p. 2287-2294, 1997.

CEBALLOS, B.S.O. **Utilização de indicadores microbiológicos na tipologia de ecossistemas aquáticos do trópico semi-árido**. 1995. 192 p. Tese (doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHENOWETH, C.; SCHABERG, D. The epidemiology of enterococci. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 9, n. 2, p. 80-89, Feb., 1990.

CHUNG, H., et al. Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oyster and their harvest waters. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 37-44, 1998.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação das águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 jul. 1986. Disponível em : <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.htm>>. Acesso em: 17 maio de 2002.

CONSTANTINIDO, G. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 32, p. 5-6, 1994.

COOK, D.W. et al. Molluscan shellfish: oyster, mussels and clams. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p. 507-514.



COOKE, E.M. *Escherichia coli* – na overview. **Journal of Hygiene**, New York, v. 95, p. 523-530, 1985.

COSTA, F.N.; LIMA, R.M.S.; RABELO, R.N. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n 92/93, p. 80-83, jan/fev, 2002.

De VAUX, A. et al. *Enterococcus asini*, sp. nov. isolated from the caecium of donkeys (*Equus asinus*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 383-387, Apr., 1998.

DEVRIESE, L.A.; POT, B. The genus *Enterococcus* In: WOOD, B.J.B., HOLZAPFEL, W.H. (Ed.). **The lactic acid bacteria**.. London: Blackie Academic, 1995. p. 327-367, 1995. v.2.

DEVRIESE, L.A. et al. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococci and streptococcal flora of dogs and cats. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, p. 421-425, 1992.

DEVRIESE, L.A. et al. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 247-252, Sep., 1990.

DEVRIESE, L.A.; COLLINS, M. D.; WIRTH, R. The genus *Enterococcus*.. In: BALOWS, A. et al. (Ed). **The procaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2nd ed. New York: Springer-verlag, 1992. p. 1465-1481. Cap. 66.

DEVRIESE, L.A.; POT, B.; COLLINS, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 399-408, 1993.

DOYLE, P.M.; CLIVER, D.O. *Escherichia coli*. In: CLIVER, D.O. (Ed). **Foodborne Diseases**. London: Academy Press, 1990. p. 209-215.

DUFOUR, A.P. *Escherichia coli*: the fecal coliform. In: HOADLEY, A.W., DUTKA, B.J (Ed). **Bacterial indicators/health hazards associated with water**. Philadelphia: American Society, 1977. p. 48-58.

DUTKA, B.J.; KWAN, K.K. Comparasion of eight media-procedures for recovering faecal streptococci from water under winter conditions. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 45, p. 333-340, 1978.



DU TOIT, M. et al. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 482-494, 2000.

EVANGELISTA, N.S.S. **Identificação de cepas de *E. coli* enteropatogênica nas praias de Fortaleza e fatores de virulência associados a elas.** 1998. 37 p. Monografia (Conclusão do curso de graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ceará.

FACKLAM, R.R.; SAHM, D.F.; TEIXEIRA, A.L.M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R., et al. (Ed). **Manual of Clinical Microbiology.** 7th ed. Washington: ASM, 1999. p. 297-305

FARÍAS, M.E. et al. Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL35, a "pediocin-like" bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 412-419, Jun., 1996.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Sept. 2002. In: Food and drug administration - FDA/CFSAN. **Bacteriological Analytical Manual on line.** Jan. 2001. Disponível em: < [http:// www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html)> Acesso em: 14 jan. 2003.

FERREIRA, A.J.P.; LEME, I.L. Enterococcias. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L.M. (Ed). **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 132-146.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food Code.** Washington, D.C.: U.S., Public Health Service, 1997.

FRANCO, B.D.G.M. Frequência de isolamento e propriedade de *Escherichia coli* enteropatogênica em alimentos. 1976. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996.182 p.

FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 1-24, 1999.



FRANZ, C.M.A.P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 255-270, 1996.

FUJIOKA, R.S. Indicators of marine recreational water quality. In: HURST, C. et al. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**, Washington: ASM, 1996. p. 176-183.

FUJIOKA, R.S.; TENNO, K; KANSAKO, S. Naturally occurring fecal coliforms and fecal streptococci in Hawaii's freshwater streams. **Toxicity Assessment**, New York, v. 3, n. 5, p. 613-630, Nov., 1988.

