



Instituto Politécnico de Santarém

**Escola Superior Agrária de Santarém**

Curso de Mestrado em Sistemas de Prevenção e  
Controlo Alimentar

**IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR  
EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE *Vibrio*  
*parahaemolyticus* EM ALIMENTOS**

JOANA ISABEL RIBEIRO LOURENÇO

**ORIENTADORA**

**Doutora Ana Maria Gomes de Sousa Neves**

**CO-ORIENTADORA**

**Mestre Maria Inês Alves de Carvalho Martins Carolino**

Santarém

2011



Instituto Politécnico de Santarém

**Escola Superior Agrária de Santarém**

Curso de Mestrado em Sistemas de Prevenção e  
Controlo Alimentar

**IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR  
EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE *Vibrio*  
*parahaemolyticus* EM ALIMENTOS**

JOANA ISABEL RIBEIRO LOURENÇO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SISTEMAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO  
ALIMENTAR

**ORIENTADORA**

**Doutora Ana Maria Gomes de Sousa Neves**

**CO-ORIENTADORA**

**Mestre Maria Inês Alves de Carvalho Martins Carolino**

Santarém

2011

---

*Aos meus pais por me apoiarem e possibilitarem mais uma vez de atingir o meu objectivo e ao meu marido que me apoiou desde o meu ingresso no ensino superior.*

---

---

---

## **Agradecimentos**

Um agradecimento muito especial

À Doutora Ana Neves, que quando necessário se mostrou disponível e pronta a ajudar.

Um agradecimento especial à Engenheira Maria Inês Carolino, pelo tempo dispendido e pelo apoio que sempre demonstrou, em todos os passos deste relatório, e um muito obrigado, ao Doutor Nuno Carolino pela ajuda preciosa na análise estatística dos resultados do meu relatório, sem ele teria sido muito difícil.

Ao Laboratório de Medicina Veterinária, que deu a possibilidade da realização deste estágio e me dispensou tudo o que foi necessário para a sua realização. Ao Departamento de Microbiologia Alimentar, Engenheira Alexandra Cardigos e Doutor João Cavaleiro, pelo apoio prestado. À Cátia por toda a informação dispensada e minutos perdidos.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, por todo o apoio prestado, que lhe foi solicitado até ao fim do mestrado,

Aos meus amigos e colegas de mestrado pelo apoio, em especial, à Sandra Marques, Igor Dias e Luís Fidalgo.

A todos um muito Obrigado,

Joana Lourenço

---

---

---

## RESUMO

Apesar dos riscos envolvidos com a contaminação de peixes e mariscos com *Vibrio parahaemolyticus* há uma falta de informação sobre a ocorrência destes na Europa. O *Vibrio parahaemolyticus* é muito abundante no ambiente aquático, nomeadamente nas águas mais quentes.

Na sequência das análises efectuadas, no PCR em Tempo Real, 21% das amostras revelaram ser positivas, no método clássico, todas as amostras tiveram resultado negativo. Os positivos, embora numa percentagem baixa, poderão ser um problema para a segurança alimentar, uma vez que foram detectados unicamente pelo método do PCR em Tempo Real, podendo representar um factor adicional na ocorrência de casos isolados do consumo do alimento contaminado.

A compatibilização dos resultados do PCR em tempo real com o Método Clássico de análise, não foi possível pois a técnica de PCR em Tempo Real, oferece uma maior celeridade nos resultados, consegue de quantidades reduzidas de amostras encontrar resultados que o Método Clássico não faz.

**Palavras chave:** PCR, *Vibrio parahaemolyticus*

---

## ABSTRAT

Despite the risks involved with the contamination of seafood with *Vibrio parahaemolyticus* is a lack of information on their occurrence in Europe. *Vibrio parahaemolyticus* is abundant in the aquatic environment, particularly in warmer waters.

Following testing, the Real Time PCR, 21% of the samples proved to be positive, the classic method, all samples were negative. Although, a low percentage of positives may be a problem for food security, since it was detected only by the method Real-Time PCR and may represent an additional factor in the occurrence of isolated cases of eating contaminated food.

The compatibility the results of Real-Time PCR with the classic method of analysis wasn't possible because the Real-Time offers more rapid results, can of small amounts of samples, find results that the classical method doesn't.

**Keywords:** PCR, *Vibrio parahaemolyticus*

---

---

## ÍNDICE GERAL

RESUMO .....	IV
ABSTRAT.....	V
ÍNDICE GERAL.....	VI
Índice de Abreviaturas.....	VIII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Quadros.....	X
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJECTIVOS.....	4
2.1. Objectivos Gerais .....	4
2.2. Objectivos Específicos .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Caracterização Pescado em Portugal .....	5
3.1.1. Relevância da pesca em Portugal.....	6
3.1.2. Fisiologia do pescado .....	7
3.2. Microbiologia do Pescado .....	8
3.3. Características das espécies <i>Vibrio</i> .....	9
3.4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	10
3.4.1. Caracterização .....	10
3.4.2. Epidemiologia .....	10
3.4.3. Reservatório.....	12
3.4.4. Alimentos associados.....	13
3.4.5. Características da Doença .....	13
3.4.6. Surtos de intoxicação alimentar.....	14
3.5. Métodos de diagnóstico de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em alimentos.....	15
3.5.1. Método Clássico .....	15
3.5.1.1. Princípios e Procedimentos.....	15
3.5.2. Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR).....	17
3.5.2.1. Princípios e Procedimentos.....	19
3.5.3. PCR em tempo real.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1. Local e amostragem .....	22
4.2. Análise por Método Clássico .....	23

---

4.3.1.	Extracção do DNA das amostras.....	24
4.3.2.	Preparação da PCR .....	25
4.3.3.	Programa de PCR .....	26
4.4.	Análise estatística .....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
7.	BIBLIOGRAFIA.....	38
8.	MEDIAGRAFIA .....	42
	APÊNDICES.....	43
	APÊNDICE I: AMOSTRAS DE PESCADO DO TIPO P1, P2 e P3 .....	44
	APÊNDICE II: RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE PESCADO DO TIPO P1, P2 e P3.....	50
	APÊNDICE III: GRÁFICOS DOS RESULTADOS POSITIVO, NEGATIVO E CULTURA DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	54

---

## Índice de Abreviaturas

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EU** – União Europeia

**GT** – Medida internacional para medir a capacidade dos navios

**PCR** – Polymerase Chain Reaction – Reacção em Cadeia da polimerase

**rpm** – rotações por minuto

**VNC** – Células viáveis não cultiváveis

**ZEE** – Zona Económica Exclusiva

---

## Índice de Figuras

**Figura 1:** Aparelho PCR em Tempo Real da Applied biosystems.

**Figura 2:** Resultados das análises efectuadas do PCR em tempo real e do Departamento de Microbiologia Alimentar do LMV.

**Figura 3:** Quantidades de amostras por tipo.

**Figura 4:** Quantidades de amostras por espécie.

**Figura 5:** Nº de amostras por época (época 1 de Novembro de 2009 a Março de 2010, época 2 de Abril a Julho de 2010).

**Figura 6:** Nº de amostras recolhidas por locais de proveniência( Oceano Atlântico Central (Atl C), ao Oceano Atlântico Nordeste (Atl N), Aquacultura Espanha (Esp), Aquacultura Grécia (Gre), Aquacultura Noruega (Nor) e Aquacultura Uganda (Uga)).

**Figura 7:** Probabilidade do Resultado ser negativo, relativamente ao tempo de enriquecimento das amostras, por análise Odds Ratio

**Figura A1:** Gráfico de um resultado negativo para *Vibrio parahaemolyticus* no PCR em Tempo Real

**Figura A2:** Gráfico de um resultado positivo para *Vibrio parahaemolyticus* no PCR em Tempo Real

**Figura A3:** Gráfico da cultura pura de *Vibrio parahaemolyticus* no PCR em Tempo Real

---

## Índice de Quadros

**Quadro 1:** Componentes e respectivos volumes para Master mix.

**Quadro 2:** Parâmetros para o PCR tempo real.

**Quadro 3:** Espécies catalogadas por ordem alfabética.

**Quadro 4:** Resultados da análise de regressão logística

**Quadro 5:** Estimativas de Odds Ratio

**Quadro A1:** Amostras do tipo P1, amostras de pescado inteiro.

**Quadro A2:** Amostras P2, amostras de pescado manipulado.

**Quadro A3:** Amostras P3, amostras de escombroides.

**Quadro A4:** Resultados das amostras P1, P2 e P3, do Departamento de Microbiologia Alimentar(ISO 21872-1-07) e do *Vibrio* Real Time.

---

## 1. INTRODUÇÃO

As profundas mudanças sucedidas nas sociedades modernas, de ordem económica, social, demográfica, cultural e alimentar, bem como o progresso científico e tecnológico, influenciam a qualidade e a segurança alimentar, quer seja na percepção pública dos riscos, quer através da avaliação científica dos mesmos.

Os hábitos alimentares no mundo ocidental pouco lembram os dos nossos avós da primeira metade do século XX. Cada vez menos os alimentos são produzidos, servidos e consumidos no momento e com ingredientes frescos de origem local. A ciência e a tecnologia de produto, o processamento e a distribuição de alimentos desenvolveram-se abruptamente. Estes avanços possibilitaram a disponibilidade de uma grande variedade de alimentos e introduziram novos sabores e experiências de degustação e mais segurança, mas também trouxeram algumas preocupações, verificando - se, na segunda metade do século XX, um aumento do número de doenças infecciosas de origem alimentar.

As doenças alimentares de origem microbiológica constituem um dos maiores problemas para a Segurança Alimentar, sendo um problema crescente em Saúde Pública, tanto em países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento. Estas doenças, causadas pelo consumo de alimentos contaminados com microrganismos patogénicos e/ou suas toxinas, têm um risco relativo semelhante ao das doenças nutricionais, (entre as quais se inclui, por exemplo, a obesidade que considerada um flagelo da sociedade moderna), mas um risco relativo de um milhão de vezes superior ao provocado pelos pesticidas e aditivos.

No entanto, as melhorias introduzidas na elaboração e manipulação dos alimentos, nomeadamente a pasteurização do leite, a desinfecção da água e o tratamento dos esgotos, permitiram controlar estas doenças, contribuindo para a segurança alimentar. Mas não podemos esquecer que os microrganismos são seres vivos que apresentam uma grande capacidade de adaptação a factores ambientais inóspitos. O espectro destas doenças alimentares está em permanente modificação, observando-se que a prevalência de determinada doença varia de época para época. Actualmente surgem novas doenças

---

---

infeciosas de origem alimentar, outras reaparecem após muitos anos de ausência, algumas têm um aparecimento esporádico e há ainda as que são consideradas já erradicadas.

A verdadeira preocupação acontece quando um microrganismo que até à bem pouco tempo não tenha sido identificado como uma ameaça para a saúde pública, começa a originar doenças, afectando a saúde pública. Tem surgido ao longo dos anos a evidência de doenças infecciosas de origem alimentar relativamente a este tipo de microrganismos emergentes. Por exemplo, *Escherichia coli* O157:H7, descrito pela primeira vez em 1982 na carne de bovino para consumo (SILVA, 1998). Mais habitual o fenómeno da reemergência, em que um microrganismo patogénico, já conhecido como agente de doença alimentar, origina uma nova forma de doença associado a novos tipos de alimentos ou aparece numa região geográfica onde anteriormente não surgia. É o caso da salmonelose, doença alimentar bem conhecida, reportada há décadas como doença infecciosa e considerada emergente pelo aumento da sua incidência em muitos países nos últimos 25 anos, sendo o serotipo predominante *Salmonella enteritidis*, normalmente associado ao consumo de ovos e aves (D'AOUST *et al.*, 1992).

Não excluindo a constatação do aumento da incidência de *Clostridium botulinum*, por exemplo em produtos da pesca embalados em vácuo, consideram-se como emergentes os seguintes patogénicos: *Campylobacter jejunii*; *Escherichia coli* com factores de patogenicidade (ex: *E. coli* O157:H7); *Listeria monocytogenes*; *Salmonella enteritidis* PT6a, PT14b, PT11; *Salmonella typhimurium* DT 104; *Vibrio cholerae* O1; *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio vulnificus*; *Yersinia enterocolitica*; vírus Norwalk; *Cryptosporidium* spp e *Cyclospora* spp. O grande problema destes microrganismos citados e o que nos permite catalogá-los como emergentes, é o facto de serem transmitidos ao Homem pelos animais. Contudo, não provocam geralmente doenças nos seus portadores. Deste modo, como os animais aparentam ser saudáveis, o microrganismo patogénico será ingerido "escondido".

Estes patogénicos de origem alimentar partilham entre si o facto de serem transmitidos ao homem através dos animais (zoonoses) mas, ao contrário das zoonoses tradicionais, geralmente não originam doença no animal. Por consequência, as premissas e preocupações com a saúde pública

---

---

devem incluir os animais saudáveis. Por exemplo, a galinha com o ovário infectado com *Salmonella enteritidis*, a vitela que tem *E. coli* O 157:H7 ou as ostras contaminadas com o vírus Norwalk ou *Vibrio vulnificus* aparentam estar saudáveis.

O aparecimento acentuado de microrganismos emergentes ou reemergentes nas últimas duas décadas pode ser justificado pela evolução tecnológica e por todas as alterações que têm vindo a ocorrer a nível ambiental, económico e social. Devemos lembrar que estes seres vivos unicelulares têm uma enorme facilidade de evoluírem por mutações e recombinações genéticas, conduzindo ao aparecimento de microrganismos de maior virulência e com grande capacidade de sobrevivência perante agentes antimicrobianos e factores ambientais adversos. A crescente resistência a antibióticos e a adaptação a essas novas condições ambientais adversas, mas que não lhes são letais, como sejam pH extremos, potenciais redox modificados e condições de temperatura e pressão extremas, induzem o aparecimento de estirpes mais virulentas, com capacidade de passar barreiras naturais de defesa do organismo e de se tornarem patogénicos mesmo quando presentes em baixo número.

---

## **2. OBJECTIVOS**

### **2.1. Objectivos Gerais**

O objectivo fundamental deste estudo foi a implementação da técnica de PCR em tempo real na detecção de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos, a sua compatibilização com os resultados obtidos por análise microbiológica clássica e a determinação do limite crítico de detecção.

### **2.2. Objectivos Específicos**

Pretende-se que no final deste estágio, a técnica para detecção do *Vibrio parahaemolyticus* esteja implementada, com a fiabilidade e reprodutibilidade que é própria da metodologia do PCR, em tempo real, permitindo ao Laboratório de Medicina Veterinária a realização desta análise por rotina, como metodologia alternativa ao Método Clássico.

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Caracterização Pescado em Portugal**

A Pesca em Portugal é uma actividade económica que foi responsável pelo desembarque estimado de 144 792 toneladas de pescado em 2009. As organizações mais representativas da fileira do pescado uniram-se para dinamizar e reforçar o papel do sector das pescas, transformação e comercialização de pescado como um dos motores de desenvolvimento da economia nacional. O sector representa um efeito total no PIB português superior a 2,5 mil milhões de euros e emprega mais de 90.000 pessoas (TAVARES,2010).

A Campanha “Pescado Controlado” reforça todas as garantias que os produtos adquirem, quer ao nível do respeito pelas regras de sustentabilidade, quer ao nível do cumprimento dos mais elevados padrões de higiene e segurança. Todo o pescado que entra no mercado nacional possui certificados que garantem que foi capturado em estrito cumprimento de regras de sustentabilidade estabelecidas pela União Europeia (Regulamento CE nº 1005/2008 do Conselho de 29 de Setembro de 2008 e Regulamento CE nº 1010/2009 do Conselho de 22 de Outubro de 2009).