GARTHRIGHT, W.E. Appendix 2: most probable number from serial dilutions. In: Food and Drug Administration - FDA. **Bacteriological Analytical Manual on line**. FDA/CFSAN, 2001. Disponível em: < [http:// www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html)> Acesso em: 10 junho 2002.

GELDREICH, E.E.; KENNER, B.A. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. **Journal Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 41, p. 336-352, 1969.

GELLI, D.S.; TACHIBANA, T.; SAKUMA, M. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e bactérias mesófilas em ostras. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 39, n. 1 p. 61-66, 1979.

GERMANO, P.M.L. et al. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 27, p. 6-11, 1993.

GIRAFFA, G. Enterococcal Bacteriocins: Their potencial as anti-Listeria factors in dairy technology. **Food Microbiology**, London, v. 12, n. 4, p. 291-299, Aug., 1995.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam. v. 26, p. 163-171, 2002.

GONÇALVES, P.M.R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 53, p. 38-44, 1998.

GORDON, C.L.; AHMAD, M.H. Thermal susceptibility of *Streptococcus faecium* strains isolated from frankfurters. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, p. 609-612, 1991.

GRAY, D. Qualitative review of epidemiology studies. Proceedings regional beach program conferences. EPA, 1999. 205 p



HAGLER, A.N., et al. Microbial pollution indicators in brazilian tropical and subtropical marine surface waters. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 58, p. 151-160, 1986.

HAGLER, A.N; HAGLER, L.C.S.M. Microbiologia sanitária: indicadores microbiológicos de qualidade sanitária. In: **Tratado de Microbiologia**. ROITMAN, I. et al. (Ed). São Paulo: Manole, 1988., p. 83-102. v. 1.

HARDY, K.G. Colicinogeny and related phenomena. **Bacteriological Reviews**, Washigton, v. 39, p. 464-515, 1975.

HOUBEN, J.H. Heat resistance of *Streptococcus faecium* in pasteurized ham. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v. 62, p. 490-493, 1982.

HOUSER, L.S. National shellfish sanitation program. In: **Manual of Operations**. Part 1: Sanittion of shellfish growing areas. Washington, U.S. Departament of health, education and welfare, 1965. 142 p.

HUYCKE, M.M; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple drug resistant enterococci: the nature of the problem and agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, p. 239-249, 1998.

JAKABI, M.; FRANCO, B.D.G.M. Frequênicaia de isolamento de cepas de *E. coli* patogênicas em alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n 1, p. 170-181, 1991.

JAY, J.M. Foodborne gastroenteritis caused by *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia*. In: **Modern Food Microbiology**. 4th ed. Nova York: Van Nostrand Reinhold, 1991a. p. 553-582.

JAY, J. M. Indicators of food microbial quality and safety. **Modern Food Microbiology**, 4th ed., Nova York: Van Nostrand Reinhold, 1991b, p. 413-433.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 804 p.

JETT, B. D.; HUYKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, p. 462-478, 1994.

JOHNSTON, D.W.; BRUCE, J.; HILL, J. Incidence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in milk produced in the west of Scotland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 54, p. 77-83, 1983.



KEKESY, D.A.; PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. **Applied Microbiology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 282-283, 1970.

KIBBEY, H. J.; HAEGEDORN, C.; McCOY, E.L. Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 35, p. 711-717, 1978.

KUSHNER, G. J. Meat safety under fire. **Food Processing**, London, p. 17-20, 1993.

LIRA, A.A., et al. Aspectos sanitários do ambiente aquático onde são capturados moluscos bivalves para consumo no Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 77, p. 53-57, 2000.

LOW, D. E. et al. Enterococci: pathogens of the 90s. **European Journal of Surgery**, New York, v. 573, Suppl, p. 19-24, 1994.

MACHADO, I.C., et al. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia - SP, Brasil, como subsidio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliiana*). 1 – Avaliação da qualidade da água. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 72, p. 66-75, 2000.

MACHADO, I. C., et al. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia, como subsidio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliiana*). 2 – Análise da ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 44-48, 2001.

MAGGI, E.; CENSI, A. So-called bacterial indicators of fecal contamination. **Annali della facolta di medicina veterinaria**, Universaidade di Parma, v. 6, p. 205-215, 1988.

MAGNUS, C.A.; INGLENDREW, W.M.; McCURDY, A.R. Thermal resistance of streptococci isolated from pasteurized ham. **Journal de L Institut Canadien de Science et Technologie Alimentaires**, Ottawa, v. 19, n. 2, p. 62-67, 1986.

MAHON, C.R.; MANUSELIS JUNIOR, G. *Enterobacteriaceae*. In: **Textbook of Diagnostic Microbiology**. Philadelphia: W.B Saunders Company., 1995. p. 447-487. Cap. 16.

MALONE, D. A. et al. Enterococcal bacterimia in two larger communities teaching hospitals. **American Journal of Medicine**, New York, v. 81, n. 4, p. 601-606, 1986.

MARTINS, M. T., et al. Utilização de bactérias e fungos como indicadores na avaliação de fatores fisiológicos que interferem nos processos de auto-depuração de



um córrego sub-tropical. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 278-291, 1989.

McFETERS, G.A. et al. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. **Applied Microbiology**, Washington, v. 27, p. 823-829, 1974.

McKAY, A. M. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria spp.* **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 15-17, 1990.

MERMELSTEIN, N. H. Controlling *Escherichia coli* O157:H7 in meat. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 7, p. 90-91, Apr., 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Portaria MS nº 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 set. 1997. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/451_97.htm>. Acesso em : 10 jun. 2002.

MOHAMED HATHA, A.A.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, south India. **Food Microbiology**, London, v. 14, p. 111-116, 1997.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, Supp., p. 89-99, 1997.

MULLER, T. et al. Identification of plant-associated enterococci. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 268-278, 2001.

MUNDT, J.O; GRAHAM, W.F.; McCARTY, I.E. Spherical lactic acid-producing bacteria of southern-grown raw and processed vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 15, p. 303-308, 1967.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Journal of Clinical Microbiology. Reviews**, Washington, v. 3, n.1, p. 46-65, Jan., 1990.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh Informational Supplement M 100. NCCLS, Washington D.C, v. 1, n. 1, p. 123, 2001. Supplement 11.



NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 11, p. 142-201, 1998.

NIELSEN, J.W.; DICKSON, J.S.; CROUSE, J.D. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 2142-2145, 1990.

NIEMI, R.M. et al. Presumptive fecal streptococci in environmental samples characterized by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 2190-2196, 1993.

NOBLE, C.J. Carriage of group D streptococci in the human bowel. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 4, p. 1182-1186, 1978.

NUNES, A.J.P.; PARSONS, G.J. Dynamics of tropical coastal aquaculture systems and the consequences to waste probulation. **Word Aquaculture**, Los Angeles, v. 29, n. 2, p. 27-37, 1998.

OLASUPO, N.A. et al. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from "wara" – a fermented skimmed cow milk product from west Africa. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, p. 438-441, 1994.

PAIVA, C.P.; BORGES, R.G.; PANETTA, J.C. Frequência de quadros gastrointestinais em aeronautas: pressuposta ligação com toxinfecções alimentares. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 75, p. 13-23, 2000.

PARK, Y.J. et al. Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *Enterococcus faecium* polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 34, 269-273, 1999.

PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas – SP, no período de 1987 – 1993. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 56, n. 1, p. 77-82, 1996.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1916. p. 448-449. v. 1.

POLAKOVA, et al. Occurrence of *Escherichia coli* with strains multi-resistance and transferable resistance to antibiotics in food-stuffs. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and immunology**, Prague, v. 16, p. 467-472, 1972.



PODUVAL, R.D. et al. Intraabdominal vancomycin-resistant enterococcus infections: the new threat. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 32, p. 333-335, 2001.

POMMEPUY, M., et al. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4621-4626, 1996.

RIEDEL, G. Transmissão de doenças pelos alimentos. In: **Controle Sanitário dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1992. p. 51-129.

RUOFF, K. L. Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 9, p. 75-79, 1990.

RYSER, E.T.; RICHARD, J.A. Detection of bacteriocin activity in bacteria using hydrophobic grid membrane filters. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 14, n 3, p. 104-107, 1992.