Com uma costa de mar abundante em peixe, muitos estuários de rios, como as rias Formosa e a de Aveiro, onde a pesca se apresentava fácil e de elevado retorno, é fácil aceitar que rapidamente o peixe se tornou um elemento primordial para a alimentação, e conseqüentemente factor de fixação das populações (TAVARES,2010).

Esta actividade tornou-se de crucial importância económica, potenciando o comércio e as artes e saberes ligados à pesca como a cordoaria (fabrico de cordas e redes de pesca), a construção naval, a tanoaria e a extracção de sal. Esta especialização moldou as culturas e tradições não só locais, como nacionais, ritmando ao longo dos séculos a História, a Cultura e a Economia Portuguesa. A consulta dos dados do Instituto Nacional de Estatística (INE,2010) Português sugere que a pesca é um sector que tem vindo a perder peso relativo e absoluto na economia. A política de pescas da União Europeia reduziu a frota pesqueira em 20% numa década. Esta redução foi superior à média europeia porque a arqueação bruta de cada embarcação é superior à

---

---

média europeia. A arqueação bruta portuguesa em 2008 era de 106,5 mil GT (medida internacional para medir a capacidade dos navios). Cada navio português tinha em média uma capacidade de carga de 12,4 GT, pouco mais de metade do que a média apurada para frota europeia como um todo, apesar de deter 10% da totalidade das embarcações registadas na União Europeia.

O facto de se ter como vizinha a costa do Atlântico levou, naturalmente, a que a gastronomia de Portugal se virasse para os produtos que o mar oferece. O bacalhau ocupa o lugar de honra à mesa portuguesa durante todo o ano e, graças aos portugueses foi internacionalizado junto dos países de acolhimento, pela forma diferente que os portugueses usam na confecção do bacalhau. Desde tempos longínquos que este povo de marinheiros rumou à Terra Nova, Gronelândia e Islândia para pescar. Em Portugal o bacalhau é salgado, seco e preparado de forma a marcar a diferença e a manter o genuíno sabor do bom bacalhau. Orgulhamo-nos de ter as melhores empresas de transformação deste pescado que ocupam no panorama internacional lugares de destaque na comercialização e exportação. Além desta outras especialidades de peixes, que pescamos e transformamos como linguado, o salmonete, a pescada e o peixe espada. E por fim o último mas não o pior, um dos peixes menos dispendiosos mas mais saborosos - a sardinha, um petisco essencial nos churrascos e festas ao ar livre um pouco por todo o país. Nos mariscos temos caranguejos e os mexilhões. O sector do pescado em Portugal e indústrias de transformação exportam grande parte do pescado. Ao sector, outra indústria forte está associada a das conservas sendo as nossas conservas, atum e sardinha, um dos produtos que mais se exporta. A indústria das conservas produz para o mercado nacional e para a exportação, conservas de atum, sardinha, polvo entre outras, com a conquista de várias medalhas de ouro em concursos internacionais (TAVARES, 2010).

### **3.1.1. Relevância da pesca em Portugal**

O sector do pescado, é um sector de grande importância para a subsistência das populações ribeirinhas, assim como, um sector estratégico no que concerne à alimentação e emprego dos portugueses. Em termos de alimentação, Portugal, tem o maior consumo *per capita* de pescado da EU (União Europeia) dos 25, cerca de 57 kg/ano/habitante, cujo consumo

---

---

representa um valor aproximado de 25% na dieta alimentar dos portugueses. É um país com uma costa continental extensa (942 km), sendo a sua Zona Económica Exclusiva ainda mais expressiva (1656 mil km<sup>2</sup>), o que em termos de emprego assume uma significativa importância, ainda que o emprego no sector das pescas seja inferior a 1% da população activa, a percentagem de pessoas dependentes da actividade da pesca, é vastíssima. Trata-se pois de uma actividade, que acaba por gerar muitos empregos em terra, em sectores tão diversos, como o do comércio de peixe fresco, das conservas, dos congelados, das farinhas, da construção/reparação naval, da cordoaria, dos transportes, da administração, da investigação, da formação, entre outros (FAO,2010).

### **3.1.2. Fisiologia do pescado**

Os peixes são animais vertebrados, aquáticos, tipicamente ectotérmicos, que possuem o corpo fusiforme, os membros transformados em barbatanas sustentadas por raios ósseos ou cartilagosos, as guelras ou brânquias com que respiram o oxigénio dissolvido na água (embora os dipnóicos usem pulmões) e, na sua maior parte, o corpo coberto de escamas(KING,1995; HICKMAN *et al*, 2004).

No uso comum, o termo peixe tem sido frequentemente utilizado para descrever um vertebrado aquático com brânquias, membros, se presentes, na forma de nadadeiras, e normalmente com escamas de origem dérmica no tegumento. Sendo este conceito do termo "peixe" utilizado por conveniência, e não por unidade taxonómica, porque os peixes não compõem um grupo monofilético, já que eles não possuem um ancestral comum exclusivo. Para que se tornasse um grupo monofilético, os peixes deveriam agrupar os Tetrápodes (KING, 1995; BONDS, 1996).

Os peixes (28.500 espécies catalogadas na FishBase) são, na maior parte das vezes, divididos nos seguintes grupos:

- *peixes ósseos (Osteichthyes*, com mais 22.000 espécies) à qual pertencem as sardinhas, as garoupas, o bacalhau, o atum e, em geral, todos os peixes com o esqueleto ósseo;
- *peixes cartilagosos (Chondrichthyes*, mais de 800 espécies) à qual pertencem os tubarões e as raias; e

---

- vários grupos de peixes sem maxilas (antigamente classificados como *Agnatha* ou *Cyclostomata*, com cerca de 80 espécies), incluindo as lampreias e as mixinas.

Em vista desta diversidade, os zoólogos não mais aceitam a antiga classe *Pisces* em que Lineu os agrupou, como se pode ver na classificação dos Vertebrados(BONDS, 1996).

### **3.2. Microbiologia do Pescado**

Devido aos tecidos moles e ao seu habitat natural ser o meio aquático, os peixes são extremamente sensíveis à contaminação microbiana. A sua flora microbiana depende daquela que existe nas águas onde vive.

Os microrganismos de deterioração comum nos peixes incluem as espécies de *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter*, encontrado principalmente em peixes marinhos, e *Bacillus* e *Micrococcus*, encontrados em peixes de água doce (FRAZIER, 1976; BHUNIC, 2008). No momento da apanha, os peixes têm uma alta carga microbiana na superfície da pele, no seu trato intestinal, e nas suas brânquias.

O tipo e o número de microrganismos que vivem em peixes variam conforme a época, as espécies e os habitats naturais. Contaminações adicionais podem ocorrer durante a apanha, manipulação ou processamento do peixe (FRAZIER, 1976; BHUNIC, 2008).

O *Vibrio parahaemolyticus* foi responsável por numerosas epidemias de gastroenterites veiculadas por produtos do mar, nos EUA. Essa bactéria ocorre, largamente, nas águas do Oceano Atlântico, do Pacífico e da Costa do Golfo e foi isolada de produtos do mar, incluindo peixes, moluscos e crustáceos. Os moluscos que se desenvolvem nas águas contaminadas podem concentrar vírus, servindo como fontes de hepatite infecciosa. As ostras e os mariscos de águas poluídas causaram numerosas epidemias em diversas partes do mundo (BLACKE *et al*, 1980; PELCZAR *et al.*, 1981; DOYLE *et al*, 2007).

A presença de *Vibrio parahaemolyticus* em pescado deve-se ao desequilíbrio entre o organismo, o ambiente e o agente patogénico. Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema de defesa do organismo fica debilitado, devido ao gasto energético extra empregado na sua

---

adaptação às novas condições, tornando-se vulnerável ao ataque do patogénico presente no meio (PEREIRA, 2004).

O pescado devido à sua natureza halofílica são uma forte potencial de contaminação por *Vibrio parahaemolyticus* (DESMARCHELIER,2003)

TANTILO *et al*,2004, afirmam que na ultima década houve surtos de *Vibrio parahaemolyticus* causadores de doenças que mereceram destaque, e que apesar da menor severidade dos casos comparados à cólera, que produzem importantes surtos epidemiológicos. Esta espécie, tem sido reconhecida como importante causa de intoxicação alimentar, particularmente no Japão, que comem imenso pescado *in natura* (DESMARCHELIER, 2003; TRABULSI e ALTERTHUM,2004).

### **3.3. Características das espécies Vibrio**

De acordo com THOMPSON e co-autores (2004), os membros da família *Vibrionaceae* caracterizam-se por serem bastonetes Gram negativos, geralmente móveis, mesofílicos e quimiorganotróficos, anaeróbios facultativos, de um modo geral halofílicos e podem ser encontrados em ambientes aquáticos em associação com eucariotas. O número de espécies que compõem o género *Vibrio* passou de 20 em 1981 para 47 em 2002 e, actualmente já conta com 81 espécies diferentes. Pelo menos 13 espécies são passíveis de causar infecções em humanos apesar de a maioria ser causada por *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus*, (FAO/WHO, 2001). Das 13 espécies, 8 estão directamente associadas ao consumo de alimentos. Uma das formas mais comuns de infecções por *Vibrio*, resulta do consumo de produtos de origem marinha.

Os vibrios são o género bacteriano predominante nas águas estuarinas e estão associados a uma grande variedade de moluscos (como as amêijoas, mexilhões e ostras (PEDRO *et al.*, 2005), corais, peixes, camarões e zooplâncton (THOMPSON *et al.*, 2004)). Aproximadamente 40 a 60% do pescado e bivalves que encontramos à venda nos estabelecimentos comerciais pode conter *Vibrio* spp. As espécies isoladas com maior frequência são *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*. O número de vibrios nas águas superficiais e nos bivalves é sazonal e, normalmente, mais elevado de Abril a

---

Outubro, meses em que a temperatura se encontra mais elevada. Esta sazonalidade é mais evidente para as infecções por *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* do que para outros vibrios como o *Vibrio fluvialis* que ocorrem ao longo de todo o ano (MONTVILLE *et al*, 2008).

### **3.4. *Vibrio parahaemolyticus***

#### **3.4.1. Caracterização**

*Vibrio parahaemolyticus* é um bastonete, Gram -, encovado, fino e curto (1,5 - 1,5 x 0,5 µm) , móvel por um único flagelo polar, sendo um anaeróbio facultativo levemente halofílico, crescendo preferencialmente na presença de 3 a 6 NaCl (TWEDT, 1989; MONTEVILLE *et al*, 2008).

A sua gama de temperaturas de crescimento oscila entre 8 e 44°C, com o óptimo a 37°C. Outra característica importante é a sua preferência por meios alcalinos, tendo certas estirpes o seu óptimo a pH 9,0. Todas as estirpes são extremamente termosensíveis sendo rapidamente destruídas a 50°C(BHUNIC,2008).

#### **3.4.2. Epidemiologia**

*Vibrio parahaemolyticus* e outros *Vibrios* marinhos podem veicular doenças através dos alimentos. Estes são classificados através dos seus antigénios, foram identificados 12 diferentes grupos de antígeno "O"( antígeno somático) e aproximadamente 60 diferentes antígenos tipo "K" (antígeno capsular) (MONTEVILLE *et al*,2008).

Estudos epidemiológicos moleculares revelaram uma forte correlação entre a existência dos genes que codificam duas hemolisinas (tdh, trh ou ambas) e a capacidade de provocar doenças, o que vem demonstrar que estes genes são importantes factores de virulência. No entanto, uma pequena porção das estirpes clínicas não apresenta nenhum dos genes referidos, o que torna necessário isolar a bactéria que se suspeita ser responsável pela doença e proceder a testes bioquímicos afim de a identificar (LIN *et al.*, 1993). De acordo com DEEPANJALI e co-autores (2005) cerca de 90% dos isolados clínicos produzem hemolisina directa termoestável (TDH), contudo apenas 1% dos isolados ambientais produzem esta enterotoxina. Além disso, as estirpes

---

clínicas exibem actividade hemolítica em agar de Wagatsuma, enquanto as estirpes ambientais não o fazem. Esta actividade hemolítica, denominada fenómeno de Kanagawa (KP), tem sido usada como marcador de virulência do *Vibrio parahaemolyticus*. O KP é causado pela TDH produzida por este organismo.

Além da actividade hemolítica, a TDH já demonstrou ter várias outras actividades biológicas, tais como a enterotoxigenicidade, citotoxicidade, cardiotoxicidade, letalidade em pequenos animais e capacidade de estimular a permeabilidade vascular. O gene (*tdh*) que codifica a TDH foi detectado em todas as estirpes KP positivas. O nível de produção de TDH está relacionado com as condições culturais e um meio de cultura com pH baixo estimula a sua produção (LIN *et al.*, 1993). Um outro factor de virulência, a hemolisina directa termoestável relacionada (TRH), encontra-se também associado às estirpes KP negativas ou urease positivas.

As estirpes KP negativas também se encontram envolvidas em alguns surtos de intoxicação alimentar e, esporadicamente, em casos de feridas infectadas. É de salientar que as estirpes de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas a partir de produtos do mar são geneticamente muito heterogêneas e as KP positivas ocorrem em proporções extremamente baixas (WONG, 2003). Apesar de já se saber bastante acerca das toxinas do *Vibrio parahaemolyticus*, pouco se sabe ainda sobre o processo de aderência.

Este é um passo essencial na patogénese da maioria dos enteropatogénicos (agentes patogénicos que infectam os intestinos). Vários autores propuseram como factores de adesão a membrana exterior, os flagelos laterais, os pili (importantes na adesão e colonização das superfícies do hospedeiro) ou uma hemaglutinina associada à célula. No entanto, a importância destes factores na doença humana é ainda desconhecida. (MONTVILLE *et al.*, 2008). Além das propriedades de aderência existem ainda factores relacionados com a superfície celular que regulam a resistência à lise e outras defesas naturais do hospedeiro (JANDA *et al.*, 1988).

A produção desta hemolisina foi experimentada com um agar especial de sangue, denominado por *Wagatsuma* em que as espécies beta hemolíticas eram chamadas de *Kanagawa* positivas (KP<sup>+</sup>) e as não hemolíticas eram *Kanagawa* negativas (KP<sup>-</sup>). No entanto, a dificuldade de preparar o meio,

---

---

devido ao sangue que é necessário ser recentemente extraído, este método foi suplantado por sondas TDH com protocolos de base para PCR (DOYLE *et al*, 2007)

### 3.4.3. Reservatório

O *Vibrio parahaemolyticus* ocorre naturalmente em águas estuarinas por todo o mundo e pode ser facilmente isolado em águas costeiras, sedimentos, partículas em suspensão, plâncton e numa enorme variedade de peixes e moluscos. Esta última fonte inclui, pelo menos, 30 espécies diferentes entre as quais amêijoas, ostras, lagostas, vieiras, camarões e caranguejos (MONTVILLE, 2008; BHUNIC, 2008).

O *Vibrio parahaemolyticus* é amplamente disseminado nos ambientes costeiros de todo o mundo. A temperatura da água, a salinidade, os zooplâncton, as mudanças das marés, o oxigênio dissolvido e os várias espécies de peixe, desempenham um papel importante no seu território de distribuição temporal (DOYLE *et al*, 2007). Este patógeno normalmente não é encontrado nas água durante os meses do Inverno, pois a temperatura é demasiado baixa para a sua existência. A influência da temperatura da água tem-se demonstrado importante, pois a ocorrência de epidemiologias ocorrem durante os meses mais quente (KANEKO AND COWELL, 1978; DOYLE *et al*, 2007). Ocasionalmente, este foi isolado em águas mais frias, mas com uma baixa concentração (<5 UFC/litro).

DOYLE *et al* (2007), não observaram correlação entre a presença do *Vibrio parahaemolyticus* com a presença de outros microrganismos, como os coliformes fecais

As estirpes *Kanagawa* positivas (KP<sup>+</sup>) são as mais importantes e prevalentes nas doenças causadas nos humanos, apesar de as *Kanagawa* negativas (KP<sup>-</sup>) também terem sido isoladas em fezes diarréicas. As KP<sup>+</sup> constituem uma pequena percentagem de *Vibrio parahaemolyticus* encontrado em ambientes aquáticos ou em pescado. Este isolamento por si só não indica que não constitui um perigo para a saúde, pois o isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* de pescado envolve geralmente um passo de pré enriquecimento, sendo descrito que KP<sup>+</sup> se desenvolve no trato intestinal do humano e KP<sup>-</sup> sobrevive nos estuários. O PCR com sondas de DNA passou a

---

---

ser utilizado para a identificação do gene *tdh* isolado do *Vibrio parahaemolyticus* (DOYLE *et al*,2007).

#### **3.4.4. Alimentos associados**

Os alimentos associados a este tipo de doença provocada por *Vibrio parahaemolyticus*, são os peixes e moluscos (em geral, ostras), crus, mal cozidos ou cozidos e recontaminados. Existe uma correlação entre a doença e o consumo dos alimentos nos meses quentes do ano. Refrigeração imprópria dos alimentos contaminados ou permanência destes em temperatura ambiente favorecem a proliferação dos microrganismos (DOYLE *et al*, 2007; BHUNIC,2008).

#### **3.4.5. Características da Doença**

*Vibrio parahaemolyticus* tem um tempo de geração muito curto de 8 a 9 minutos a 37°C, mas tem uma rápida multiplicação, *in vitro*, como no consumidor (DOYLE *et al*, 2007; MONTEVILLE *et al*,2008).

A indução dos sintomas de intoxicação exige a ingestão de 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup> células viáveis (10<sup>4</sup> UFC de células de KP<sup>+</sup>). Estes aparecem 10-18h após a ingestão do alimento contaminado e consistem em diarreia líquida, cólica abdominal, náuseas, vômitos, dor de cabeça, febre e calafrios. São sintomas que podem estar presentes na infecção por este organismo. Ocasionalmente, diarreia com sangue ou muco pode ocorrer (RIPPEY,1994; MONTEVILLE *et al*, 2008). A gastroenterite causada por *Vibrio parahaemolyticus*, é, em geral, uma doença auto-limitante, de gravidade moderada e de curta duração, sendo que em casos mais graves será necessária uma hospitalização.

A duração da doença pode variar de 2 a 7 dias (JANDA *et al*, 1988). Em raras ocasiões pode ocorrer septicemia (infecção generalizada que se caracteriza por febre e hipotensão) e isolamento do microrganismo no sangue. Nestes casos, os sintomas subsequentes podem incluir inchaço e dores nas extremidades.

A doença é causada quando o organismo se instala no intestino delgado dos indivíduos, fixa e excreta uma toxina (BENENSON,1995). O diagnóstico é confirmado pelo isolamento de KP<sup>+</sup> nas fezes de pacientes em meio apropriado

---

ou num alimento contaminado epidemiologicamente ( $\geq 10^5$  organismos por grama)(BHUNIC,2008).

O tratamento desta intoxicação deverá ser feito por hidratação oral ou endovenosa, podendo ser necessário recorrer a antibióticos, nos casos mais graves, já requerendo hospitalização (BENENSON, 1995).

Deve-se tomar como medidas preventivas o consumo de produtos adequadamente cozidos ou refrigerados.

O controlo destas intoxicações deverá ser feito por entidades oficiais, tendo a obrigação da notificação de surtos.

#### **3.4.6.-Surtos de intoxicação alimentar**

Juntamente com o *Vibrio cholerae*, o *Vibrio parahaemolyticus* é um dos vibrios patogénicos mais estudados. Existem inúmeros estudos realizados desde o primeiro relato do seu envolvimento num surto de intoxicação alimentar em 1950. As gastroenterites provocadas por *Vibrio parahaemolyticus* estão quase exclusivamente associadas ao consumo de moluscos crus, inadequadamente cozinhados ou cozinhados, mas recontaminados. Nos Estados Unidos, entre 1973 e 1998 foram detectados e comunicados aos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) 40 surtos de *Vibrio parahaemolyticus* envolvendo um total de mais de 1000 pessoas (MONTVILLE *et al*, 2008).

No Japão, esta bactéria é a principal causa de intoxicações alimentares. Aproximadamente 70% de todas as intoxicações alimentares verificadas nos anos 60 foram causadas por *Vibrio parahaemolyticus*.

Nos Estados Unidos, o primeiro grande surto (envolvendo 320 pessoas) ocorreu em 1971 como resultado do consumo de caranguejos mal cozinhados. Vários surtos ocorreram desde então ao longo das regiões costeiras dos Estados Unidos e Hawaii, tendo o maior surto de infecção por *Vibrio parahaemolyticus* ocorrido durante o Verão de 1978 e afectado 1133 pessoas das 1700 que se encontravam presentes num jantar em Port Allen, LA. (MONTVILLE *et al*, 2008). Durante a década de 70 ocorreram vários casos de toxinfecções alimentares por *Vibrio parahaemolyticus* na Índia, Indonésia, Tailândia, Vietnam, Coreia e Japão (BLAKE *et al.*, 1980). Em 1982, ocorreram dois outros surtos nos Estados Unidos que envolveram 219 pessoas, incluindo

---

---

uma morte (PANICKER *et al.*, 2004). Durante o Verão de 1998 ocorreu o primeiro surto em que se confirmou a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cruas provenientes da Baía de Galveston (USA). Este surto durou de Maio a Julho de 1998 e o que o torna digno de nota é o facto de a bactéria envolvida ter sido anteriormente identificada em 1995 na Índia (DE PAOLA *et al.*, 2000). Também recentemente foram relatados vários surtos relacionados com vibrios em países europeus, como a Espanha (LIU, 2007), Itália (RIPABELLI *et al.*, 1999) e França (LIU, 2007).

Mesmo em Portugal, em Setembro de 2004, cerca de 50 pessoas recorreram ao Serviço de Urgência do Hospital de Aveiro com sintomas de intoxicação alimentar provocada por mariscos (COSTA, 2007), no entanto, não existem provas de que o agente etiológico tenha sido um *Vibrio*. A empresa Adviware Pty Lda (2007) no seu site estima que em Portugal existem cerca de 26 casos anuais de toxinfecções por *Vibrio parahaemolyticus*. Contudo, estes valores são apenas extrapolações e não existem registos médicos ou científicos que possam validar estas estimativas.

### **3.5. Métodos de diagnóstico de *Vibrio parahaemolyticus* em alimentos**

#### **3.5.1. Método Clássico**

##### **3.5.1.1. Princípios e Procedimentos**

A maioria das amostras de alimentos analisadas para a presença de espécies de *Vibrio spp.* serão mariscos e outros frutos do mar.

O *Vibrio spp* pode crescer muito rapidamente em frutos do mar à temperatura ambiente, assim as amostras devem ser refrigeradas abaixo de 10°C imediatamente após a recolha e , em seguida, analisadas o mais rapidamente possível . No entanto, as células são facilmente danificadas por um arrefecimento rápido e as amostras não devem ser arrefecidas pelo contacto directo com gelo (RIVER, 2010).

Existem métodos actuais para a detecção de potenciais enteropatógenos de espécies *Vibrio spp* na alimentação humana, a ISO / TS 21872-1:2007 é para detecção de *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*.

---

A primeira etapa explora os métodos tradicionais de detecção da capacidade de *Vibrio spp* crescer rapidamente em valores de pH relativamente elevados. São colocados em meio de pré enriquecimento, para recuperação e multiplicação das células de *Vibrio*, contendo cloreto de sódio e com um pH de cerca de 8,6, como a água salina peptonada alcalina ( ASPW ), utilizada para o enriquecimento. Normalmente, o enriquecimento é de 6 horas a 41,5°C para os produtos frescos e a 37°C para produtos congelados ou salgados. A cultura é inoculada num segundo enriquecimento de tiosulfato citrato sacarose com sais biliares (TCBS) e um meio agar opcional, seletivo, e são incubadas a 37°C por 24 horas. No agar TCBS, as colónias de *V. cholerae* são lisas e amarelas, as colónias de *V. parahaemolyticus* aparecem em azul, e/ou verde e as colónias de *V. vulnificus* são verde ou amarelo(RIVER, 2010).

Não estão bem estabelecidos os procedimentos de identificação e confirmação de patogenicidade *Vibrio spp*. A sua identificação preliminar é estabelecida com base na aparência da colónia em agar TCBS. Os principais testes de confirmação são a reacção oxidase e a presença ou ausência de lisina e ornitina e descarboxilase de arginina. Os meios devem ser preparados com cloreto de sódio 2-3 %, para permitir o crescimento de espécies halofílicas. As colónias de *V. parahaemolyticus* isoladas podem também ser caracterizadas por meio de testes serológicos e pelo teste de *Kanagawa* (RIVER, 2010).

O método clássico para pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em géneros alimentícios requer 4 a 5 dias para uma obtenção de resultados, positivos ou negativos. A confirmação deste patogénico pode demorar até 7 dias através de métodos bioquímicos e serológicos (D'AOUST *et al.*, 1990).

Este método tem limitações pois assenta no pressuposto de que cada célula forma uma colónia. Estas limitações podem ocorrer ao nível das células fragilizadas e das células viáveis não cultiváveis.

As células fragilizadas sofrem lesões ao nível sub-letal de stress, pela acção do calor, radiação, ácidos, devido a uma diminuição da resistência aos agentes de selectividade pelo aumento das necessidades dos nutrientes. Estas células, conseguem ser recuperadas através do pré-enriquecimento inicial que é efectuado em todos os métodos. Porém estas podem apresentar limitações ao nível do método clássico. No PCR esta limitação não irá ocorrer devido á

---

---

elevada especificidade do método que com um número relativamente pequeno de células conseguirá detectá-las.

As células viáveis não cultiváveis podem existir em estado viável mas não podem ser cultivadas em métodos microbiológicos clássicos. É utilizado este método de sobrevivência (VNC) nas espécies não esporuladas. O estado das células viáveis não cultiváveis é frequentemente induzido por limitações de nutrientes em ambientes aquáticos, mas pode revelar-se nos nutrientes dos alimentos, sendo também induzido por alterações de concentração de sal e mudanças de temperatura (DOYLE *et al*, 2001; 2007)

A viabilidade das células não cultiváveis pode ser determinada através de métodos citológicos, sendo o PCR uma importante ferramenta de detecção do DNA das mesmas.

### **3.5.2. Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Reacção em cadeia da polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction*) é um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucleico) sem o uso de um organismo vivo.

Inventada em 1983 por Kary Mullis, uma das principais aplicações do PCR é na medicina forense, onde pequenas amostras de DNA retiradas da cena de um crime (pedaços de cabelo, gotas de sangue ou saliva, pedaços de pêlo ou até mesmo a minúscula quantidade de DNA deixada numa impressão digital), são amplificadas para serem analisadas pelo método de fingerprinting (HOWE, 1995).

O PCR encontra a sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Em teoria, é possível amplificar qualquer DNA (eurofins.com.br, 2008).

O PCR também é rotineiramente utilizado em procedimentos científicos de Biologia Molecular como amplificação para gerar mutagénese, detecção de mutações ,como também pode ser utilizado para identificação de agentes patogénicos (HOWE, 1995; MICHELI *et al*, 1997).

O PCR tem grande influência na detecção de organismos geneticamente modificados (OGM) em alimentos, ingredientes e aditivos.

Também em microbiologia alimentar, a PCR tem vindo a ser utilizada, na identificação e classificação bacteriana. Não só para detectar microrganismos

---

---

que possam desenvolver-se nos géneros alimentícios e que sejam causadores de toxinfecções alimentares, mas também para detectar falhas que possam existir, no que diz respeito a manipulações e higiene incorrectas. A PCR torna-se uma técnica rápida para assegurar a higiene e segurança alimentar (TANG, 1999).

A introdução da PCR, em diagnóstico microbiano, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (MARLONY *et al.*, 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior selectividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BUSH & NITSCHKO, 1999). A substituição dos testes bioquímicos pela identificação com a técnica de PCR reduz substancialmente o tempo e trabalho necessário para analisar as amostras. A detecção de patogénicos por PCR demonstrou ser específica e mais rápida que os métodos convencionais (PANICKER *et al.*, 2004).

De acordo com os limites estabelecidos em 1996 pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), os moluscos bivalves vivos não devem apresentar mais de 100 ufc de *Vibrio parahaemolyticus* por grama (ESR, 2003). Afim de atingir estes objectivos e aumentar a segurança alimentar é importante desenvolver um método de detecção rápido, fiável e sensível. De modo a ultrapassar as desvantagens da identificação por testes morosos (bioquímicos ou imunológicos) na detecção de *V. parahaemolyticus* vários autores procuraram tirar partido das vantagens dos métodos moleculares.

Apesar de vários protocolos de PCR terem sido desenvolvidos para a detecção específica de *V. parahaemolyticus*, apenas fornecem resultados qualitativos a menos que sejam usados em conjunto com um método clássico.

Devido aos constantes avanços na tecnologia, foi possível desenvolver protocolos de real-time PCR para quantificação de *V. parahaemolyticus* total em moluscos bivalves e água do mar.

Estes protocolos de PCR permitem detectar espécies microbianas patogénicas por amplificação de genes específicos. Inclusivamente, permitem detectar organismos que se encontram no estado viável e não cultivável.

---

---

A PCR também tem vindo a ser validado, no que diz respeito à autenticidade dos alimentos, visto este ser um problema global, sendo cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos fraudulentamente rotulados e de produtos de qualidade inferior, quer por razões económicas, quer por razões de saúde pública. As adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas são relativamente frequentes e diversificadas, incluindo: (i) adição de leite de vaca ao leite de ovelha e/ou cabra para a preparação de queijo; (ii) a incorporação de proteínas do soro na produção de queijos; (iii) a adição de caseínas, ou proteínas do soro a produtos alimentares, particularmente nos derivados de carne (VELOSO *et al.*, 2002).

### 3.5.2.1. Princípios e Procedimentos

A PCR é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar a entrada de impurezas que possam inviabilizar ou tornar erróneo o resultado (HOWE,1995).

O principal propósito da PCR é fazer um número imenso de cópias de um determinado fragmento genético, ao qual o tamanho pode variar de poucos pb (pares de bases) até milhares de pb. A técnica explora a função natural da enzima chamada de taq – polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, esta enzima é semelhante à enzima DNA polimerase que é capaz de sintetizar DNA a partir de seus precursores no sentido 5'  $\Rightarrow$  3'. Para catalisarem esta síntese, os precursores de DNA devem estar presentes sob a forma de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (COLONNA-ROMANO *et al.*,1998).

Para utilizar esta técnica é necessário ter um conhecimento prévio da sequência dos genes a serem amplificados, e a partir disso são sintetizados dois primers ou iniciadores, ou seja, é a partir deles que se inicia a síntese do DNA pela enzima taq – polimerase (HOWE,1995, COLONNA-ROMANO *et al.*,1998).

A PCR tem vários ciclos: fase de desnaturação (94 -96°C), fase onde ocorre o desenrolamento da cadeia dupla do DNA através da quebra das pontes de hidrogénio entre as bases pareáveis (A – T, G – C), dando origem a duas cadeias simples de DNA sobre as quais a síntese posteriormente vai

---

---

ocorrer, de seguida temos a fase de hibridização ou annealing (50-54°C), nesta fase os “primers” ligam-se, especificamente, às suas sequências homólogas correspondentes no DNA e, para finalizar temos a fase de extensão do DNA (72-76°C), fase onde ocorre a síntese de uma nova cadeia antiparalela sobre a cadeia anteriormente desnaturada, a enzima taq – polimerase catalisa esta reacção (HOWE, 1995 e COLONNA-ROMANO *et al*, 1998).