SANTOS, E. **Moluscos do Brasil: vida e costumes**.. Belo Horizonte: Itatiaia, 1982. 141 p. (Série Zoologia brasileira).

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F.K. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1901-1906, 1989.

SCHLEIFER, K.H.; KILLPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, p. 31-34, 1984.

SILVA, A.A.L.; HOFER, E. Resistance to antibiotics and heavy metals in *Escherichia coli*. **Environmental Toxicology and Water Research**, v. 8, p. 1-11, 1995.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Contagem de Enterococos. In: **Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela., 1997. p. 107-110. Cap. 14.

SIMJEE, S.; GILL, M.J. Gene transfer, gentamycin resistance and enterococci. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 36, p. 249-259, 1997.



SIQUEIRA, R.S. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: **Serviço de Produção de Informação – SPI**, 1995.

SOARES, J.B; CASEMIRO, A.R.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B. Metabolismo bacteriano – fermentação de carboidratos e outras provas bioquímicas. In: Juarez Braga Soares, et al. **Microbiologia Básica**. Fortaleza: Ed UFC, 1991, p. 123. Unid. 10.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washngiton, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TAGG, J.R.; MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocin. **Applied Microbiology**, Washington, v. 21, p. 943, 1971.

TAILOR, S.A.N.; BAILEY, E.M.; RYBAK, M.J. *Enterococcus*, as emerging pathogen. **The Annals of Pharmacotherapy**, Cincinnati, v. 27, n. 10, p. 1231-1242, Oct., 1993.

TEIXEIRA, L.M. et al. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1520-1523, 1995.

TEUBER, M.; PERRETEEN, V.; WIRSCHING, F. Antibiotikumresistente bakterien: une neue dimension in der lebensmittilmikrobiologie. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 29, p. 182-199, 1996.

TORRI TARELLI, G.; CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiology**, London, v. 11, p. 243-252, 1994.

TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

TURTURA, G.C.; MASSA, S.; GHAZVINIZADECH, H. Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from carcasses of commercially slaughtered chickens. . **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, n 3/4, p. 351-354, 1990.

ULRICH, A., MILLER, T. Heterogeneity of plant-associated streptococci as characterized by phenotypic features and restriction analysis of PCR – amplified 16S rDNA. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 293-303, 1998.

VIEIRA, R.H.S.F. Aspectos microbiológicos do pescado antes e depois de processado. In: FONTELLES FILHO, A.A., VIEIRA, R.H.S.F. (Ed). **Ciência e Tecnologia de Produtos Pesqueiros..** Saint John's: MUN Print, 1989. p. 1222-1272. V. 1.



VIGNOLO, G.M. et al. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 344-349, 1993.

VILLANI, F. et al. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes* **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 74, p. 380-387, 1993.

VLAEMYNCK, G.; HERMAN, L.; COUDIJZER, K. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 211-225, 1994.

WOOD, P.C. **Manual de higiene de los mariscos**. Ed. Acribia, 1996. 83 p

ZAMARIOLI, L.A., et al. Estudo microbiológico do tecido mole de bivalves *Crassostrea brasiliiana*, *Perna perna* e *Mytella Falcada* recém coletados nos bancos naturais do litoral da baixada santista. São Paulo. Secretaria. de Estado da Saúde. **Relatório Apresentado ao Grupo de Vigilância Sanitária DIR XIX**. São Paulo, 1997.



ANEXOS



ANEXO I

PROVA DE COLORAÇÃO DE GRAM (Segundo SOARES et al., 1991)

Esta prova utiliza cepas isoladas a partir de TSA inclinado com 24 horas de incubação, onde seguem-se os seguintes passos:

1 – Inicialmente faz-se um esfregaço fino:

- Com o auxílio de uma pinça, tomar uma lâmina de microscópio imersa em álcool;
- Colocar uma pequena gota de água destilada sobre a lâmina na parte central;
- Retirar assepticamente, com uma agulha de inoculação, uma porção do crescimento da cultura a ser analisada;
- Espalhar a massa celular na gota e em seguida fixar a preparação, passando a lâmina um pouco acima da chama do bico Bunsen (sem superaquecê-la).