Todos os testes diagnósticos que envolvem um método molecular de amplificação, como a PCR, compreendem as etapas de extracção de ácidos nucleicos de amostras biológicas, seguido de amplificação de um segmento seleccionado mediante a reacção em cadeia de polimerase e de detecção dos fragmentos amplificados durante o processo.

### **3.5.3. PCR em tempo real**

A PCR em tempo real (Real-Time PCR) representa o último avanço na tecnologia da PCR.

A PCR em tempo real associa a metodologia da PCR a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. A metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA numa única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações.

A possibilidade de monitorizar, ao longo da reacção, a quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e de quantificar este produto durante a sua fase óptima de formação, confere maior precisão e reprodutibilidade à PCR em tempo real quando comparado com a PCR convencional. Pelas suas vantagens, a PCR em tempo real tende a substituir a PCR convencional como método molecular de auxílio diagnóstico (MACKAY *et al*, 2004; SAUNDERS, 2004).

#### **3.5.3.1. Princípios e Procedimentos**

Os equipamentos, destinados à realização da PCR em tempo real, associam um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reacção de amplificação. A metodologia utiliza os mesmos reagentes de uma PCR convencional acrescido de fluorocromos, intercalados em cadeias de DNA (metodologia SybrGreen) ou presentes em sondas de

---

---

hibridização específicas (metodologia TaqMan). Na presença de produto amplificado, os fluorocromos, excitados por uma fonte de luz (laser), emitem um sinal proporcional à quantidade de produto sintetizado que, por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de sequências alvo presentes na reação de amplificação (MACKAY *et al*,2004; SAUNDERS, 2004).

Os sinais são detectados por um sistema óptico e analisados por software específico. Os sinais de fluorescências, produzidos à medida que o produto é amplificado, são expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos) permitindo monitorizar, em tempo real, a cinética e a eficiência da reação de amplificação (MACKAY *et al*,2004; SAUNDERS, 2004).

Os ciclos iniciais de amplificação, caracterizados por reduzidos incrementos nos sinais de fluorescência, definem o limiar de detecção. A metodologia permite monitorizar, em tempo real, o momento da reação em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado, ultrapassa o limiar de detecção (indicado por CT). O ponto CT indica o momento a partir do qual a reação é otimizada (fase exponencial) e o produto amplificado é quantificado. A quantificação do produto amplificado é realizada através de comparação com uma curva padrão que correlaciona a intensidade dos sinais de fluorescência, gerados durante os ciclos de amplificação, com as concentrações conhecidas de uma sequência idêntica a que se quer quantificar (MACKAY *et al*, 2004; SAUNDERS, 2004).

A PCR em tempo real é altamente sensível, sendo capaz de detectar até 10 cópias de DNA/mL. A especificidade da reação é confirmada através de uma curva (Curva de Melting), que indica o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos primers específicos para as sequências alvo que estão a ser pesquisadas (MACKAY *et al*,2004; SAUNDERS, 2004).

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local e amostragem

O presente relatório resultou do estágio realizado no Laboratório de Medicina Veterinária (LMV). Este laboratório de análises privado iniciou o seu funcionamento em 1992, encontrando-se neste momento em Atalaia de Almoester, cumprindo as normas GLP (*Good Laboratory Practice*), estando certificado pela ISO 9001:2000 e em processo de acreditação pela NORMA 17025:2005.

O LMV funciona em contacto permanente com o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), situado em Benfica, Lisboa, sendo acreditado por este para executar provas laboratoriais no âmbito dos programas nacionais de luta contra diversas doenças animais em campanha de erradicação. Para além deste apoio à produção pecuária, esta instituição presta um serviço de interesse público, não só na erradicação de doenças dos animais bem como na erradicação de doenças alimentares de origem microbiológica.

Foram recolhidas 99 amostras de peixe de diferentes espécies, durante o período de Novembro de 2009 a Julho de 2010 (Quadro A1, A2 e A3 em anexo). As amostras foram recolhidas por técnicos pertencentes ao LMV, dentro das normas exigidas para o efeito.

Os dados apresentados têm como período de referencia o ano de 2009 (Novembro e Dezembro) e o primeiro semestre do ano de 2010 (Fevereiro a Julho), num total de 99 amostras, das quais 4 amostras em 2009 (correspondentes a um primeiro estudo experimental) e as restantes 95 em 2010.

As 99 amostras foram recolhidas ao acaso para análise no Departamento de Microbiologia Molecular, tentando-se apenas uma distribuição uniforme por espécie.

---

## 4.2. Análise por Método Clássico

As amostras recolhidas são analisadas seguindo as técnicas de análise clássica e de modo a cumprir a legislação em vigor.

No Departamento de Microbiologia Alimentar, do LMV, todas as amostras foram submetidas às análises a seguir descritas, de acordo com os métodos: Contagem de *Escherichia coli* (AFNOR BIO12/13-02/05), Pesquisa de Esporos de Clostrídeos Sulfito Redutores (NP-2262/86), Contagem de *Staphylococcus coagulase +* (Tempo STA), Pesquisa de *Salmonella* (AFNOR BIO12/16-09/05), Contagem de *Clostridium perfringens* (ISO 7937), Pesquisa de Histaminha (HPLC) e Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* (ISO 21872-1-07).

### 4.2.1. Análise de *Vibrio parahaemolyticus* pelo Método Clássico

Segundo a ISO/TS 21872-1 (Microbiologia dos alimentos e alimentação animal – Método Horizontal para a detecção de espécies enteropatogénicas *Vibrio spp.*) a detecção de *Vibrio parahaemolyticus* requer várias e sucessivas fases.

Primeiramente, pesa-se assepticamente 10g de peixe num *BagFilter* e dilui-se em 90ml de água de peptona tamponada (utilizada como meio selectivo, com pH elevado e cloreto de sódio que permite o desenvolvimento das espécies *Vibrio*), homogeneizando-se a amostra no Stomacher durante 30 seg, e vai a incubar a 37°C durante 6h±1h para produtos congelados e a 41,5°C durante 6h±1h para produtos frescos.

Após terminado o período de incubação, deverá semear-se cada amostra em duplicado em placa de TCBS agar e SDS agar (onde as células que poderão estar lesadas por baixas temperaturas se poderão recuperar) e incubar as placas a 37°C ± 1°C durante 18-24h (ISO/TS 21872-1).

No final do período de incubação examinam-se as placas e seleccionam-se 5 colónias características, as quais têm mais que 2mm de diâmetro, geralmente de cor amarela/verde em TCBS e SDS (onde algumas estirpes de *Vibrios parahaemoliticus* se poderão apresentar de cor púrpura). Repicam-se as colónias suspeitas para um agar não selectivo e confirmando com os testes bioquímicos adequados.

---

### 4.3. Análise por PCR em Tempo Real

Para a detecção de *Vibrio parahaemolyticus* pelo método de PCR em tempo real, a amostra provém do departamento de Microbiologia Alimentar, após enriquecimento, sendo um passo muito importante para cada ensaio de PCR e a base para, ensaios precisos e confiáveis.

Na preparação dessas amostras utilizou-se um kit comercial , The Surefood, da Congen (<http://www.congen.de/>), que utiliza sondas e primers específicos para o *Vibrio parahaemolyticus*. O Kit Surefood Prep Bacteria I (Art. – N.º.C1021), que isola e purifica os ácidos nucleicos a partir de uma variedade de matérias-primas, alimentos e rações e o kit Surefood BAC *Vibrio parahaemolyticus* Plus V (Art. – N.º.C5120V), que permite detectar o DNA do *Vibrio parahaemolyticus*, sendo que cada reacção contém um controlo interno de amplificação (PLUS). Este kit está equipado para a detecção de dois sinais de fluorescência em 522nm e 533nm, ao mesmo tempo.

#### 4.3.1. Extração do DNA das amostras

Seguindo o protocolo do kit Surefood Prep Bacteria I (Art. – N.º.C1021), deverá transferir-se 1,0 ml da amostra de enriquecimento para um tubo de reacção de 1,5ml, em condições esterilizadas. Centrifugar a 12.000 rpm, durante 5 min. Rejeitar o liquido e inactivando-o por esterilização. Juntar 400µl de Lysis Buffer e incubar a 99°C, durante 10 minutos, sob agitação contínua. O volume irá variar dependendo da quantidade de DNA de cada amostra e também da natureza da amostra.

Centrifugar a amostra lisada a 12.000 rpm durante 1 min. Transferir 300µl do liquido sobrenadante para um novo tubo de reacção de 1,5ml. Juntar 200µl de Binding Buffer ao filtrado e agitar a amostra. Colocar a mostra num tubo com filtro e incubar à temperatura da sala, durante 1 minuto. Centrifuga a 12.000rpm durante 1 min. Retirar o filtro e rejeitar o filtrado e colocar novamente o filtro no tubo. Purificar a amostra com duas lavagens com Wash Buffer. Adicionar 550µl de Wash Buffer ao tubo com filtro, centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min, rejeitando o filtrado. Repetir este passo. Remover o etanol residual com uma centrifugação final de 12.000 rpm durante 2 min. Colocar o filtro num novo tubo de reacção de 1,5ml e adicionar 100µl da preparação de

---

Elution Buffer. Incubar durante 3 minutos à temperatura da sala e centrifugar 1 minuto a 10.000rpm. Depois da centrifugação, retirar o filtro.

A Preparação de DNA está pronta para ser usada no PCR.

O DNA poderá ser guardado durante 24h a 4°C ou mais de 24h a -20°C.

#### 4.3.2. Preparação da PCR

Seguindo o protocolo do kit Surefood BAC *Vibrio parahaemolyticus* Plus V (Art. – N.º.C5120V), previamente para a preparação da mistura de PCR (master-mix), deve-se calcular o numero total de reacções que se irá necessitar (onde se deve incluir as amostras e reacções de controlo) (Quadro 1). As reacções de controlo recomendadas são o controlo negativo, controlo positivo e o controlo de extracção. A master mix contém um controlo de amplificação interna para cada reacção, sendo recomendado preparar a master mix com 10% de volume adicional.

Cálculo e preparação para 10 reacções:

**Quadro 1:** Componentes e respectivos volumes para Master mix.

Componentes para o Master mix	Quantidade por reacção	10 reacções (com mais 10%)
<i>V. parahaemolyticus</i>	19.9µl	218.9µl
Plus V reaction mix		
Taq polymerase	0.1µl	1.1µl
Volume total	20µl	220µl

Utilizando a master mix, pipeta-se 20µl da master mix para tubos apropriados. O tubo com o controlo negativo é fechado sem qualquer adição de amostra e dos componentes da PCR.

De cada amostra de DNA retira-se 5µl para os tubos. A mesma quantidade deverá retirar-se de controlo positivo para o tubo. Todos os tubos são submetidos a uma centrifugação de baixa velocidade, antes de serem colocados no aparelho de PCR.

---

### 4.3.3. Programa de PCR

No aparelho de PCR utilizado, da Applied biosystems StepOne™ instrument (Figura 1), deverá colocar-se os parâmetros indicados no Quadro 2.



**Figura 1:** Aparelho PCR em Tempo Real da Applied biosystems.

**Quadro 2:** Parâmetros para o PCR tempo real.

<b>Desnaturação inicial</b>	<b>5 min, 95°C</b>
<b>Ciclos</b>	<b>45</b>
<b>Desnaturação</b>	<b>15 seg, 95°C</b>
<b>Annealing/Ampliação</b>	<b>30 seg, 60°C</b>

Os equipamentos, destinados à realização da PCR em tempo real, associam um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reacção de amplificação.

Os sinais de fluorescências, produzidos à medida que o produto é amplificado, são expressos graficamente, o FAM correspondente à amplificação do Vibrio, o VIC, controlo interno da amplificação.

Para uma amostra ser positiva, a amostra de DNA tem de mostrar amplificação no sistema de detecção (FAM).

Uma amostra é negativa, se a amostra de DNA não mostrar amplificação e se o controlo interno (Controlo de inibição) da amostra for positivo (VIC). Se a amostra de DNA e o controlo interno forem negativas, as amostras contém substâncias que impediram a amplificação. Nestas circunstâncias a avaliação das amostras não será possível, as amostras de DNA, o seu isolamento e purificação tem de ser melhorada e repetidas as análises.

### 4.4. Análise estatística

A análise estatística afectou-se através do programa SAS (Statistical Analysis System, 2000) e compreendeu 3 fases distintas.

Inicialmente, realizou-se uma análise exploratória dos dados através dos procedimentos Proc Means e Proc Freq do SAS, que permitiram obter as

---

---

estatísticas descritivas das diversas variáveis consideradas e a distribuição das mesmas.

Numa segunda fase, procedeu-se a análise de variância preliminar através do Proc GLM (general linear models procedure) do programa SAS, com o objectivo de avaliar quais os factores que influenciam o resultado da análise de vibrio por PCR em tempo real. Com esta análise de variância pretende-se fraccionar a variabilidade da variável dependente (resultado da análise de vibrio) em diversos factores, designados de variáveis independentes. Neste trabalho a variável dependente é o resultado (negativo ou positivo) da análise de vibrio por PCR em tempo real e como variáveis independentes foram consideradas o tipo de amostra (P1, P2 e P3), a época (Época 1 – Nov a Março e Época 2 – Abril a Julho), a espécie de peixe, o mar em que o mesmo foi capturado e as horas de enriquecimento da amostra.

O modelo linear utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijklm} = \mu + \text{tipo}_i + \text{epoca}_j + \text{especie}_k + \text{mar}_l + \text{horas}_m + e_{ijklm}$$

em que  $y_{ijklm}$  corresponde ao resultado (positivo ou negativo) das análises,  $\mu$  é a média global,  $\text{tipo}_i$  o efeito do tipo de amostra,  $\text{epoca}_j$  o efeito da época de recolha,  $\text{especie}_k$  o efeito da espécie de peixe,  $\text{mar}_l$  o efeito do mar de captura do peixe,  $\text{horas}_m$  o efeito das horas de enriquecimento e  $e_{ijklm}$  é o efeito residual associado a cada registo.

Através desta análise de variância não foi possível detectar qualquer efeito significativo dos factores considerados na positividade do resultado da análise de vibrio por PCR em tempo real.

Por ultimo, e devido aos resultados da análise de vibrio por PCR em tempo real não apresentar uma distribuição normal, efectuou-se uma análise de Regressão Logística. A probabilidade da análise ser negativa foi analisada através de um modelo de regressão logística, com o Proc Logistic do Programa SAS, incluindo como factores diversas variáveis classificadas (tipo - P1, P2 e P3; espécie peixe; época de colheita (inverno, primavera); local de captura) e contínuas (temperatura de recolha; tempo de enriquecimento).