2 – Cobrir o esfregaço com Cristal Violeta por 1 minuto;

3 – Lavar com água corrente;

4 – Cobrir o esfregaço com Lugol por 1 minuto;

5 – Descorar com álcool 95%;

6 – Lavar com água corrente;

7 – Contra-corar com Safranina 0,25% por 20 segundos;

8 – Lavar com água corrente e secar, absorvendo a água com lenço de papel;

9 – Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão.

OBS: Microrganismos Gram positivos: azuis ou violetas



Microrganismos Gram negativos: vermelhos.

ANEXO II

MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

1 – SOLUÇÃO SALINA 0,85%

Cloreto de Sódio	8,5 g
Água destilada	1.000 mL

Após a dissolução do ingrediente, a solução foi distribuída em volumes de 9 mL, em tubos 15 x 160 mm e esterelizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, os mesmos foram resfriados e mantidos em geladeira até sua utilização.

2 – CALDO LAURIL-SULFATO TRIPTOSE – CLS (MERCK)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante , 35,5 g do meio desidratado eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. O meio era distribuído em volumes de 10 mL em tubos de ensaio contendo em seu interior tubinhos de Durhan invertidos. A esterilização era feita em autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos.



3 – MEIO EC (DIFCO)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante, 37 g do meio eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. O meio era distribuído em volumes de 10 mL em tubos de ensaio contendo em seu interior tubinhos de Durhan invertidos. A esterilização era feita em autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos.

4 – ÁGAR EOSINA AZUL DE METILENO – Levine (Ágar EMB) (VETEC)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante, 37,5 g do meio eram dissolvidos em de 1.000mL água destilada e a solução era aquecida até completa dissolução. O meio era distribuído em um Erlenmeyer de 250 mL. A esterilização era feita em autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos. Resfriava-se para uma temperatura de 50-60°C e então se colocava em torno de 15 mL por placa de Petri (15 x 100 mm), previamente esterilizada.



5 – ÁGAR TRIPTONA SOJA (TSA) INCLINADO (MERCK)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante. Logo, 40 g do produto desidratado eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. A mistura era agitada e fervida até completa dissolução e, em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 12 x 120 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em posição inclinada até a solidificação do meio, de forma a se ter uma base de aproximadamente 2 cm de altura e uma parte inclinada. Após a solidificação do meio, eram mantidos em geladeira a 4°C.

6 – MEIO SIM – INDOL (VETEC)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante, 36 g do produto desidratado eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. Eram misturados até que uma suspensão uniforme fosse obtida. Logo após eram distribuídos em tubos (12 x 120 mm), sendo logo após, esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

Após a inoculação e incubação por 24 h a 35°C, se adicionavam ao meio 2 a 4 gotas do reativo de Kovacs.



◆ REATIVO DE KOVACS

▪ Composição

p-dimetilaminobenzaldeído	5,0 g
Álcool amílico	75 mL
Ácido clorídrico	25 mL

PREPARO

De acordo com as instruções do fabricante, o p-dimetilaminobenzaldeído foi dissolvido no álcool amílico e então o ácido clorídrico foi adicionado lentamente à solução.

7 – CALDO MR – VP (VETEC)

De acordo com as instruções do fabricante, eram dissolvidos 17 g em 1.000 mL de água destilada sendo então distribuídos em volumes de 2 mL em tubos de 12 x 120 mm, sendo logo após esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

◆ SOLUÇÃO DE VERMELHO DE METILA

▪ Composição



Vermelho de metila	0,10 g
Álcool etílico 95% (etanol)	300 mL

PREPARO

De acordo com as instruções do fabricante o vermelho de metila era dissolvido em 300 mL de álcool etílico e logo após adicionava-se 500 mL de água destilada.

8 – CITRATO DE SIMMONS (MERCK)

De acordo com as instruções do fabricante, eram dissolvidos 22,5 g em 1.000 mL de água destilada sendo então distribuídos em volumes de 3 mL em tubos de 12 x 120 mm, sendo logo após esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Logo após a esterilização, os tubos, ainda quentes eram inclinados para posterior utilização.

9 – CALDO AZIDA DEXTROSE (OXOID)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante , 35,6 g do meio desidratado eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. O meio era distribuído em volumes de 10 mL em tubos de ensaio. A esterilização era feita em autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos.