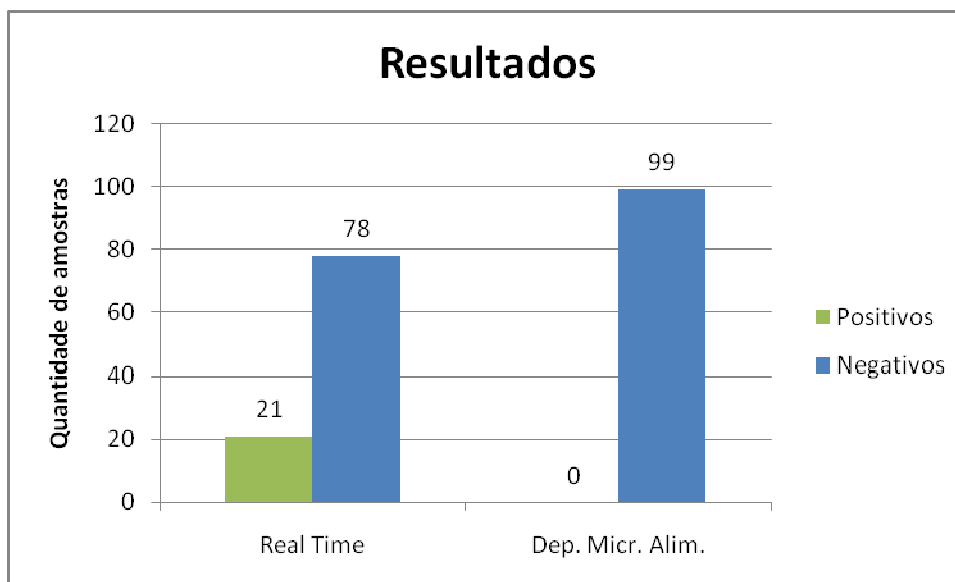
Após exclusão das variáveis que não influenciaram significativamente ( $P > 0.05$ ) o resultado da análise, o modelo final de análise apenas incluiu como variáveis independentes o efeito do tempo de enriquecimento (contínua) e da época de recolha da amostra (classificada).

---

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quadro A4 (APÊNDICE II) e na Figura 2, estão evidenciados os resultados das amostras, quer método Clássico, quer pelo PCR Real Time. A verde estão todos os resultados positivos.



**Figura 2:** Resultados das análises efectuadas do PCR em tempo real (Real Time) e pelo Método Clássico (Dep. Micr. Alim.) do LMV.

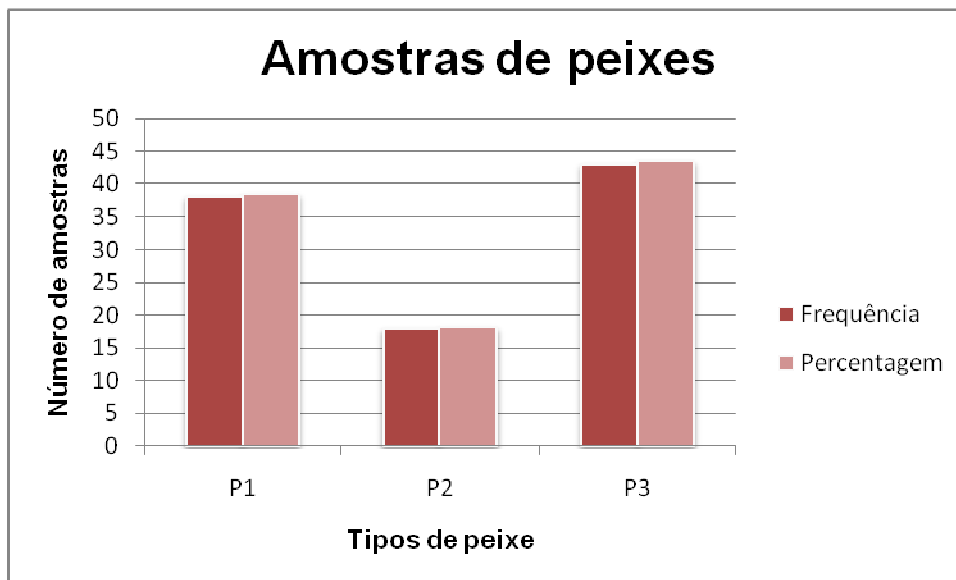
Estes resultados põem em evidencia a elevada sensibilidade do método PCR em tempo real relativamente ao método clássico. Pois o PCR em tempo real permite detectar células viáveis e não viáveis, exige uma menor quantidade de células e menores exigências de crescimento e cultura.

Sendo que o PCR em tempo real utiliza também o pré-enriquecimento, levando a que as bactérias sejam detectadas mais rapidamente por PCR, do que por métodos bacteriológicos standard, isto porque se tratam de resultados qualitativos, (presença/ausência) e não quantitativos, (ufc/g).

Este factor torna a escolha da amostra ainda mais importante, visto que só o facto de o organismo estar presente é relevante, independentemente da quantidade de células

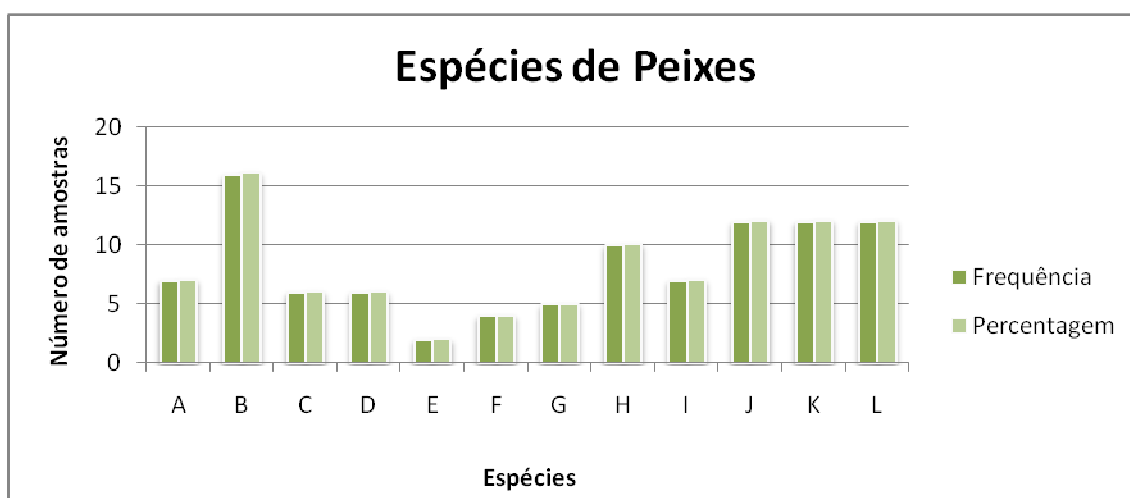
As diferentes amostras de peixe que entraram e foram retiradas, têm proveniência de vários estabelecimentos de venda ao público a nível nacional, subdividindo-se em várias espécies diferentes.

Na Figura 3, estão evidenciados o número de amostras retiradas por tipo, referentes a P1, amostras de pescado inteiro, nomeadamente, dourada, robalo, truta, lulas (descongeladas), potas, pargo, fanecas, besugo e postas de salmão, P2, amostras de pescado manipulado, nomeadamente, corvina, perca, salmão, e P3, amostras de escombroides, nomeadamente, atum, sarda, cavala, sardinha, carapau e chicharro.



**Figura 3:** Quantidades de amostras por tipo.

Na figura 4, estão evidenciadas as diversas espécies utilizadas e a respectiva quantidade, catalogadas por letras, que correspondem a cada espécie, legendadas no quadro 3.

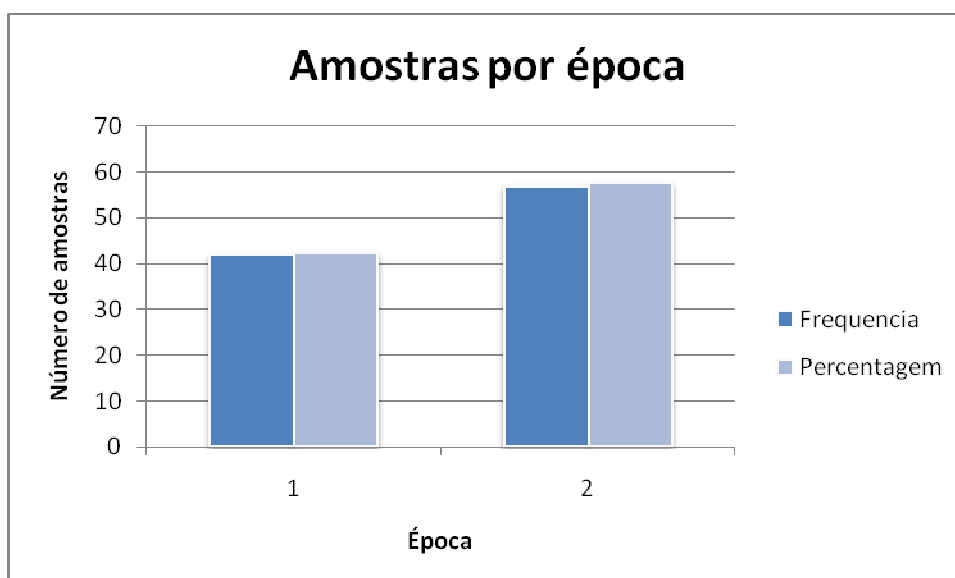


**Figura 4:** Quantidades de amostras por espécie.

**Quadro 3:** Espécies catalogadas por ordem alfabética.

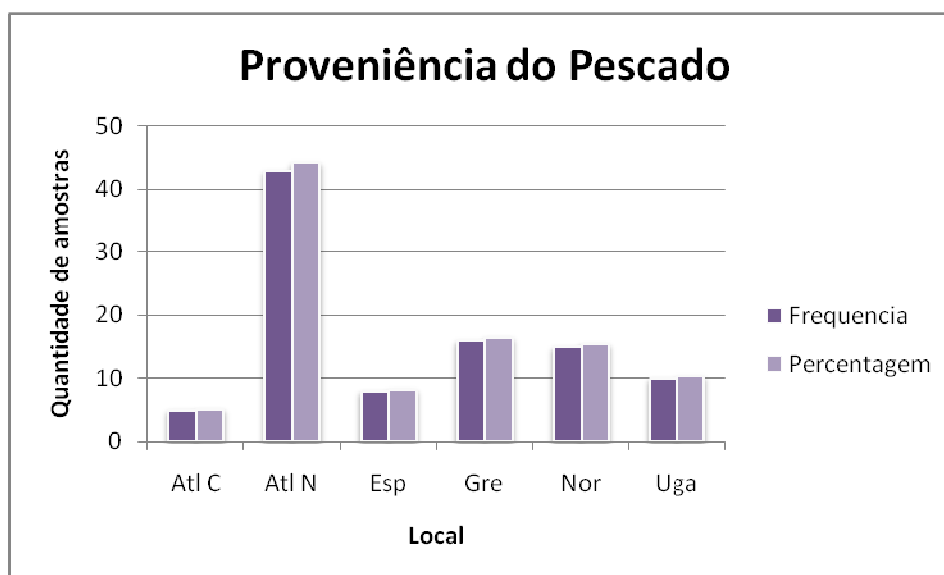
Código	Amostra
A	Dourada
B	Robalo
C	Salmão
D	Truta
E	Faneca
F	Pargo Mulato
G	Corvina
H	Perca
I	Atum
J	Carapau
K	Cavala
L	Sardinha

Na Figura 5, estão evidenciadas o número de amostras por época, época 1, de Novembro de 2009 a Março de 2010 e época 2, de Abril a Julho de 2010. Foi efectuada esta divisão, uma vez que o *Vibrio parahaemolyticus* tem maior prevalência nos meses de Verão, isolamos assim alguma tendência para desvios, dividindo as amostras por épocas, época 1 Inverno e época 2 Verão.



**Figura 5:** Nº de amostras por época (época 1 de Novembro de 2009 a Março de 2010, época 2 de Abril a Julho de 2010).

As diversas amostras foram recolhidas de várias locais diferentes, na figura seguinte (Figura 6), estão dispostas por local de proveniência, que corresponde a Oceano Atlântico Central (Atl C), ao Oceano Atlântico Nordeste (Atl N), Aquacultura Espanha (Esp), Aquacultura Grécia (Gre), Aquacultura Noruega (Nor) e Aquacultura Uganda (Uga).



**Figura 6:** N<sup>o</sup> de amostras recolhidas por locais de proveniência( Oceano Atlântico Central (Atl C), ao Oceano Atlântico Nordeste (Atl N), Aquacultura Espanha (Esp), Aquacultura Grécia (Gre), Aquacultura Noruega (Nor) e Aquacultura Uganda (Uga)).

**Quadro 4:** Resultados da análise de regressão logística

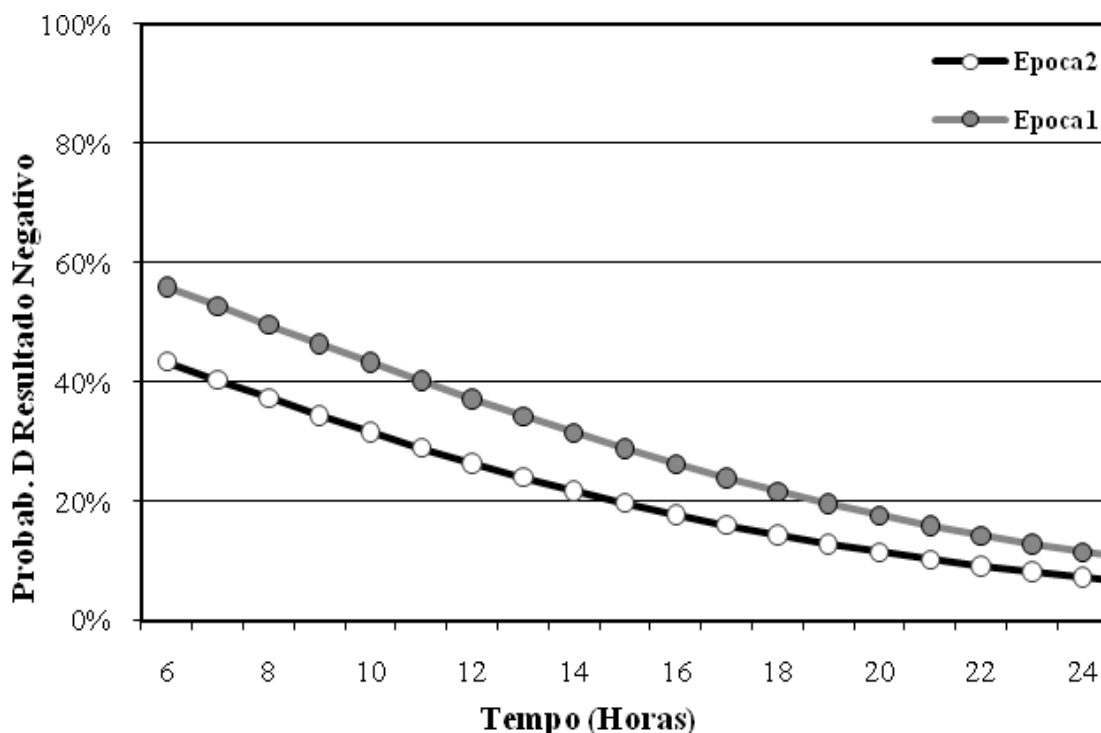
Efeito	Graus de Liberdade	Qui-Quadrado	Probabilidade e
Época	1	9,0475	0,0026
Tempo Enriquecimento	1	3,4354	0,0638

Estimaram-se os seguintes parâmetros a partir da análise de regressão logística da pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*.

**Quadro 5:** Estimativas de Odds Ratio

Efeito	Odds Ratio
Tempo de enriquecimento	0.881
Época (1 vs 2)	2.725

Em termos de escala logit, pode-se dizer que, para cada unidade de aumento do tempo o logit varia (diminui) -0,127. Também podemos dizer que para um aumento de uma unidade no tempo de enriquecimento, o *Odds ratio* da probabilidade da análise ser negativa varia  $(0.881) * 100\% = -88.1\%$  (Figura 7).



**Figura 7:** Probabilidade do Resultado ser negativo, relativamente ao tempo de enriquecimento das amostras, por análise *Odds Ratio*.

Na análise dos parâmetros e dos resultados dados pelo PCR, das amostras sujeitas a análise, os valores de EPC (controlo positivo externo) e NC (Controlo negativo) validam a análise.

---

Os resultados negativos apresentaram amplificação só do controlo interno, não amplificando a amostra (Figura A1, Apêndice III)(a amplificação do controlo interno valida as análise) e os resultados positivos, para além da amplificação do controlo interno, amplificou também a amostra, variando o ciclo de amplificação (Figura A2, Apêndice III).

A amostra pura de *Vibrio parahaemolyticus*, mostrou a sua amplificação logo aos 18 ciclos de corrida do programa(Figura A3, Apêndice III). Todos os outros positivos variaram o seu ciclo de ampliação, possivelmente devido à maior ou menor concentração do agente patogénico.

Após a análise das várias variáveis independentes, pode-se dizer que o tempo de enriquecimento e a época de recolha foram os que mais influenciaram a variável dependente, ou seja, o resultado negativo ou positivo das análises.

Segundo os resultados, em relação ao tempo de enriquecimento, quanto maior o tempo que as amostras estão na cultura inicial de enriquecimento, mais de 6h±1h para produtos congelados e a 41,5°C durante 6h±1h para produtos frescos, segundo a ISO/TS 21872-1, maior a probabilidade do resultado ser positivo. Em relação à época de recolha/apanha do pescado, uma vez que segundo KANEKO and COLWELL(1978); DOYLE *et al* (2007), o *Vibrio parahaemolyticus* é amplamente desiminado no estuário e ambientes costeiros de todo o mundo. A temperatura da água, a salinidade, os zooplacton, as mudanças das marés e o oxigénio dissolvido, desempenham um papel importante no seu território de distribuição temporal. Este patogéneo normalmente não é encontrado nas águas durante os meses do Inverno, pois a temperatura é demasiado baixa para a sua existência. A influência da temperatura da água tem-se demonstrado importante, pois a ocorrência de epidemiologias ocorrem durante os meses mais quente.

Recentemente, a técnica de PCR em tempo real tem se mostrado útil na detecção de microrganismos patogénicos em produtos alimentícios (KIMURA *et al.*, 2000; LYON, 2000; FORTIN *et al.*, 2001). Este relatório tem em vista a detecção de *Vibrio parahaemolyticus* em diversas espécies de pescado.

As amostras foram submetidas a várias análises como referido no ponto 4.2. deste relatório, tendo todas as amostras um resultado satisfatório do ponto de vista de segurança alimentar e cumprindo a legislação em vigor para os

---

---

parâmetros analisados. Mais concretamente, as 99 amostras analisadas, todas elas revelaram um resultado negativo, pelo método clássico.

No PCR em tempo real, das 99 amostras analisadas, 21 amostras revelaram-se positivas (Quadro A1, Figura 1). Com estes dados procedeu-se a uma análise para ver a influência dos diversos factores, como a época de recolha, proveniência do pescado, temperatura de recolha, espécie e tempo de enriquecimento.

Depois de uma análise de regressão logística da pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, por *Odds Ratio*, pode-se dizer que por cada unidade de tempo de enriquecimento, a probabilidade da amostra ser negativa é de 88,1%, ou seja, uma probabilidade extremamente elevada, devendo os tempos de enriquecimento sido cumpridos com exactidão, as  $6h \pm 1h$ .

A positividade encontrada por PCR em Tempo Real, segundo OTWEELL (1997), poderá ser um risco, especialmente para indivíduos portadores de infecções crónicas ou degenerativas que consomem pescado com *Vibrio parahaemolyticus*, representando um factor adicional à probabilidade de ocorrência de casos isolados, surtos de gastroenterite ou outras patologias envolvendo o consumo do alimento contaminado.

Os falsos negativos, que poderão surgir pelo método clássico, são um perigo para a segurança alimentar quando os microrganismos patogénicos são classificados como ausentes na amostra, durante a determinação da resistência térmica, não havendo detecção no momento de amostragem, podendo estas estar viáveis no momento do consumo pelo hospedeiro, causando problemas de segurança e deterioração dos alimentos.

Segundo OLIVER (2005), a viabilização destas células é muito importante, apesar de apenas ser possível pelos métodos automatizados. As células fragilizadas e as células viáveis não cultiváveis (VNC) são possíveis de detectar pelo método PCR, pois este sintetiza o DNA e as proteínas das mesmas, permitindo uma extensão e uma taxa de viabilização que permite a posterior detecção. A presença de células VNC é um problema de saúde pública porque as células neste estado não são detectadas pelas metodologias clássicas utilizadas na rotina em laboratórios, resultando numa avaliação inadequada de alimentos contaminados com patogénicos. Estas células ao

---

serem ingeridas, e ao entrarem em contacto com o hospedeiro, podem retomar a capacidade de se multiplicar e causar doenças (DOYLE *et al*, 2001;2007).

A patogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus* merece estudos adicionais e novas técnicas. Outro aspecto relevante para promover o não aparecimento de *Vibrio parahaemolyticus*, será a manutenção das temperaturas correctas de refrigeração, desde a apanha até ao consumo, pois o *Vibrio parahaemolyticus* possui um tempo de geração muito curto (DOYLE *et al*, 2007; MONTEVILLE *et al*,2008). Salienta-se a importância da manutenção das regras básicas de higiene que auxiliam o combate à contaminação cruzada ou a re-contaminação de um alimentos pronto para consumo. Bem como a sua confecção insuficiente deverá terminar, pois representa um risco para a população consumidora, pois a sua cozedura deverá reduzir a ingestão dos agentes patogénicos, não só de *Vibrio parahaemolyticus* bem como de todos os outros agentes que possam representar algum risco para a saúde do consumidor. A confecção reduz a carga microbiana dos alimentos *in natura* (MUNTADA-GARRIGA *et al*, 1995).

A presença de *Vibrio parahaemolyticus* em pescado deve-se ao desequilíbrio entre o organismo, o ambiente e o agente patogénico. Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema de defesa do organismo fica debilitado, devido ao gasto energético extra empregado na sua adaptação às novas condições, tornando-se vulnerável ao ataque do patogénico presente no meio (PEREIRA, 2004).

O pescado devido à sua natureza halofílica são uma forte potencial de contaminação por *Vibrio parahaemolyticus* (DESMARCHELIER,2003). Tantiilo *et al*,2004, afirmam que na ultima década houve surtos de *Vibrio parahaemolyticus* causadores de enfermidades que mereceram destaque, e que apesar da menor severidade dos casos comparados à cólera, que produzem importantes surtos epidemiológicos. Esta espécie, tem sido reconhecida como importante causa de toxinfecção alimentar, particularmente no Japão, que comem imenso pescado *in natura* (TRABULSI e ALTERTHUM,2004 e DESMARCHELIER, 2003).

---

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As primeiras provas de detecção de organismos patogénicos alimentares foram feitas há cerca de 20 anos havendo um risco cada vez maior de disseminação destes organismos. O controlo da qualidade microbiana é um programa cada vez mais aplicado em toda a cadeia de produção alimentar, de forma a minimizar o risco de infecção do consumidor (MALORNY,2003).

Os métodos de detecção incluem crescimento de microrganismos em meio específico, designando-se este processo por enriquecimento. Segue-se o isolamento de estirpes e identificação destas, por métodos imunológicos e serológicos definidos pela organização ISO.

Acontece que estes métodos, supostamente fiáveis e eficientes, requerem um grande período de tempo até à obtenção de resultados, variando este período entre 6 dias a algumas semanas, pois dependem do microrganismo em questão. Para além deste aspecto as propriedades fenotípicas de identificação de bactérias podem nem sempre ser expressas e, mesmo quando o são, a sua classificação e interpretação podem ser complicadas. A estas desvantagens junta-se a não detecção de células viáveis não cultiváveis.

Por sua vez, os ensaios de PCR, que só começaram a ser realizados há 10 anos, deram sinais positivos nos resultados obtidos.

É uma técnica que possui velocidade, bom limite de detecção, selectividade, especificidade, sensibilidade e potencial de automatização. No entanto, e apesar desta panóplia de qualidades, este novo método a nível tecnológico, tem um alto custo de investimento na sua implementação e a falta de instruções e regulamentações standards aprovadas, leva a que os laboratórios fiquem hesitantes quanto à sua utilização. Este estudo pretende mostrar a técnica de PCR em tempo real, poderá substituir o método clássico de análise.

Na sequencia das análises efectuadas, das 99 amostras analisadas, obteve-se um resultado positivo para o *Vibrio parahaemolyticus* em 21% das amostras, no método de PCR em tempo real, contrastando com o resultado 100% negativo pelo método clássico. Assim, dos dois métodos em estudo, o método PCR em tempo real, demonstrou ser o mais adequado para detectar a

---

presença de *V. parahaemolyticus* em pescado, uma vez que gerou maior número de amostras positivas.

Este método é especialmente interessante pois reduz bastante o tempo de análise das amostras contribuindo assim para um aumento da segurança alimentar dos consumidores deste tipo de produtos.

Com este trabalho tornou-se evidente as características e capacidades da técnica de PCR em tempo real.

Além destas características de teor técnico não nos podemos esquecer de que, apesar do investimento inicial de implementação da tecnologia de PCR, o tempo útil para o conhecimento dos resultados é reduzido enormemente em relação aos testes e exames realizados por métodos clássicos, sendo que todo este tempo ganho se virá a traduzir numa mais-valia a médio prazo.

Deve ter-se ainda em conta que os custos nas análises alimentares regulares realizadas por tecnologia de PCR, em comparação com métodos de diagnóstico clássico definidos pelas normas de standardização da ISO, não diferem em muito e que pela rapidez do alcance destes mesmos resultados, podem deste modo realizar-se um volume de análises muitíssimo maior.

Este trabalho pretende encorajar a implementação de um método sensível e economicamente efectivo de detecção de microrganismos patogénicos alimentares, tornando-o numa ferramenta de diagnóstico fácil e rotineiro. Uma potencial prática diária em microbiologia alimentar.

Com este trabalho o Laboratório de Medicina Veterinária poderá utilizar a técnica de PCR em Tempo Real, com reprodutibilidade e fiabilidade que esta tem, em substituição ou alternativa ao Método Clássico.

---

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ✓ BHUNIC, A.; (2008); Foodborne Microbial Pathogens; Mechanisms and pathogenesis; Springer; 241-249;
- ✓ BLAKE, P. A., WEAVER, R. E., HOLLIS, D. G.;(1980); Disease of humans (other than *Cholera*) caused by *Vibrios*; Annu; Rev. Microbiol. 34:341–367;
- ✓ BONDS C. E.; (1996); Biology of Fishes, 2nd ed. (Saunders, 1996); 599-605;
- ✓ BUSH, U.; NITSCHKO, H.; (1999); Methods for the differentiation of microorganisms.; J. Chromatography; Amsterdam; 263-278;
- ✓ D'AOUST, J.Y., SEWELL, A., DALEY,E.;(1992); Inadequacy of small transfer volume and short (6h) Selective Enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. J Food Prot, v.55, n.5; 326-328;
- ✓ DE PAOLA, A.; KAYSNER, C.A.; BOWERS, J.; COOK, D.W.; (2000); “Environmental Investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas and New York (1997 and 1998)”; Applied and Environmental Microbiology, 66; 4649-4654;
- ✓ DEEPANJALI, A.; KUMAR, H.S.; KARUNASAGAR, I; (2005); “Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India”; Applied and Environmental Microbiology, 71; 3575-3580;
- ✓ DESMARCHELIER, P.M.; (2003); Pathogenic *Vibrios*; In: Foodborne microorganisms of public health significance; Sixth Edition; Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch); Food Microbiology Group: New South Wales, Australia; 333-358;
- ✓ DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L.R.; VILLE, T.,J.; (2001); Food Microbiology Fundamentals and Frontiers; Second Edition; ASM Press; Washington DC; 24-28;
- ✓ DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L.R.; (2007); Food Microbiology Fundamentals and Frontiers; Third Edition; ASM Press; Washington DC;78-361;
- ✓ FRAZIER,W.C.; (1976); Microbiología de los alimentos; Editorial Acribia; 2ª edición; Zaragoza (España); 281-291;’

- 
- ✓ FORTIN, N. Y.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W.; (2001); Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157: H7; *Anal. Biochem.* 289; 281–288;
  - ✓ HICKMAN, ROBERTS e LARSON; (2004); *Princípios Integrados de Zoologia*; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;
  - ✓ JANDA, J. M.; POWERS C.; BRYANT, R. G.; ABBOT, S.; (1988); Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio spp.*; *Clin. Microbiol.*; rev. 1: 245-267;
  - ✓ KANEKO, T.; and R. R. COLWELL; (1978); The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay; *Microb. Ecol.* 4; 135–155;
  - ✓ KIMURA, B.; KAWASAKI, S.; NAKANO, H.; FUJII, T.; (2000); Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish; *Appl. Environ. Microbiol.* 67; 206–216;
  - ✓ KING, M.; (1995); *Fisheries Biology, Assessment and Management*; Blackwell Science; Oxford; 341;
  - ✓ LIN, Z.; KUMAGAI, K.; BABA, K.; MEKALANOS, J. J.; NISHIBUSHI, M.; (1993); “*Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene”; *Journal of Bacteriology*, 175; 3844-3855;
  - ✓ LYON, W. J.; (2000); TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater; *Appl. Environ. Microbiol.* 67; 4685–4693;
  - ✓ MACKAY, I. M. *et al.*; (2002); Real-time PCR in virology; In: *Nucleic Acids Research*; 1292-1305;
  - ✓ MACKAY, I. M. *et al.*; (2004); Real-time PCR in the microbiology laboratory; In: *Clin Microbiol Infect*; 190-212;
  - ✓ MALORNY, B. *et al.*; (2003); Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens; *Int. J. Food Microbiol.*; Amsterdam; v. 83, n. 1; 39-48;
  - ✓ MONTEVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R.; (2008); *Food Microbiology – An Introduction*; Second Edition; ASM Press; Washington DC; 90-281;
-

- 
- ✓ MUNTADA-GARRIGA, J.M.; Rodriguez-Jerez, J.J.; Lopez-Savater, E.I.; Mora-Ventura, M.T.; (1995); Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat; *Letter of Applied Microbiology* 20; 225-227;
  - ✓ PANICKER, G.; CALL, D.R.; KRUG, M.J.; BEL, A.K.; (2004); "Detection of pathogenic *Vibrio* spp. In shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays"; *Applied and Environmental Microbiology*, 70; 7436-7444;
  - ✓ PEDRO, S.; CASTRO, S.; SANTOS, M.; SANTOS, A.T.; (2005); "Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood products"; *Proceedings of the 35<sup>th</sup> WEFTA meeting*; Antuérpia, Bélgica; 371-380
  - ✓ PELCZAR, M.; REID, R.; (1981); *Microbiologia*; E.C.S. Chan; Editora McGraw-Hill; Volume II; Brasil; 875-931;
  - ✓ OLIVER, J.D.; (2005); Viable but non culturable state in bacteria; *Journal of Microbiology*; V. 43; 93-100;
  - ✓ POTASMAN, I., PAZ, A. and ODEH M.; (2002); Infectious outbreaks associated with bivalves shellfish consumption: a worldwide perspective; *Clin. Infect. Dis.*; 921-928;
  - ✓ RIPPEY, S. R.; (1994); Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption; *Clin. Microbiol.; rev.* 7: 419-425;
  - ✓ SAUNDERS, N.A.; (2004); Real-time PCR; In: *Methods Mol Biol* 266; pags.191-211;
  - ✓ SU, Y. C., LIU, C.; (2007); *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety"; *Food Microbiology*, 24; 549-558;
  - ✓ TANTILLO, G.M.; FONTAMOROSA, M.; DI PINTO, A. & MUSTI, M.; (2004); Updated perspectives on emerging *Vibrios* associated with human infectious; *Lett. Appl. Microbiol.*; v. 39; 117-126;
  - ✓ THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J.; (2004); "Biodiversity of *Vibrios*"; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68; 403-431;
  - ✓ TRABULSI, L.R. & ALTERTHUM; (2004); *F, Microbiologia*, 4<sup>a</sup> edição; Editora Althermen; São Paulo;
  - ✓ TWEDT, R. M.; (1989); *Vibrio parahaemolyticus*; In M. P. Doyle (ed.); *Foodborne bacterial pathogens*; Marcel Dekker Inc., New York; 552-554;
-

- 
- ✓ WONG, H.; (2003); "Detecting and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus*"; *Journal of Food and Drug Analysis*, 11; 79-86;
  - ✓ WONG, H.C.; SHEN, C.T.; CHANG, C.N.; LEE, Y.S.; OLIVER, J.D.; (2004); "Biochemical and virulence characterization of viable but non culturable cells of *Vibrio parahaemolyticus*"; *Journal of Food Protection*, 67; 2430-2435.