10 – ÁGAR m-ENTEROCOCCUS (DIFCO)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante, 42 g do meio eram dissolvidos em 1.000mL de água destilada e a solução era aquecida até completa dissolução. O meio não era esterilizado em autoclave e o pH final era ajustado para 7,2 +/- 0,2. Após resfriado para uma temperatura de 50-60°C colocava-se em torno de 15 mL por placa de Petri (15 x 100 mm), previamente esterilizada.

11 – CALDO INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO (BHI) (DIFCO)

A preparação deste meio foi realizada conforme as instruções do fabricante. Assim, 37 g do produto desidratado foram pesados e adicionados a 1.000 mL de água destilada. A seguir, após a dissolução completa, o meio foi distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 15 x 160 mm e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, sendo o pH final 7,4. Decorrida a esterilização, e o meio já resfriado, o mesmo foi mantido em geladeira.



12 - CALDO INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO A 6,5% DE NaCl (BHI) (DIFCO)

Caldo infusão de cérebro e coração	37 g
Cloreto de sódio	6,5 g
Água destilada	1.000 mL

O preparo é semelhante ao meio de cultura anterior, acrescido apenas de 65 g de NaCl.

13 – ÁGAR BHI (MAST DIAGNOSTICS)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante. Logo, 47 g do produto desidratado eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. A mistura era agitada e fervida em Erlenmeyer até completa dissolução e, em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 mL em tubos de 12 x 120 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em posição inclinada até a solidificação do meio, de forma a se ter uma base de aproximadamente 2 cm de altura e uma parte inclinada. Após a solidificação do meio, eram mantidos em geladeira a 4°C.



14 – CALDO PÚRPURA DE BROMOCRESOL (MEHLMAN, 1984)

Base:

Peptona	10 g
Extrato de carne	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Púrpura de bromocresol	0,04 g
Água destilada	1.000 mL

No preparo desse meio, os componentes da base foram adicionados à água destilada e em seguida ajustado o pH em 7,0 +/- 2. Este meio base era dividido em três porções iguais. Em seguida adicionava-se 5 g de sacarose, manitol e arabinose em suas respectivas e distribuía-se em tubos 12 x 120 mm em volumes de 3 mL e então eram autoclavados por 10 minutos a 121°C.

15 - MEIO PARA DIHIDROXILAÇÃO DE ARGININA (DIFCO)

De acordo com as instruções do fabricante, 9,0 g do meio basal descarboxilase desidratado foram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada e ajustado o pH para 6,8 +/- 0,2. Esse meio foi dividido em duas porções. Foram adicionados 5,0 g de L-arginina à primeira porção, enquanto que a segunda porção foi considerada como sendo o caldo base controle. Os dois meios assim preparados, foram distribuídos em quantidades de 3,0 mL em tubos de 12 x 120 mm, seguidos



de esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos. Em seguida, os meios foram conservados em geladeira até sua utilização.

16 – PREPARO DO REATIVO DE BARRIT I

Alfa-naftol	5,0 g
Álcool absoluto	100 mL

O alfa-naftol era adicionado ao álcool, homogeneizado e em seguida mantido a temperatura ambiente em frasco escuro.

17 - PREPARO DO REATIVO DE BARRIT II

Hidróxido de potássio (KOH a 40%)	40 g
Água destilada	100 mL

O hidróxido de potássio era adicionado a água destilada, homogeneizado e, em seguida, mantido a temperatura ambiente em frasco limpo e seco.



18 – PREPARO DO CORANTE CRISTAL DE VIOLETA (2%) (Coloração de Gram)

Modificado por Hucker

Solução A : Cristal violeta (85% puro)	2,0 g
Álcool etílico (95%)	20 mL
Solução B: Oxalato de amônio	0,8 g
Água destilada	80 mL

Misturar as soluções A e B.

19 - PREPARO DO CORANTE LUGOL (Coloração de Gram)

Iodo cristalizado	1,0 g
Iodeto de potássio	2,0 g
Água destilada	300 mL

20 - PREPARO DO CORANTE SAFRANINA (0,25%) (Coloração de Gram)

Safranina	10 mL
Água destilada	100 mL