---

## 8. MEDIAGRAFIA

- ✓ ADVIWARE PTY Lda; “Statistics by country for *Vibrio parahaemolyticus*”; [http://www.wrongdiagnosis.com/v/vibrio\\_parahaemolyticus](http://www.wrongdiagnosis.com/v/vibrio_parahaemolyticus) ; acedido em Dezembro de 2010;
- ✓ COSTA, A. P.,;(2007); “Convidados indesejáveis”, Selecções do Reader’s Digest; <http://www.selecco.es.pt/Revista/detalhe.asp?ID=5835>; acedido em Dezembro de 2010;
- ✓ TAVARES, A.; (2010);<http://economia.publico.pt/Noticia/dois-tercos-do-peixe-consumido-em-portugal-e-importado-1446616>; Dois terços do peixe consumido em Portugal é importado; Jornal Público; Secção Economia; acedido a 14 de Julho de 2010;
- ✓ INE (Instituto Nacional de Estatística);(2010); [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=94988324&PUBLICACOESmodo=2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=94988324&PUBLICACOESmodo=2); Boletim Mensal de Agricultura e Pescas; acedido a 14 de Julho de 2010
- ✓ FAO (2010). *Fishery and Aquaculture country profile - Portugal*; Profiles home; [http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP\\_PT/en](http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_PT/en); acedido a 13 de Julho de 2010;
- ✓ RIVER, C.; (2010); Detection and Identification of *Vibrio* Species in Food; <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Vibriosis.php>; ©Copyright [rapidmicrobiology.com](http://www.rapidmicrobiology.com) ; acedido a 28 de Julho de 2010;
- ✓ SILVA, J.A., (1998), Microrganismos patogénicos em carne de frango; <http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0019.htm>; Revista de higiene alimentar – nº58 – Outubro de 1998, última actualização 1998; acedido a 22/11/08.

---

# APÊNDICES

---

**APÊNDICE I: AMOSTRAS DE PESCADO DO TIPO P1, P2 e P3**

**Quadro A1:** Amostras do tipo P1, amostras de pescado inteiro.

Tipo	Identificação da amostra		Espécie	Mês	Data	Temperatura de recolha (°C)	Origem	Local de Recolha	Fornecedor	Horas de enriquecimento
P1	1	A	Dourada	2	02-02-10	1,4	420	Aq. Espanha	Maremar	6
P1	2	B	Robalo	2	02-02-10	2,8	810	Aq. Grécia	Nireus	6
P1	3	C	Salmão posta	2	02-02-10	8,6	446	Aq. Noruega	Seafood	6
P1	4	B	Robalo	2	02-02-10	1,7	691	Aq. Grécia	Nireus	6
P1	5	A	Dourada	2	02-02-10	6,2	468	Aq. Portugal	Ilha peixe	6
P1	6	B	Robalo	2	02-02-10	3,4	817	Aq. Espanha	Maremar	6
P1	7	B	Robalo	2	04-02-10	3,7	408	Aq. Grécia	Nireus	18
P1	8	D	Truta	2	04-02-10	0,7	812	Aq. Portugal	Castro e Cabero	18
P1	9	A	Dourada	2	04-02-10	3,5	476	Aq. Grécia	Nireus	18
P1	10	A	Dourada	2	04-02-10	3,2	373	Aq. Espanha	Maremar	18
P1	11	B	Robalo	2	04-02-10	1,4	336	Aq. Grécia	Nireus	18
P1	12	E	Faneca	2	04-02-10	3,7	621	Atlântico nordeste	Docapesca	18
P1	13	E	Faneca	2	04-02-10	4,3	313	Atlântico nordeste	Docapesca	18
P1	14	F	Pargo Mulato	2	04-02-10	0,4	342	Atlântico Centro Este	PD Aza	18
P1	15	D	Truta	4	07-04-10	3,3	843	Aq. Portugal	Castro e Cabero	24
P1	16	D	Truta	4	07-04-10	0,5	836	Aq. Portugal	Castro e Cabero	24
P1	17	A	Dourada	4	07-04-10	2,7	319	Aq. Espanha	Maremar	24
P1	18	C	Salmão posta	4	07-04-10	3,4	415	Aq. Noruega	Seaborn	24
P1	19	D	Truta	4	07-04-10	3,2	863	Aq. Portugal	Castro e	24

									Cabero	
<b>P1</b>	20	B	Robalo	4	07-04-10	1,6	350	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	21	B	Robalo	4	07-04-10	-	367	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	22	C	Salmão posta	4	07-04-10	4,4	857	Aq. Noruega	Coast Seafood	18
<b>P1</b>	23	B	Robalo	4	28-04-10	1,2	705	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	24	D	Truta	4	28-04-10	5	708	Aq. Portugal	Castro e Cabero	18
<b>P1</b>	25	B	Robalo	4	28-04-10	1,9	329	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	26	B	Robalo	4	28-04-10	2,7	747	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	27	B	Robalo	4	28-04-10	2,7	364	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	28	B	Robalo	4	28-04-10	1,7	663	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	29	B	Robalo	4	28-04-10	1,6	660	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	30	B	Robalo	4	28-04-10	0,9	332	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	31	A	Dourada	4	28-04-10	1,4	801	Aq. Portugal	Ilha peixe	18
<b>P1</b>	32	B	Robalo	4	28-04-10	1,4	803	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	33	B	Robalo	4	28-04-10	2,1	437	Aq. Grécia	Nireus	18
<b>P1</b>	34	A	Dourada	4	28-04-10	1,3	658	Aq. Portugal	Ilha peixe	18
<b>P1</b>	35	D	Truta	4	28-04-10	8,4	478	Aq. Portugal	Qta salmão	18
<b>P1</b>	36	F	Pargo Mulato	6	21-06-10	3,8	855	Atlântico Centro Este	Delphinus	24
<b>P1</b>	37	F	Pargo Mulato	6	21-06-10	6,5	815	Atlântico Centro Este	Delphinus	24
<b>P1</b>	38	F	Pargo Mulato	6	21-06-10	2,2	816	Atlântico Centro Este	Delphinus	24

**Quadro A2:** Amostras P2, amostras de pescado manipulado.

Tipo	Identificação		Espécie	Mês	Data	Temperatura de recolha (°C)	Origem	Local de Recolha	Fornecedor	Horas de enriquecimento
P2	39	G	Corvina	5	10-05-10	4,3	465	Aq. Espanha	Doramenor	6
P2	40	H	Perca	5	10-05-10	5,3	699	Uganda	Anova food	6
P2	41	H	Perca	5	10-05-10	1,2	842	Uganda	Anova food	6
P2	42	H	Perca	5	10-05-10	3,7	464	Uganda	Anova food	6
P2	43	C	Filete Salmão	5	10-05-10	6,1	409	Aq. Noruega	PD Vila do Conde	6
P2	44	C	Espetada salmão	5	10-05-10	6,8	685	Aq. Noruega	PD Vila do Conde	6
P2	45	H	Perca	5	10-05-10	3,2	463	Uganda	PD Vila do Conde	6
P2	46	C	Salmão posta	5	11-05-10	6,4	825	Aq. Noruega	Seaborn	6
P2	47	H	Perca	5	12-05-10	3	306	Uganda	Anova food	24
P2	48	G	Corvina	5	12-05-10	6,5	686	-	-	24
P2	49	G	Corvina	5	12-05-10	4	674	Aq. Espanha	Doramenor	24
P2	50	H	Perca	5	12-05-10	2,7	673	Uganda	Anova food	24
P2	51	H	Perca	5	12-05-10	3,4	328	Uganda	Anova food	24
P2	52	H	Perca	5	12-05-10	3,8	678	Uganda	Anova food	24
P2	53	G	Corvina de Aquacultura	5	12-05-10	2,8	345	Aq. Espanha	PD Azambuja	24
P2	54	G	Corvina	5	12-05-10	4,2	380	Aq. Espanha	Doramenor	24
P2	55	H	Perca	5	12-05-10	2,1	311	Uganda	Água Nova F	24
P2	56	H	Perca	5	12-05-10	2,8	325	Uganda	Água Nova F	24

**Quadro A3:** Amostras P3, amostras de escombroides.

Tipo	Identificação		Espécie	Mês	Data	Temperatura de recolha (°C)	Origem	Local de Recolha	Fornecedor	Horas de enriquecimento
P3	57	K	Sarda	11	27-11-09	5,5	609	Atlântico nordeste	Isidro	6
P3	58	J	Carapau médio	11	27-11-09	0,3	612	Atlântico nordeste	Socied	6
P3	59	L	Sardinha	12	08-12-09	1,1	680	Atlântico nordeste	Docapesca	6
P3	60	K	Cavala	11	27-11-09	0,9	743	Atlântico nordeste	Isidro	6
P3	61	K	Sarda	3	03-03-10	1,8	336	Atlântico nordeste	Oceanus	18
P3	62	K	Cavala	3	03-03-10	1	621	Atlântico nordeste	Oceanus	18
P3	63	J	Carapau médio	3	03-03-10	3,6	313	Atlântico nordeste	Caluze	18
P3	64	K	Sarda	3	03-03-10	1,1	669	Atlântico nordeste	Oceanus	18
P3	65	J	Carapau médio	3	03-03-10	0,6	603	Atlântico nordeste	Oceanus	18
P3	66	J	Carapau médio	3	03-03-10	1	652	Atlântico nordeste	Oceanus	18
P3	67	J	Carapau médio	3	10-03-10	1,8	444	Atlântico nordeste	Frigorifi	18
P3	68	I	Atum	3	10-03-10	6,4	813	Atlântico nordeste	Friatum	18
P3	69	I	Atum	3	10-03-10	4,7	708	Atlântico nordeste	Friatum	18
P3	70	J	Carapau médio	3	10-03-10	5	820	Atlântico nordeste	Frigorifi	18
P3	71	J	Carapau médio	3	10-03-10	5	826	Atlântico nordeste	Frigorifi	18
P3	72	J	Carapau médio	3	10-03-10	1,8	447	Atlântico nordeste	Frigorifi	18
P3	73	J	Carapau médio	3	10-03-10	4,5	422	Atlântico nordeste	Frigorifi	18
P3	74	J	Carapau médio	3	24-03-10	2,3	303	Atlântico nordeste	Caluze	18
P3	75	L	Sardinha	3	24-03-10	3,7	383	Atlântico nordeste	Caluze	18
P3	76	L	Sardinha	3	24-03-10	3,4	311	Atlântico nordeste	Caluze	18
P3	77	L	Sardinha	3	24-03-10	5,8	632	Atlântico nordeste	Caluze	18
P3	78	J	Carapau médio	3	24-03-10	3,1	634	Atlântico nordeste	Caluze	18

<b>P3</b>	79	L	Sardinha	3	25-03-10	3,5	802	Atlântico nordeste	Oceanus	6
<b>P3</b>	80	J	Chicharro	3	25-03-10	0,7	441	Atlântico nordeste	Antonio M	18
<b>P3</b>	81	I	Atum	3	25-03-10	7,2	477	Atlântico nordeste	Friatum	18
<b>P3</b>	82	I	Atum	3	25-03-10	7,3	841	Atlântico nordeste	Friatum	18
<b>P3</b>	83	L	Sardinha	3	25-03-10	2,7	316	Atlântico nordeste	Caluze	18
<b>P3</b>	84	L	Sardinha	3	25-03-10	2	348	-	-	12
<b>P3</b>	85	L	Sardinha	7	26-07-10	3,4	677	Atlântico nordeste	Docapesca	6
<b>P3</b>	86	L	Sardinha	7	12-07-10	2,5	378	Atlântico nordeste	Soc. Pesca	6
<b>P3</b>	87	K	Cavala	7	12-07-10	7	379	Atlântico nordeste	Pescados Rosa	6
<b>P3</b>	88	K	Cavala	7	12-07-10	1,3	672	Atlântico nordeste	Pescados Rosa	6
<b>P3</b>	89	L	Sardinha	7	13-07-10	3,6	330	Atlântico nordeste	Soc. Pesca	18
<b>P3</b>	90	L	Sardinha	7	13-07-10	0,8	395	Atlântico nordeste	Soc. Pesca	18
<b>P3</b>	91	L	Sardinha	7	13-07-10	2,5	678	Atlântico nordeste	Soc. Pesca	18
<b>P3</b>	92	I	Atum	7	19-07-10	6,4	460	Atlântico Centro Este	Friatum	6
<b>P3</b>	93	I	Atum	7	20-07-10	2,7	775	Atlântico nordeste	Friatum	18
<b>P3</b>	94	K	Sarda	7	20-07-10	3,4	658	Atlântico nordeste	Docapesca	18
<b>P3</b>	95	K	Sarda	7	20-07-10	1,6	843	Atlântico nordeste	Docapesca	18
<b>P3</b>	96	K	Cavala	7	21-07-10	2,7	688	Atlântico nordeste	PD Vila do Conde	6
<b>P3</b>	97	K	Cavala	7	21-07-10	5	473	Atlântico nordeste	PD Vila do Conde	6
<b>P3</b>	98	K	Cavala	7	21-07-10	3,1	690	Atlântico nordeste	Pescados Rosa	6
<b>P3</b>	99	I	Atum	7	21-07-10	7,7	839	Atlântico nordeste	Friatum	18

---

**APÊNDICE II: RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE PESCADO DO TIPO P1,  
P2 e P3**

**Quadro A4:** Resultados das amostras P1, P2 e P3, do Departamento de Microbiologia Alimentar(ISO 21872-1-07) e do *Vibrio* Real Time.

Ti po	Núm ero	Espé cie	Resultado do Departamento de Microbiologia	Resultado do Vibrio Real Time	Result ados
P1	1	A	Negativo	Positivo	2
P1	2	B	Negativo	Positivo	2
P1	3	C	Negativo	Positivo	2
P1	4	B	Negativo	Positivo	2
P1	5	A	Negativo	Negativo	1
P1	6	B	Negativo	Positivo	2
P1	7	B	Negativo	Negativo	1
P1	8	D	Negativo	Negativo	1
P1	9	A	Negativo	Negativo	1
P1	10	A	Negativo	Negativo	1
P1	11	B	Negativo	Negativo	1
P1	12	E	Negativo	Negativo	1
P1	13	E	Negativo	Negativo	1
P1	14	F	Negativo	Positivo	2
P1	15	D	Negativo	Negativo	1
P1	16	D	Negativo	Negativo	1
P1	17	A	Negativo	Negativo	1
P1	18	C	Negativo	Negativo	1
P1	19	D	Negativo	Negativo	1
P1	20	B	Negativo	Negativo	1
P1	21	B	Negativo	Positivo	2
P1	22	C	Negativo	Negativo	1
P1	23	B	Negativo	Negativo	1
P1	24	D	Negativo	Negativo	1
P1	25	B	Negativo	Negativo	1
P1	26	B	Negativo	Negativo	1
P1	27	B	Negativo	Negativo	1
P1	28	B	Negativo	Negativo	1
P1	29	B	Negativo	Negativo	1
P1	30	B	Negativo	Negativo	1
P1	31	A	Negativo	Negativo	1
P1	32	B	Negativo	Positivo	2
P1	33	B	Negativo	Negativo	1
P1	34	A	Negativo	Negativo	1
P1	35	D	Negativo	Negativo	1
P1	36	F	Negativo	Negativo	1
P1	37	F	Negativo	Negativo	1
P1	38	F	Negativo	Negativo	1

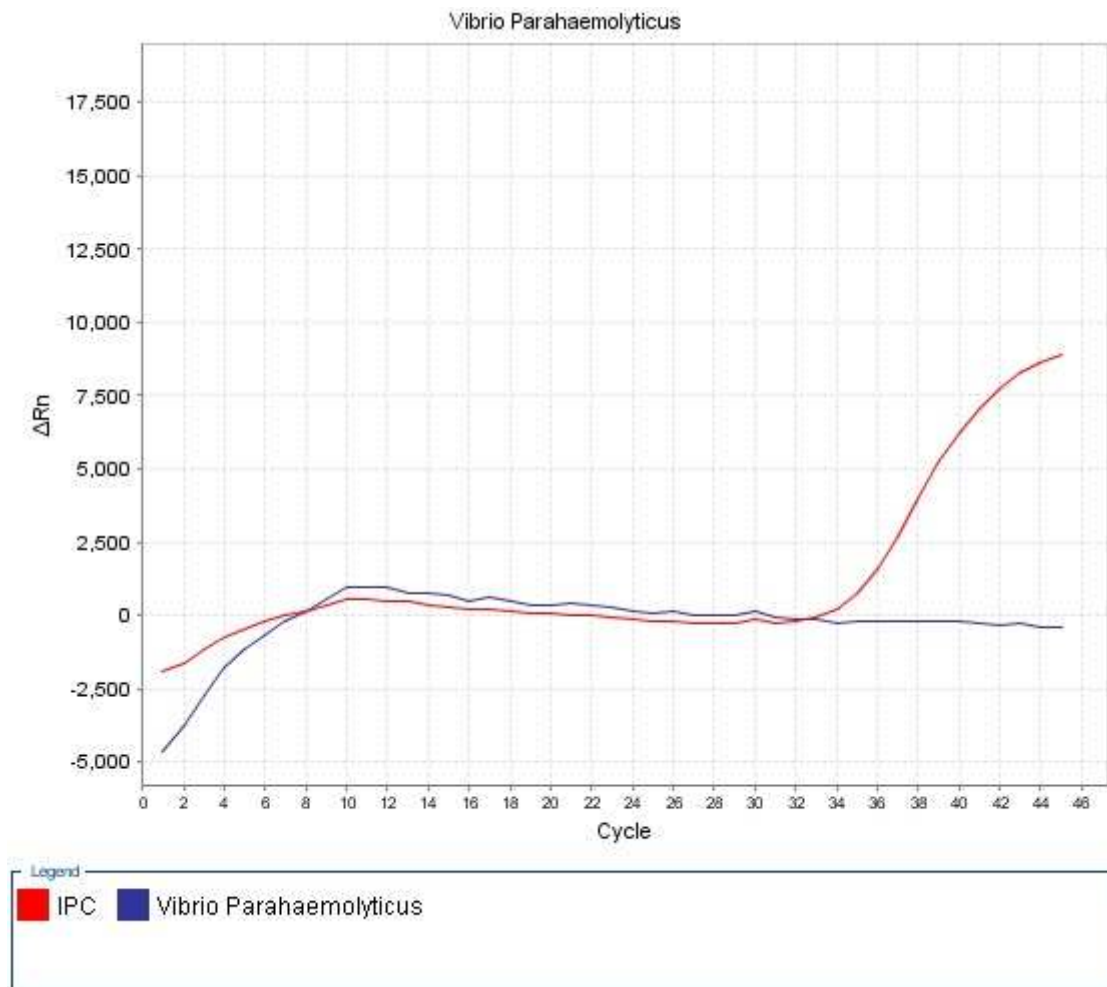
P2	39	G	Negativo	Negativo	1
P2	40	H	Negativo	Negativo	1
P2	41	H	Negativo	Positivo	2
P2	42	H	Negativo	Negativo	1
P2	43	C	Negativo	Negativo	1
P2	44	C	Negativo	Negativo	1
P2	45	H	Negativo	Negativo	1
P2	46	C	Negativo	Negativo	1
P2	47	H	Negativo	Negativo	1
P2	48	G	Negativo	Negativo	1
P2	49	G	Negativo	Negativo	1
P2	50	H	Negativo	Negativo	1
P2	51	H	Negativo	Negativo	1
P2	52	H	Negativo	Negativo	1
P2	53	G	Negativo	Negativo	1
P2	54	G	Negativo	Negativo	1
P2	55	H	Negativo	Negativo	1
P2	56	H	Negativo	Negativo	1
P3	57	K	Negativo	Negativo	1
P3	58	J	Negativo	Positivo	2
P3	59	L	Negativo	Negativo	1
P3	60	K	Negativo	Negativo	1
P3	61	K	Negativo	Positivo	2
P3	62	K	Negativo	Negativo	1
P3	63	J	Negativo	Negativo	1
P3	64	K	Negativo	Negativo	1
P3	65	J	Negativo	Negativo	1
P3	66	J	Negativo	Positivo	2
P3	67	J	Negativo	Negativo	1
P3	68	I	Negativo	Negativo	1
P3	69	I	Negativo	Negativo	1
P3	70	J	Negativo	Negativo	1
P3	71	J	Negativo	Negativo	1
P3	72	J	Negativo	Negativo	1
P3	73	J	Negativo	Negativo	1
P3	74	J	Negativo	Positivo	2
P3	75	L	Negativo	Negativo	1
P3	76	L	Negativo	Negativo	1
P3	77	L	Negativo	Positivo	2
P3	78	J	Negativo	Negativo	1
P3	79	L	Negativo	Negativo	1
P3	80	J	Negativo	Positivo	2
P3	81	I	Negativo	Negativo	1

---

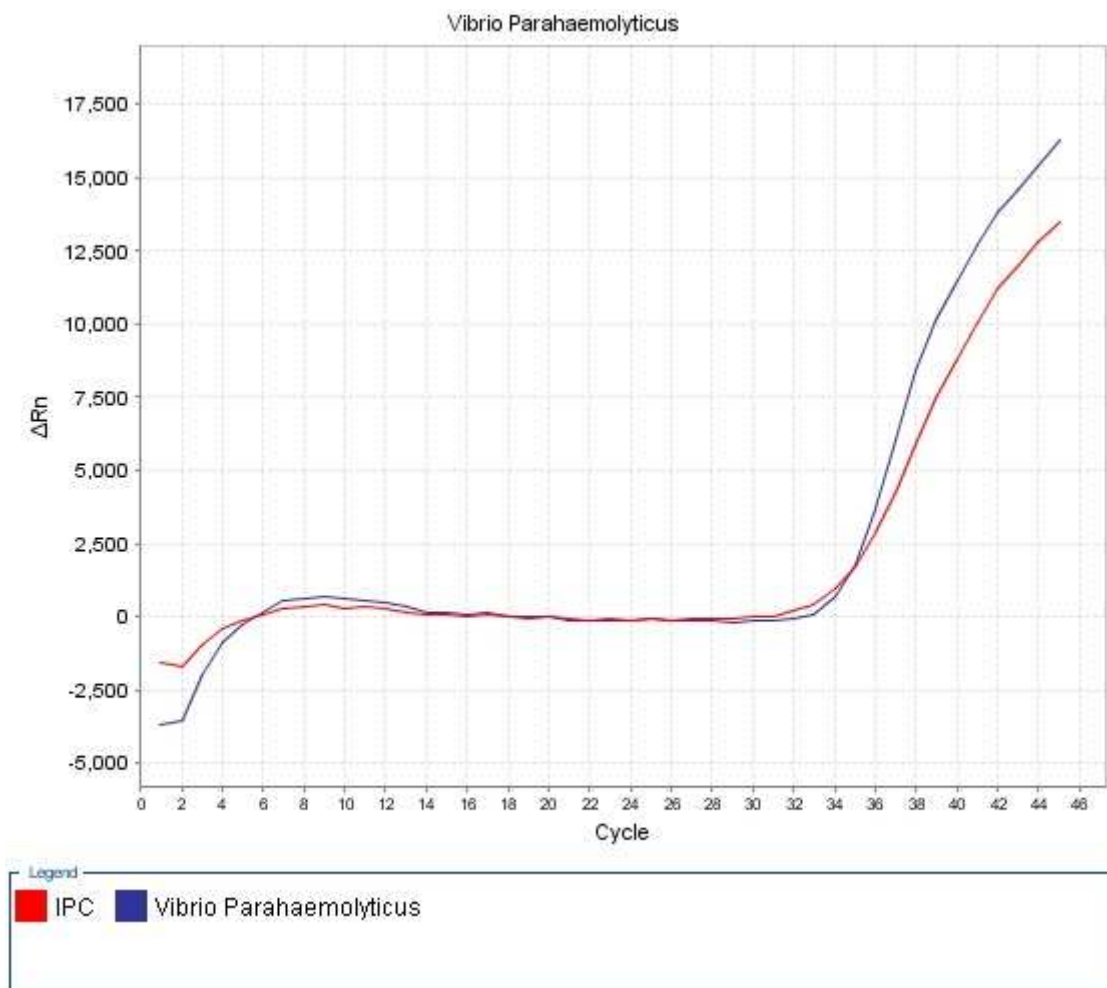
P3	82	I	Negativo	Negativo	1
P3	83	L	Negativo	Positivo	2
P3	84	L	Negativo	Negativo	1
P3	85	L	Negativo	Positivo	2
P3	86	L	Negativo	Negativo	1
P3	87	K	Negativo	Negativo	1
P3	88	K	Negativo	Negativo	1
P3	89	L	Negativo	Positivo	2
P3	90	L	Negativo	Negativo	1
P3	91	L	Negativo	Negativo	1
P3	92	I	Negativo	Positivo	2
P3	93	I	Negativo	Negativo	1
P3	94	K	Negativo	Negativo	1
P3	95	K	Negativo	Negativo	1
P3	96	K	Negativo	Negativo	1
P3	97	K	Negativo	Positivo	2
P3	98	K	Negativo	Positivo	2
P3	99	I	Negativo	Negativo	1

---

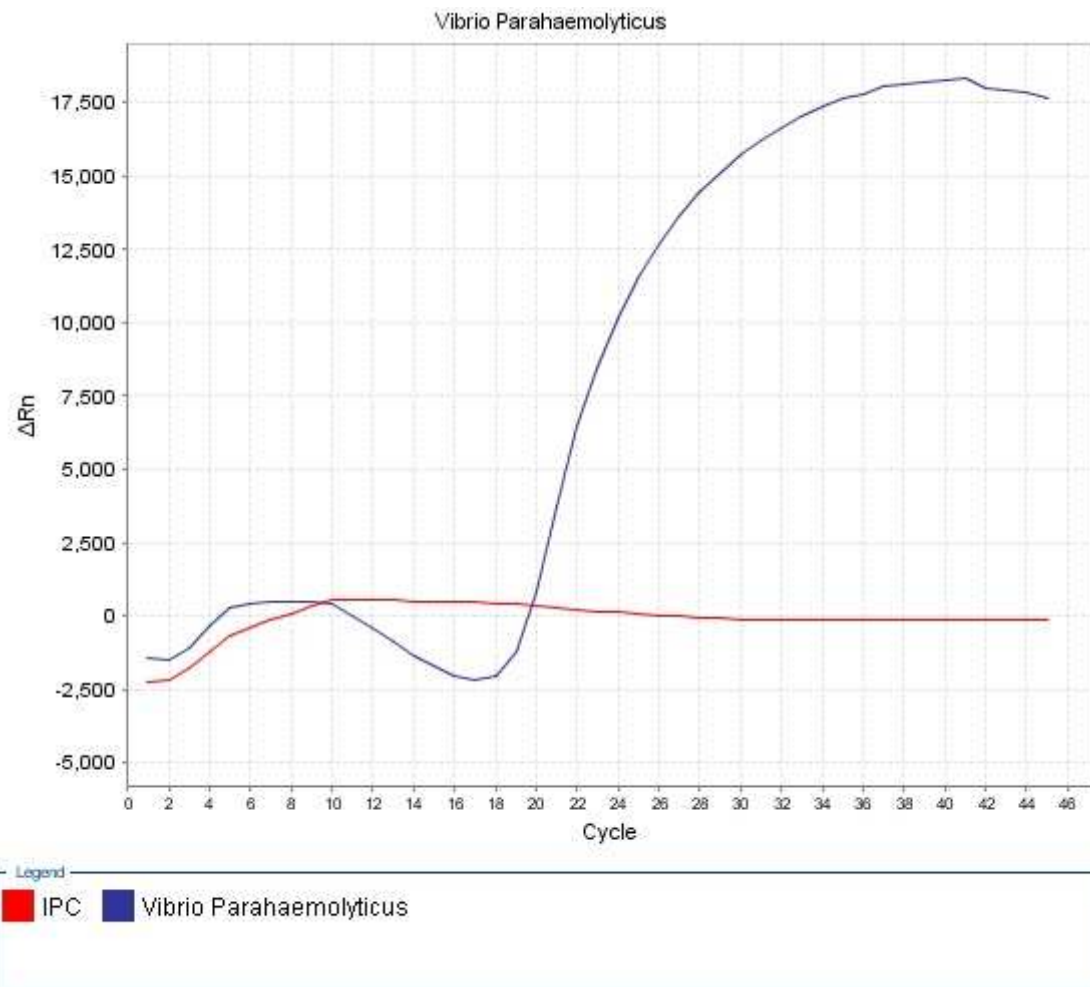
**APÊNDICE III: GRÁFICOS DOS RESULTADOS POSITIVO, NEGATIVO E  
CULTURA DE *Vibrio parahaemolyticus***



**Figura A1:** Gráfico de um resultado negativo para *Vibrio parahaemolyticus* no PCR em Tempo Real



**Figura A2:** Gráfico de um resultado positivo para *Vibrio parahaemolyticus* no PCR em Tempo Real



**Figura A3:** Gráfico da cultura pura de *Vibrio parahaemolyticus* no PCR em Tempo Real



## ERRATA

Instituto Politécnico de Santarém

Escola Superior Agrária de Santarém

Dissertação para Obtenção do grau de mestre na área de Sistemas de Prevenção e Controlo Alimentar

### IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE *Vibrio parahaemolyticus* EM ALIMENTOS

JOANA ISABEL RIBEIRO LOURENÇO

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
10	18	calssificados	classificados
13	17	... exige ingestão de 105 a 107 células viáveis...	...exige a ingestão de 10 <sup>5</sup> a 10 <sup>7</sup> células viáveis...
15	28	actua	actuais
34	10 e 11	pois se os tempos de enriquecimento estivessem sido cumpridos com exactidão	devendo os tempos de enriquecimento sido cumpridos com exactidão
35	4	Outro aspecto relevante para promover o aparecimento	Outro aspecto relevante para promover o não aparecimento
36	29	...Vibrio parahaemolyticus...	... <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ...
37	1	...Vibrio parahaemolyticus...	... <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ...