



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

Staphylococcus COAGULASE POSITIVA EM CAMARÃO
MARINHO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus Kroyeri*)
COMERCIALIZADO NA FEIRA-LIVRE DE PESCADO DO
MUCURIBE – FORTALEZA – CEARÁ -BRASIL.

ROSA HELENA REBOUÇAS

Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
JUNHO/2005



COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, PhD
Orientador/Presidente

Prof^a. Artamizia Maria Nogueira Montezuma, M.Sc
Membro

Prof, Waleska Ferreira de Albuquerque M.Sc
Membro

VISTO: ✓

Prof. José Wilson Calíope de Freitas, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof^a. Artamizia Maria Nogueira Montezuma, M.Sc
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R242s Rebouças, Rosa Helena.

Staphylococcus coagulase positiva em camarão marinho sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyen*) comercializado na feira-livre de pescadao do Mucuripe — Fortaleza — Ceará - Brasil / Rosa Helena Rebouças. – 2005.

49 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2005.

Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

1. Camarão (Crustáceo) - Criação. 2. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

SONHO REALIZADO

Mais uma etapa vencida
Um sonho realizado
Todos os teus sacrifícios
São hoje recompensados

Cinco anos de estudo
Provas, trabalhos, pesquisas
Cada um forma o degrau
Neste caminho que trilhas

Rosa Helena, teu esforço
Termina hoje em vitória
Deus sempre te acompanhou
Em toda esta trajetória

Parabéns filha querida
Que Deus do Céu te proteja
Seja Ele teu escudo
Em toda e qualquer peleja

Filha, Deus te abençoe
Te acompanhe por toda vida
Rezando por ti está
A tua mamãe querida.

Netinha

À minha mãe (Netinha), razão e motivo da minha vida.

- - Agradeço todo o amor e estudo que me deste,
Que me fizeram ser hoje a pessoa que sou

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Mais uma batalha vencida. Uma conquista que não posso atribuir a ninguém mais do que a Deus. A Ele agradeço em primeiro lugar, por ter me conduzido e fortalecido nestes anos de faculdade.

À pessoa mais importante da minha vida, pelo amor, dedicação e apoio a mim dedicados. MUITO OBRIGADA, MÃEZINHA.

Minha amada "Irmãzinha", que muito me apoiou durante toda minha vida estudantil desde as primeiras séries até aqui. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado.

Ao meu irmão por estar sempre torcendo pela minha felicidade.

Ao meu amigo Pe José Francisco, pessoa que me apóia, orienta e empresta seus ouvidos sempre que preciso.

Foram alguns anos passados, praticamente, morando na universidade. Durante esse tempo muitas pessoas passaram pela minha vida. Algumas pessoas simplesmente passaram.... outras, permaneceram mais tempo e conquistaram minha amizade.

Obrigada as minha amigas Adriana, Rakel, Juliana, Leilane, Keyvila, Maria, pelos muitos momentos de dificuldade em que nos apoiamos uma nas outras e pelos momentos de alegrias onde rimos juntas por diversos motivos.

À Professora Regine, por ter me adotado como mais uma de suas "reginetes" o que permitiu a realização deste trabalho.

Waleska, "minha mãe desnaturada", obrigada pela amizade e atenção que me dedicou durante a realização deste trabalho.



Às minhas colegas de laboratório: Cristiane, Gleire, Susy, Izabel, Anahy, Gardenny, Karla, Janisi, Rakel, Carol, Claudia e Edirsana, quero dizer-lhes obrigada por tornar o laboratório (ambiente de trabalho) uma extensão da nossa casa.

Ao Instituto de Ciências do Mar (Labomar) pelo uso de suas depências.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

Resumo	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão Bibliográfica	2
1.1.2 – Intoxicação Estafilocócica	2
1.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1.4 Prevenção	6
1.1.5 Mecanismos de Patogenicidade	6
1.1.6 Resistência a Antibióticos	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Procedimento das Coletas	9
2.1.2 Diluição das amostras	9
2.1.3 Isolamento e Identificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	10
2.1.4. Prova de Coagulase	10
2.1.5 Prova da Catalase	11
2.1.6 Contagem Padrão em Placas das Amostras de Camarão (CPP)	11
2.1.7 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos	11
2.1.8 Cálculo das contagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4 CONCLUSÕES	29
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXO - Meios de Cultura e Reagentes	35

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi pesquisar *Staphylococcus coagulase* positiva em 40 amostras de camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) inteiro e sem carapaça e cabeça (filé), vendidos em dois boxes (A e B) da Feira do Mucuripe, CE, pesquisar a presença da bactéria nas mãos, cavidades nasal e oral dos manipuladores de ambos os boxes, bem como verificar a susceptibilidade do microrganismo isolado aos antimicrobianos comerciais. Das 10 amostras de camarão inteiro colhidas dos boxes A e B foram confirmadas como *Staphylococcus coagulase* positiva, 30% e 40% respectivamente. Para os camarões sem carapaça e cabeça (filé), foram confirmadas 50 e 30% das amostras dos boxes A e B. Foi constatada através da CPP uma maior contaminação nos filés do box A, do que os do box B, o mesmo não ocorreu nos camarões inteiros. Do manipulador do box A, 68,75% das cepas de *Staphylococcus* foram coagulase positiva, sendo 31,25% das mãos e 37,5% na cavidade nasal. Do manipulador do box B, 100% foram coagulase positiva, sendo 81,25% das mãos e 18,75% da cavidade nasal. Dentre os antibióticos testados, a vancomicina merece destaque, pois 20% das cepas da cavidade nasal do manipulador do box A e 7,69% das cepas da mão do manipulador do box B apresentaram resistência-intermediária a esta droga, usada exclusivamente em ambiente hospitalar. De acordo com a ANVISA (RDC N. 21, 12 de janeiro de 2001) os camarões comercializados na feira livre de pescadao do Mucuripe – CE podem ser classificados como alimento potencialmente causador de intoxicações alimentares.

LISTA DE FIGURAS:

- FIGURA 1 – Representação esquemática de mecanismos utilizados pelas bactérias para evitar a fagocitose. 7
- FIGURA 2 – Fluxograma do processo de antibiograma, a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de camarão e manipuladores dos boxes A e B. 12
- FIGURA 3 – Fluxograma de identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva a partir de amostras de camarão com e sem carapaça e cabeça (filé) comercializados em dois boxes (A e B) da Feira Livre de Pescado do Mucuripe - Fortaleza-CE. 13
- FIGURA 4 – Fluxograma de identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva a partir de amostras de manipuladores de pescado de dois boxes (A e B) da Feira Livre de Pescado do Mucuripe - Fortaleza-CE. 14
- FIGURA 5 – Placa com ágar Baird Parker apresentando colônias típicas de *Staphylococcus* inoculadas a partir de amostras de camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) comercializado nos boxes da Feira Livre de Pescado do Mucuripe em Fortaleza-CE. 14
- FIGURA 6 – Fluxograma de Contagem Padrão em Placas de *Staphylococcus* coagulase positiva a partir de um inóculo puro 15

- FIGURA 7 – Percentual das cepas *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas das mãos, cavidade nasal e oral de manipuladores de dois boxes (A e B) de venda de camarão da Feira do Mucuripe, CE. 21
- FIGURA 8 – Percentual de resistência aos antimicrobianos, das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de camarão com e sem carapaça do box A, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE. 25
- FIGURA 9 – Percentual de resistência aos antimicrobianos, das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de camarão com e sem carapaça do box B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE. 26

LISTA DE TABELAS.

TABELA 1-	Número de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva isolados das amostras de camarão com e sem carapaça e cabeça, do box A	17
TABELA 2-	Número de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g isolados das amostras de camarão com e sem carapaça e cabeça do box B.	19
TABELA 3-	Número de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva isoladas das mãos, cavidade nasal e oral dos manipuladores de dois boxes (A e B) de venda de camarão na Feira Livre de Pescado do	20
TABELA 4 –	Resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) UFC/g das amostras de camarão com carapaça e cabeça coletados dos boxes A e B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.	22
TABELA 5 –	Resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) UFC/g das amostras de camarão sem carapaça e cabeça (filé) coletados dos boxes A e B da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.	23
TABELA 6 –	Perfil de sensibilidade/resistência de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva isoladas de camarão, com e sem carapaça e cabeça, do box A., da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.	24

LISTA DE TABELAS.

TABELA 1-	Número de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva isolados das amostras de camarão com e sem carapaça e cabeça, do box A	17
TABELA 2-	Número de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g isolados das amostras de camarão com e sem carapaça e cabeça do box B.	19
TABELA 3-	Número de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva isoladas das mãos, cavidade nasal e oral dos manipuladores de dois boxes (A e B) de venda de camarão na Feira Livre de Pescado do	20
TABELA 4 –	Resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) UFC/g das amostras de camarão com carapaça e cabeça coletados dos boxes A e B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.	22
TABELA 5 –	Resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) UFC/g das amostras de camarão sem carapaça e cabeça (filé) coletados dos boxes A e B da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.	23
TABELA 6 –	Perfil de sensibilidade/resistência de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva isoladas de camarão, com e sem carapaça e cabeça, do box A., da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.	24

- TABELA 7 – Perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de camarão, com e sem carapaça e cabeça, do box B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE. 25
- TABELA 8 – Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, de acordo com o sítio de coleta do manipulador dos boxes A e B, da Feira de Pescado do Mucuripe. CE. 28

LISTA DE ANEXOS

Anexo – Meios de Cultura e Reagentes

35

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM CAMARÃO
MARINHO SETE-BARBAS (*Xiphopenaeus kroyeri*)
COMERCIALIZADO NA FEIRA-LIVRE DE PESCADO DO
MUCURIBE – FORTALEZA – CEARÁ -BRASIL**

Rosa Helena Rebouças

1 INTRODUÇÃO

O pescado é um alimento de excelente valor nutritivo, devido as suas proteínas de alto valor biológico, vitaminas e ácidos graxos insaturados. Entretanto é bastante perecível, necessitando de condições sanitárias adequadas desde a captura até a manipulação e comercialização a fim de chegar ao consumidor como um produto seguro e de boa qualidade microbiológica (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO, 1993).

O camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) mostra uma ampla distribuição geográfica, no Atlântico Oeste, sendo uma espécie de grande importância para a pesca no Brasil (VALENTINI et al., 1991).

O elevado consumo de camarões nos mercados interno e externo e a importância econômica desse pescado para o Estado do Ceará tornam importante a pesquisa e monitoramento de problemas que possam pôr em risco a qualidade do produto e a saúde do consumidor (SANTOS et al., 2002).

Dentre os alimentos de origem animal aquática, os camarões são os mais susceptíveis a sofrer alterações oxidativas, hidrolíticas e/ou microbiológicas devido a sua elevada atividade de água (aw), composição química, alto teor de gordura insaturada e pH próximo a neutralidade (LANCETTE; BENNETT, 2001).

O pescado pode ser veiculador de uma gama enorme de microrganismos patogênicos para o homem, a maior parte deles fruto da contaminação ambiental e das condições higiênicas de manipulação. O lançamento dos esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e no próprio mar é a causa poluidora mais comum registrada no mundo inteiro (CONSTANTINIDO, 1994). No caso particular da pesca marítima, a captura em águas costeiras oferece maiores riscos do que a realizada em alto mar. A água de alto mar contém quantidades muito pequenas de bactérias por cm³, ao

passo que as águas de regiões costeiras e os sedimentos podem estar bastante contaminados, alcançando cifras de até 10^6 UFC/cm³. (LIMA, 1997; SIKORSKI et al., 1990).

A falta de higienização por parte dos manipuladores, na comercialização do pescado, cria uma oportunidade de contaminação daquele alimento (VIEIRA et al., 1998).

As pessoas envolvidas na produção de alimentos podem ser portadoras assintomáticas de várias doenças e posteriormente vir a contaminar os alimentos provocando surtos de origem alimentar. (OLIVEIRA et al., 2003).

Em particular, os manipuladores representam um importante papel quanto à segurança alimentar e transmissão de toxinas através de alimentos, uma vez que neles são introduzidos patógenos durante sua produção, processamento, distribuição e preparação (ANGELILLO et al., 2000). Sendo, os manipuladores de alimentos, portadores de agentes microbianos, transferem patógenos para o pescado; onde encontram um meio propício para o seu desenvolvimento, notadamente quando as etapas subseqüentes apresentam deficiências tecnológicas (GERMANO, et al., 1993).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 60% das doenças de origem alimentar são decorrentes de técnicas inadequadas de processamento, envolvendo microrganismos e parasitas patogênicos, além de seus produtos tóxicos (SIMÕES et al. 1999).

O Objetivo do presente trabalho foi pesquisar a presença de *Staphylococcus coagulase positiva* em camarão marinho sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) comercializado na feira livre de pescado do Mucuripe-Fortaleza, CE, pesquisar a bactéria nas mãos, cavidades nasal e oral dos seus manipuladores na feira além de proceder o antibiograma das cepas isoladas e identificadas como *Staphylococcus coagulase positivas* a fim de se verificar o grau de susceptibilidade do microrganismo aos antimicrobianos comerciais.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.2 Intoxicação Estafilocócica

A intoxicação estafilocócica é uma enfermidade transmitida por alimentos quando da contaminação destes com espécies de *Staphylococcus* capazes de produzirem enterotoxinas. Dentre os alimentos freqüentemente

associados a este tipo de intoxicação incluem o leite e seus derivados, saladas e produtos cárneos (BERGDOLL, 1992).

A intoxicação estafilocócica não é notificada em diversos países entre eles o Brasil, mas cerca de 40% dos surtos ocorridos no período entre 1994 a 1998, *S. aureus* estava envolvido (QUEIROZ, et al., 2000) Entre os anos de 1983 e 1997, nos Estados Unidos, ocorreram 189.930 casos de intoxicação alimentar por *S. aureus* e 487 casos notificados como surtos, ocasionando 180 hospitalizações e 2 mortes (MEAD, et al., 2000).

Segundo Carmo (2002), entre 1995 e 2001, 18.820 pessoas foram intoxicadas e 17 morreram em Minas Gerais depois de ingerirem alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas.

1.1.3 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae* e por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cacho de uva. São facultativas anaeróbias, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, produzem catalase (FRANCO; LANDGRAF, 1996), sendo que algumas espécies são associadas freqüentemente a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunistas, em seres humanos e animais (MARTINS, 1999). As espécies que se destacam como patógenos potenciais são *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp *coagulans* e várias espécies de *S. hyicus*, sendo o *S. aureus* o mais importante deles (KLOOS; BANNERMAN, 1999). Para a maioria dos laboratórios clínicos, os isolados de fontes humanas sendo coagulase positivos são sempre considerados *S. aureus* (LARSEN; MAHON, 1995).

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos humanos e de outros mamíferos e são divididos em dois grupos com base na sua habilidade de coagular o plasma (reação de coagulase), importante propriedade marcadora da patogenicidade (SILVA, 1999).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μm , imóveis e não formadoras de esporos. Quando visualizadas em microscópio, aparecem em forma de cacho de uva, por se dividirem em planos diferentes; entretanto, dependendo da idade da

colônia, podem ser encontradas isoladas, aos pares, agrupadas em tétrede ou, ainda, em pequenas cadeias (SNEATH et al. 1986; SILVA, 1997; KLOOS; BANNERMAN, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

São produtores de enterotoxina e têm um comportamento mesófilo, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 a 48,7°C, com ótimo na faixa de 30 a 37°C. As enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46°C, com ótimo entre 40 e 45°C (FRANCO ; LANDGRAF,1996).

A presença do *S. aureus* nos alimentos é relativamente freqüente, particularmente naqueles submetidos a manuseio intenso, refrigeração inadequada e condições precárias de higiene (ROITMAM, 1988), entretanto o *S. aureus* é bastante vulnerável à destruição através de tratamento térmico e/ou a maioria dos agentes de limpeza. Já as enterotoxinas são bastante termoestáveis, não sendo eliminadas pela ebulição antes de 30 minutos e resistentes ainda a ação de enzimas proteolíticas gastrointestinais, tomando-se por exemplo a pepsina (BENNET,1984).

Ao contrário de outras bactérias potencialmente patogênicas, o *S. aureus* destaca-se como a mais tolerante ao sal, suportando concentrações que variam de 10 a 20% de NaCl e nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas. Os estafilococos têm a capacidade de crescer em valores inferiores aos considerados mínimos para as bactérias não-halofílicas. O valor mínimo da Aa tolerável pela bactéria é de 0,83, enquanto em condições ideais é de 0,86 (FRANCO; LANDGRAF, 1996). O pH ótimo de desenvolvimento do *S. aureus* está na faixa de 6,0 - 7,0 embora o intervalo para a produção de enterotoxina seja mais restrito, ficando entre 4,5 e 9,8 (LEITÃO, 1988).

As enterotoxinas estafilocócicas (Staphylococcal Enterotoxins - SE) são caracterizadas com base nas suas reações imunológicas. Já foram identificadas as toxinas tipo A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, e H (SOARES et al., 1997). São proteínas simples, com peso molecular oscilando entre 26.000 e 30.000 daltons e ponto isoelétrico variando entre 7,0 e 8,6. (FRAZIER, 1993; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

S. aureus são largamente disseminados no ambiente, sendo o homem e outros animais seu principal reservatório. A cavidade nasal é o principal *habitat* dos estafilococos no homem e a partir deste foco, atingem tanto a epiderme e

feridas como o ar, água, solo e qualquer tipo de objeto que tenha entrado em contato com o homem (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Os estafilococos também estão presentes na garganta, faringe, glândulas mamárias, trato intestinal, urinário, cabelo e pele em mais de 50% da população humana (ROITMAN, 1988). Embora encontrado com relativa frequência como membro da microbiota normal do corpo humano, o *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade. (TRABULSI; et al., 2004)

O processo patológico provocado por esta bactéria é tipicamente o de uma intoxicação, ocorrendo apenas quando há uma intensa proliferação da bactéria no alimento, no qual, sob condições ideais sintetiza toxinas (FRAZIER, 1993). O período de incubação é curto, variando de 2 a 4 horas e a sintomatologia, após a ingestão do alimento contaminado, varia com o grau de susceptibilidade do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade consumida do mesmo. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais, embora em alguns casos possam ocorrer sudorese, cianose, salivação intensa e desidratação. Os sintomas usualmente não persistem mais que 48 horas e a intoxicação raramente é fatal a menos que o indivíduo esteja debilitado (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Staphylococcus aureus é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade da maioria de suas cepas de produzir enterotoxinas. Em função do risco à saúde pública que sua presença representa em alimentos, estabeleceu-se, em diversos países, a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais (SILVA; GRANDA, 2004).

Pesquisadores calculam que aproximadamente 100 milhões de indivíduos, em todos os países industrializados, contraem doenças (infecções e intoxicações) decorrentes de alimentos, através do consumo de refeições e água contaminadas (GERMANO; GERMANO, 2001).

1.1.4 Prevenção

A prevenção da intoxicação em alimentos pode ser alcançada pelo controle da sua contaminação, mediante práticas adequadas de higiene e saneamento, principalmente no que diz respeito à manipulação dos produtos. Além disso, através da refrigeração adequada dos alimentos susceptíveis à contaminação e proliferação de *S. aureus*, consegue-se manter as populações de bactérias em níveis reduzidos, minimizando o risco de intoxicações. Os alimentos não devem permanecer por várias horas à temperatura ambiente. Finalmente, pelo aquecimento dos alimentos, a bactéria é facilmente destruída, embora a enterotoxina, porventura presente, não seja sensivelmente afetada em temperaturas abaixo de 100°C (ROITMAN, 1988).

1.1.5 Mecanismos de Patogenicidade

A bactéria *S. aureus* é um microrganismo muito conhecido por sua patogenicidade ao homem e outros animais, responsável por uma grande produção de enterotoxinas e, portanto, agente causador de graves intoxicações, quer seja de origem alimentar ou não (VIEIRA et al., 2004).

À maioria tem-se atribuído participação na patogênese das infecções causadas por esse microorganismo. A mais conhecida é a coagulase, em virtude de ser a enzima cuja presença caracteriza a espécie. A coagulação é decorrente da transformação da protombina em trombina, que por sua vez, ativa a formação de fibrina, a partir do fibrinogênio (TRABULSI et al., 2004).

Outra enzima produzida por determinadas espécies de estafilococos, e que está relacionada como fator de virulência é a catalase, que atua inativando peróxido de hidrógeno e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus* (SILVA; GANDRA, 2004).

As toxinas estafilocócicas teriam a capacidade de estimular a proliferação de células T do sistema imunológico, o que nos levaria a considerá-las como superantígenos. Quando estas toxinas alcançam a corrente sanguínea, devido a seus efeitos sobre os macrófagos e células T, elas desencadeiam a produção e liberação de citocinas, tais como a interleucina-2

(IL2), que, por sua vez, vai estimular a produção de TNF- α e de outras citocinas por outros tipos de células. A produção dessas substâncias em cadeias levam invariavelmente às manifestações clínicas observadas nos pacientes infectados por bactérias produtoras de superantígenos ou que ingeriram enterotoxinas estafilocócicas (LANDGRAF, 1996; PIAZZA et al. 2004).

Algumas cepas de *S. aureus* possuem cápsulas, geralmente de natureza polissacarídica, sendo as que apresentam cápsulas as mais resistentes à fagocitose do que as não capsuladas. A proteína-A é encontrada na maioria das amostras de *S. aureus*, e apresenta a propriedade de se ligar a porção Fc da IgG, impedindo a opsonização e dificultando a fagocitose, sendo importante componente da parede celular do *S. aureus*, atuando na aderência às superfícies mucosas (MARTINS, 1999). Desta forma, a proteína A, assim como a cápsula, protege o *S. aureus* contra a fagocitose (TRABULSI et al., 2004).

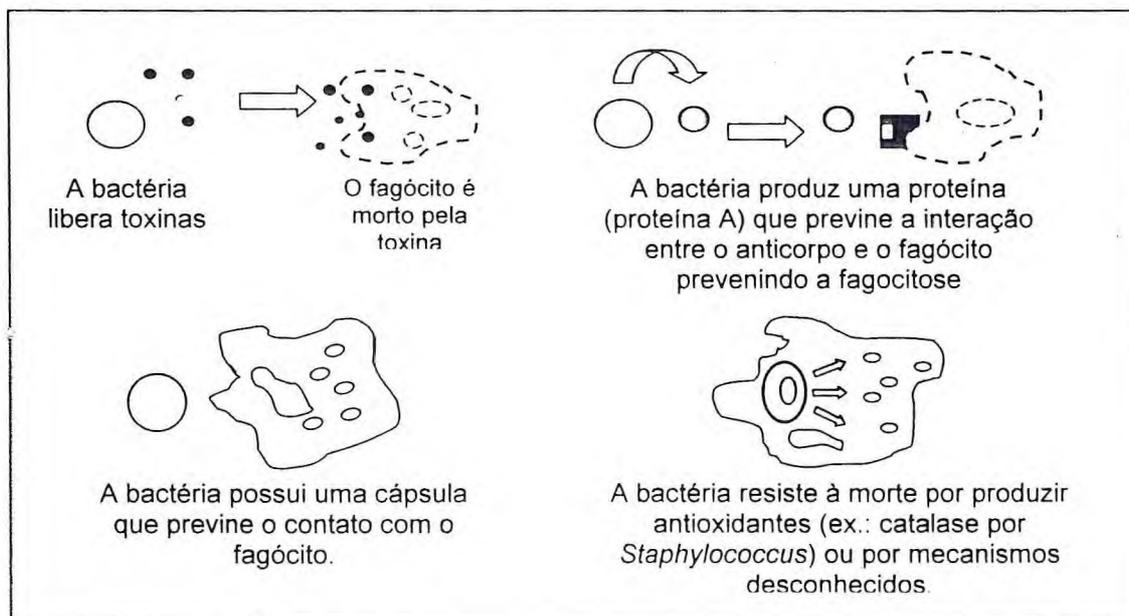


FIGURA 1 – Representação esquemática de mecanismos utilizados pelas bactérias para evitar a fagocitose (TRABULSI, 2004).

1.1.6 Resistência a Antibióticos

A tolerância aos antimicrobianos é definida como a capacidade de a bactéria mostrar-se sensível à concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico, porém apresenta-se com maior capacidade de sobreviver na

presença da droga, ou seja, não sofre a ação da concentração bactericida mínima (CBM) habitual (OLIVEIRA, et al., 2001).

O advento do uso clínico de sulfonamidas em 1933, e em seguida da penicilina, em 1941, levou à constatação de que a resistência bacteriana aos agentes microbianos podia ser uma característica natural das espécies de bactérias ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível. Alguns *S. aureus* isolados de material clínico mostravam-se resistentes à penicilina devido à produção de penicilase (TAVARES, 2000).

Na utilização de um antibiótico frente a um determinado microrganismo, torna-se necessário o conhecimento da sensibilidade deste germe. É principalmente para as bactérias que apresentam grande variabilidade e resistência que está indicada a determinação *in vitro* da sensibilidade aos antibióticos, conseguida por meio de antibiogramas (TAVARES, 2001).

O aparecimento de bactérias resistentes à ação de agentes químicos usados na sanitização dos equipamentos e utensílios das indústrias é um fator preocupante para a indústria de alimentos. Por isso várias pesquisas vem sendo realizadas no sentido de determinar os mecanismos que propiciam resistência e a utilização de práticas para contornar esse problema. Recentemente tem-se reportado o isolamento de amostras de *Staphylococcus aureus* com resistência cruzada à vancomicina (SANTOS, et al.2002, TAVARES, 2001).

O uso da vancomicina é indicado para o tratamento de infecções estafilocócicas graves em pacientes com alergia a penicilina e infecções causadas por estafilococos resistentes a meticilina e a oxacilina. Recentemente tem-se reportado o isolamento de amostras de *Staphylococcus aureus* com resistência cruzada à vancomicina (TAVARES, 2001).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimento das Coletas

✓ Camarão

As amostras analisadas foram provenientes de dois boxes da feira livre de pescado do Mucuripe em Fortaleza-Ce que comercializam camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), com carapaça e cabeça (inteiro) e sem carapaça e cabeça (descabeçado). As amostras foram coletadas semanalmente, no final da manhã nos meses de outubro de 2004 a abril de 2005, durante 10 semanas, perfazendo um total de 40 amostras, sendo 20 de cada box (10 com e 10 sem carapaça e cabeça).

Os boxes foram escolhidos por sorteio e aqueles que comercializavam apenas o camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), foram incluídos.

✓ Manipuladores

Foi selecionado um manipulador de camarão de cada box, sendo coletado material das suas cavidades nasal e oral, e das mãos. As amostras analisadas foram coletadas uma única vez.

Com o auxílio de uma zaragatoa, umedecida em 10 mL de Caldo BHI, foi colhido o material da cavidade nasal de ambas as narinas dos manipuladores, após serem tocadas com movimentos leves e rotatórios. Para amostras da cavidade oral foram feitas fricções, com movimentos rotatórios, sobre a língua, com uma terceira zaragatoa. O material das mãos foi colhido friccionando-se uma outra zaragatoa nos espaços interdigitais, unhas, palma e dorso. (CARVALHO; SERAFINI, 1996).

Todas as amostras foram transportadas ao laboratório em caixa isotérmica, onde foram realizadas as análises microbiológicas, em um tempo não superior a uma hora.

2.1.2 Diluição das amostras

✓ Camarão

Em condições assépticas foram pesadas 50 g das amostras, em seguida procedeu-se a maceração em cadinho desinfetado. Logo após as

amostras foram homogeneizadas em 450 mL de Água Peptonada (AP) 0,1%. Esta preparação correspondia à diluição de 10^{-1} . A partir desta foram preparadas às demais diluições (10^{-2} a 10^{-4}) com AP 0,1% (BENNETT, 2001).

✓ Manipuladores

A partir dos tubos de Caldo BHI contendo as zaragatoas (10^0) com material coletado das mãos, cavidade oral e nasal, conforme descrito no item 2.1, foram realizadas diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-3} em AP 0,1%. Em seguida, o material foi semear^o em ABP para isolamento de *S. aureus*.

2.1.3 Isolamento e Identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva

De cada diluição das amostras foram tomados alíquotas de 0,1 mL e pelo método de espalhamento, usando-se alça de Drigalski, foram distribuídos na superfície do meio Agar Baird-Parker (ABP). As placas foram então incubadas invertidas em estufa, onde permaneceram a 35°C/48h (BENNETT, 2001).

Decorrido o tempo de incubação, foram contadas as colônias crescidas nas placas e delas isoladas 2 a 3 típicas (negras, pequenas com halo claro de 2 a 5 mm de largura). As colônias foram então transferidas para Caldo BHI e incubadas em estufa por 35°C/24h.

As colônias crescidas em Caldo BHI foram repicadas em tubos com Ágar Triptona Soja-Difco (TSA) inclinado e incubados por 35°C/24h. Após esse período, os tubos foram conservados a 23°C, em estufa B.O.D (modelo 347 Fanem, Brasil) até as cepas, já purificadas, serem submetidas à prova bioquímica de coagulase.

2.1.4 Prova de Coagulase

De uma cultura de 24h em caldo BHI tomou-se uma alíquota de 0,25 mL que foi adicionada em 0,5 mL de plasma citrato estéril de coelho liofilizado, diluído conforme especificação do fabricante. Os tubos foram incubados a 35°C, e as leituras foram realizadas a cada sessenta minutos, até completar um período de inoculação de seis horas. A prova foi considerada positiva quando houvesse coagulação do plasma em qualquer grau.

2.1.5 Prova da Catalase

A partir da cultura de *Staphylococcus* coagulase positiva crescida em Caldo BHI a 35°C/24h, adicionava-se 1 mL de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 3%. A leitura era realizada de imediato, sendo a produção de bolhas a positividade do teste.

2.1.6 Contagem Padrão em Placas das Amostras de Camarão (CPP)

Foram realizados testes de contagem padrão em placas (CPP) das amostras de camarão com e sem carapaça e cabeça (filé) oriundas de todas as coletas de ambos os boxes.

A partir do homogenato do camarão, diluição 10⁻¹, procedeu-se as demais diluições decimais até 10⁻⁴ em AP 0,1%. Em seguida, foram colocadas porções de 0,1 mL, de todas as diluições, em placas de Petri e o inóculo foi coberto com cerca de 15 mL de Ágar Plate Count -Difco (PCA) previamente fundido e resfriado. Uma homogeneização foi feita através de movimentos circulares das placas sobre a bancada. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas, em estufa a 35°C/48h. Decorrido esse tempo escolheram-se para serem contadas, as placas que apresentavam um número de colônias entre 25 e 250. Multiplicava-se esse número pelo inverso do fator de diluição correspondente, a fim de se obter o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por g da amostra.

2.1.7 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

Culturas de *Staphylococcus* coagulase positiva, já identificadas, crescidas em TSA inclinado a 35°C/24h, foram selecionadas e emulsionadas em solução salina estéril 0,85% até se obter uma turvação equivalente à turbidez do tubo 0,5 na escala de McFarland. Destes tubos turvos foram semeadas placas contendo Ágar Mueller-Hinton-Difco (MH), com o auxílio de uma zaragatoa estéril umedecida, removendo-se o excesso nas paredes do tubo. Em seguida os discos de antimicrobianos foram depositados, com o auxílio de uma pinça estéril na superfície do ágar. As placas foram então incubadas em estufa por 35°C/24h e logo após esse período, foram realizadas as medições dos halos utilizando-se um paquímetro (KOLETAR, 1995).

Para os testes de sensibilidade foram utilizados os seguintes antibióticos: ampicilina 10 μ g (AMP), cefalotina 30 μ g (CFL), cloranfenicol 30 μ g (CLO), eritromicina 15 μ g (ERI), oxacilina 1 μ g (OXA), sulfazotrim 25 μ g (SFT) e vancomicina 30 μ g (VAN). (PEREIRA et al., 1999).

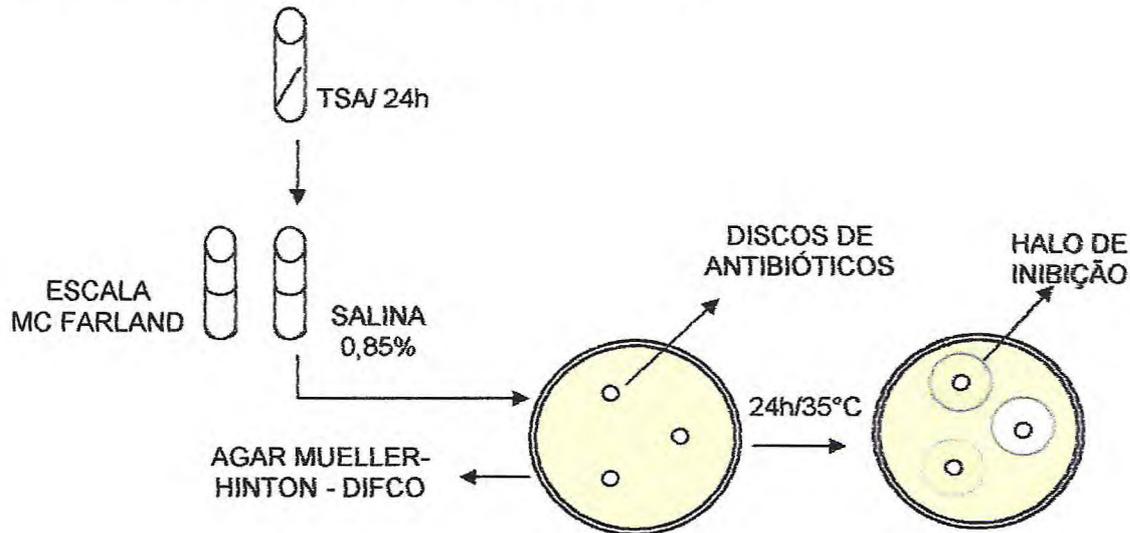


FIGURA 2 – Fluxograma do processo de antibiograma, a partir de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de camarão e manipuladores dos boxes A e B.

2.1.8 Cálculo das contagens de *Staphylococcus coagulase positiva*

A partir do número de colônias típicas contadas, das diluições inoculadas e da percentagem de colônias confirmadas, procederam-se os cálculos da seguinte maneira: multiplicou-se o número de colônias típicas apresentadas na placa, pelo inverso da diluição, pelo percentual das cepas confirmadas e pela quantidade do inóculo (SILVA; et al., 1997).

Ex: Colônias típicas = 30

Diluição = 10^{-2}

Col. Submetidas à confirmação = 5

Col. Confirmadas = 3 (60%)

Inóculo = 0,1 mL

$UFC/g = 30 \times 100 \times 0,6 \times 0,1 \Rightarrow 180 \Rightarrow 1,8 \times 10^2 UFC$ em 0,1mL do inóculo.

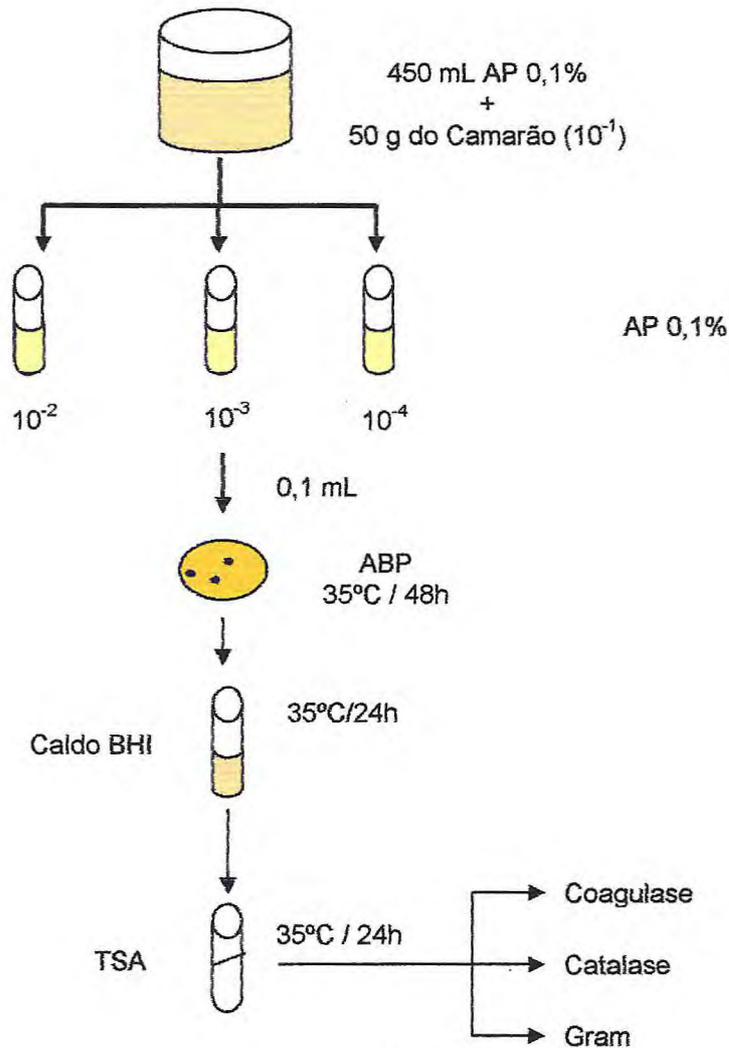


FIGURA 3 – Fluxograma de identificação de *Staphylococcus coagulase* positiva a partir de amostras de camarão com e sem carapaça e cabeça (filé) comercializados em dois boxes (A e B) da Feira Livre de Pescado do Mucuripe - Fortaleza-CE.

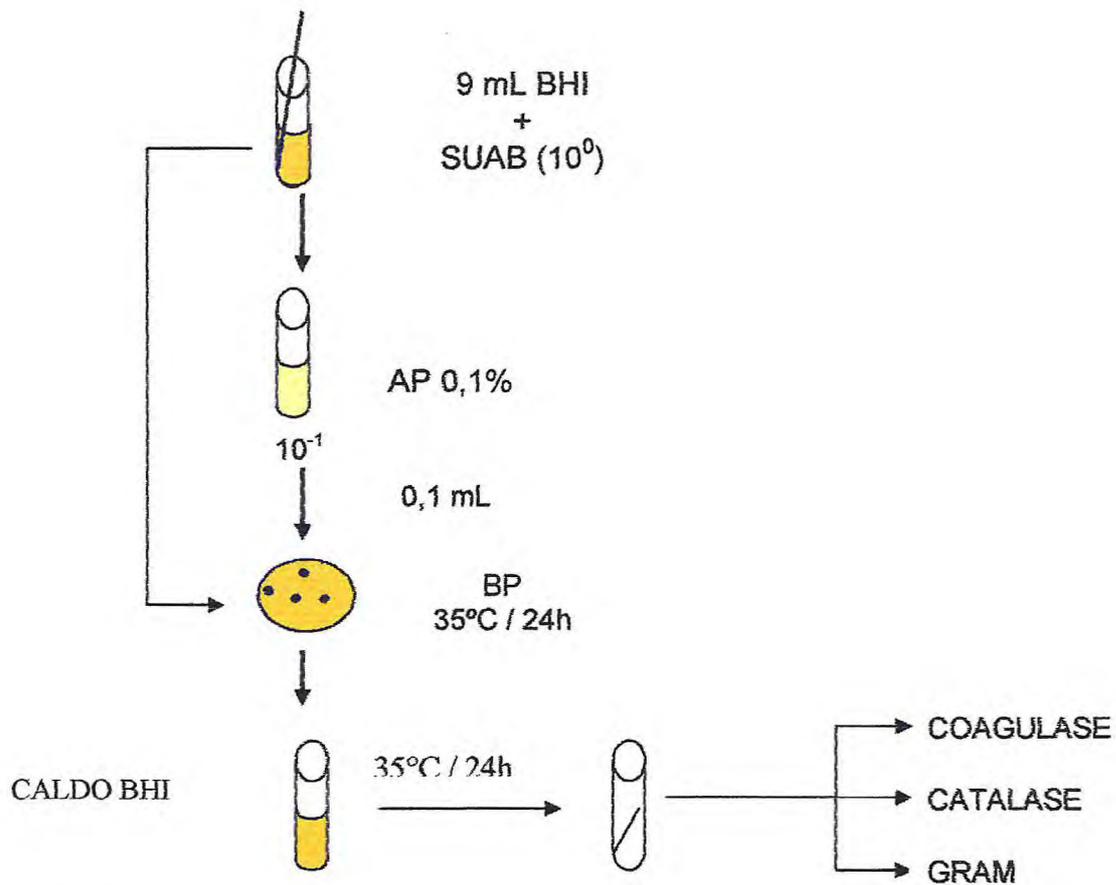


FIGURA 4 – Fluxograma de identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva a partir de amostras coletadas de manipuladores de pescado dos dois boxes A e B.



FIGURA 5 – Placa com ágar Baird Parker apresentando colônias típicas de *Staphylococcus* inoculadas a partir de amostras de camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) comercializado nos boxes A e B.

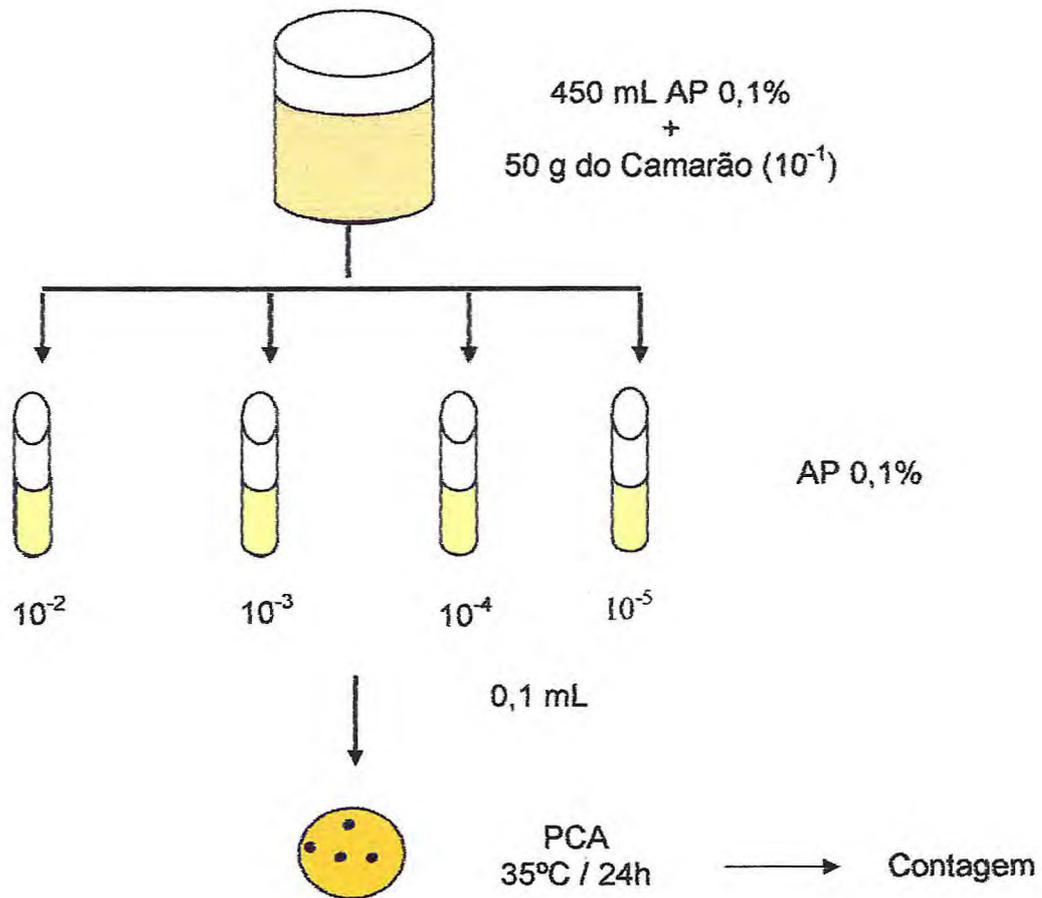


FIGURA 6 – Fluxograma de Contagem Padrão em Placas de *Staphylococcus* coagulase positiva a partir de um inóculo puro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os manipuladores de alimento têm um papel importante na prevenção das toxinfecções alimentares. As palavras "higiene alimentar" estão geralmente associadas à higiene pessoal, geralmente limitada aos cuidados com as mãos. As mãos raramente estão livres de bactérias. A flora comensal das mãos geralmente consiste de estafilococos (HOBBS; ROBERTS, 1999).

As TABELAS 1, 2, 3 e 4 mostram as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva para camarão inteiro e sem carapaça e cabeça, provenientes de dois boxes de comercialização de pescado, e que apresentaram valores acima do permitido pela legislação da ANVISA.

A resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, estipula um limite máximo para presença de Estafilococos coagulase positiva em camarão fresco que não será consumido cru, de até 10^3 UFC/g. Segundo esta Resolução a enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. A mudança no conceito de associar intoxicação estafilocócica apenas a *S. aureus*, começou com a descoberta de que outras espécies também apresentam a capacidade de produzir enterotoxinas (KLOSS; BANNERMAN, 1999). Além disso as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* produzem coagulase e termonuclease, apresentando características morfológicas muito semelhantes, quando semeados em meios seletivos e diferenciais (SILVA; GANDRA, 2004). Dentre as espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva pode-se encontrar *S. intermedius*, *S. delphini* e algumas cepas de *S. hyicus* e *S. schleiferi*. Com exceção de *S. aureus* essas espécies são todas isoladas de animais e raramente de amostras humanas. Conseqüentemente, para a maioria dos laboratórios clínicos os isolados de fontes humanas e coagulase positivos são sempre considerados *S. aureus* (LARSEN; MAHON, 1995).

Na TABELA 1 observa-se que em 3 (30%) das 10 amostras de camarão inteiro, coletadas do Box A foram confirmadas a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva com contagens que variaram entre 2×10^2 UFC/g a 1×10^4 UFC/g. Das amostras de camarão sem carapaça e cabeça (filé) oriundas do mesmo Box, 5 (50%) das amostras foram confirmadas a presença da bactéria, e suas contagens apresentaram variação de $2,4 \times 10^3$ a 1×10^5 UFC/g.

TABELA 1- Número de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados das amostras de camarão inteiro e sem carapaça e cabeça, do Box A

BOX A			
(Camarão inteiro)			
Nº de Coletas	Cepas isoladas	Cepas Confirmadas (%)	UFC <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g
1 ^a	2	50	2X10 ²
2 ^a	3	33,30	3 X10 ³
3 ^a	2	50	1X10 ⁴
BOX A			
(Camarão sem carapaça e cabeça - Filé)			
Nº de Coletas	Cepas isoladas	Cepas Confirmadas (%)	UFC <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g
1 ^a	2	100	2,4X10 ³
2 ^a	2	100	2,4X10 ³
3 ^a	2	50	4,5X10 ³
4 ^a	1	100	2X10 ⁴
5 ^a	1	100	1X10 ⁵

A TABELA 2 mostra que em 4 (40%) das 10 amostras de camarão com carapaça e cabeça coletados do Box B foram confirmadas a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, com contagens que variaram de 3x10² UFC/g a 1x10⁵ UFC/g. Em 3 (30%) das amostras de camarão sem carapaça e cabeça (filé), oriundas do mesmo Box, foram confirmadas a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, com contagens variando de 4x10² a 3x10⁴ UFC/g.

Resultados semelhantes foram encontrados por Anand et al. (2002) ao analisarem a qualidade bacteriológica de alimentos de origem marinha em Tamil Nadu, Índia, encontraram contagens de *S. aureus* em camarões marinhos variando entre 0 e 10⁶ UFC/g.

Contrariando os resultados desta pesquisa, Albuquerque (2004) pesquisando a presença de *S. aureus* em camarão marinho comercializados na feira livre de pescadao do Mucuripe, Fortaleza, Ceará, não encontrou em nenhuma das 80 amostras analisadas contaminação por *S. aureus*. No entanto,

os testes aplicados pela autora foram específicos para *S.aureus* o que não aconteceu nessa pesquisa. O objetivo do presente trabalho foi seguir a legislação vigente, que exige a contagem de estafilococos coagulase positiva e não especificamente *S.aureus*, então, o número de células encontradas poderia pertencer a qualquer outra espécie que apresentasse essa propriedade (coagular plasma de coelho), já citadas anteriormente. Outrossim, tendo em vista que a bactéria foi primeiramente enumerada em camarão não se pode afirmar, a não ser com outros testes, que seja *S.aureus*.

Vieira et al. (1998) quantificando *S. aureus* em 30 amostras de camarão fresco, oriundas da feira livre de pescado do Mucuripe, Fortaleza, Ceará, verificaram que 10% (3 amostras) estavam contaminadas com o referido microrganismo.

Segundo Baird-Parker (1990), a intoxicação normalmente ocorre quando há uma intensa proliferação do microrganismo no alimento, com valores superiores a 10^5 UFC/g, fornecendo condições para a formação de toxinas.

TABELA 2- Número de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva*/g isolados das amostras de camarão inteiro e sem carapaça e cabeça do Box B.

BOX B (Camarão inteiro)			
Nº de Coletas	Cepas isoladas	Cepas Confirmadas (%)	UFC <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g
1 ^a	2	100	3X10 ²
2 ^a	2	50	8X10 ²
3 ^a	3	33,30	1,5X10 ³
4 ^a	1	100	1X10 ⁵
BOX B (Camarão sem carapaça e cabeça - Filé)			
Nº de Coletas	Cepas isoladas	Cepas Confirmadas (%)	UFC <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g
1 ^a	2	100	4X10 ²
2 ^a	1	100	1,3X10 ³
3 ^a	1	100	3X10 ⁴

As amostras coletadas dos manipuladores dos Boxes de comercialização de pescado A e B estão representadas na TABELA 3. Nela observamos que, das amostras coletadas do manipulador do Box A, 11 (68,75%) cepas isoladas de *Staphylococcus* foram coagulase positiva, sendo 5 (31,25) encontradas nas mãos e 6 (37,5%) na cavidade nasal. Da mesma maneira, para o manipulador do Box B, 16 (100%) cepas isoladas foram coagulase positiva, sendo 13 (81,25%) provenientes das mãos e 3 (18,75%) da cavidade nasal. Em função dessas cepas de *Staphylococcus* coagularem o plasma de coelho e terem sido isoladas do homem (LARSEN; MAHON, 1995), subteende-se que elas são *S. aureus*.

A não confirmação da presença de estafilococos coagulase positiva provenientes da garganta dos manipuladores, talvez, seja devido ao fato de que a coleta não pôde ser realizada de forma correta. Albuquerque (2004) conseguiu identificar *S. aureus* na garganta, mãos e cavidade nasal de dois manipuladores de pescado da mesma feira livre.

TABELA 3- Número de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas das mãos, cavidade nasal e oral dos manipuladores dos Boxes (A e B) de venda de camarão na Feira Livre de Pescado do Mucuripe em Fortaleza - CE.

BOX A			
Origem das Amostras	Nº de Amostras	Cepas Isoladas	Cepas Confirmadas (%)
Mãos	1	5	31,25
Cavidade Nasal	1	6	37,5
Cavidade Oral	1	5	0
TOTAL	3	16	68,75
BOX B			
Origem das Amostras	Nº de Amostras	Cepas Isoladas	Cepas Confirmadas (%)
Mãos	1	13	81,25
Cavidade Nasal	1	3	18,75
Cavidade Oral	1	0	0
TOTAL	3	16	100

A FIGURA 7 mostra um gráfico, onde se observa que todas as cepas de *Staphylococcus*, coletadas das mãos dos manipuladores dos Boxes A e B, foram coagulase positiva.

Segundo Almeida (1995), a presença de organismos patogênicos nas mãos representa grande importância epidemiológica, devido à possibilidade de transferência dos mesmos ao alimento.

Da amostra coletada da cavidade nasal do manipulador do Box A, em 100% das cepas foram confirmadas *Staphylococcus* coagulase positiva, enquanto a amostra da cavidade nasal do manipulador do Box B em apenas 33,30% das cepas isoladas foram confirmadas a presença da bactéria. O mesmo resultado foi obtido por Albuquerque (2004) ao obter 83,3% e 33,30% de confirmação de *S. aureus* da cavidade nasal de dois manipuladores de pescado da feira livre do Mucuripe.

A portaria SVS/MS de número 236, 30 de julho de 1997, da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA, 1997) recomenda no Anexo 1, item 7 sobre a higiene pessoal e requisito sanitário, que "toda pessoa

que trabalhe numa área de manipulação de alimentos deve, enquanto em serviço, lavar as mãos de maneira freqüente e cuidadosa com um agente de limpeza autorizado e com água corrente potável fria ou fria e quente." Ainda na mesma portaria recomenda que "a constatação ou suspeita de que o manipulador apresenta alguma enfermidade ou problema de saúde que possa resultar na transmissão de perigos aos alimentos ou mesmo que sejam portadores ou são, deve impedi-lo de entrar em qualquer área de manipulação ou operação com alimentos se existir a probabilidade da contaminação destes."

Das amostras coletadas da cavidade oral de ambos manipuladores, nenhuma das cepas foram confirmadas como *Staphylococcus coagulase positiva*.

Segundo Vieira (2004) não se deve criar problemas de ordem social ao se despedir um manipulador em virtude de ser um carreador de bactérias. Ele deve ser orientado a não lidar com alimentos, mas se o fizer, deve ser com o maior critério e sob excelentes condições de higiene.

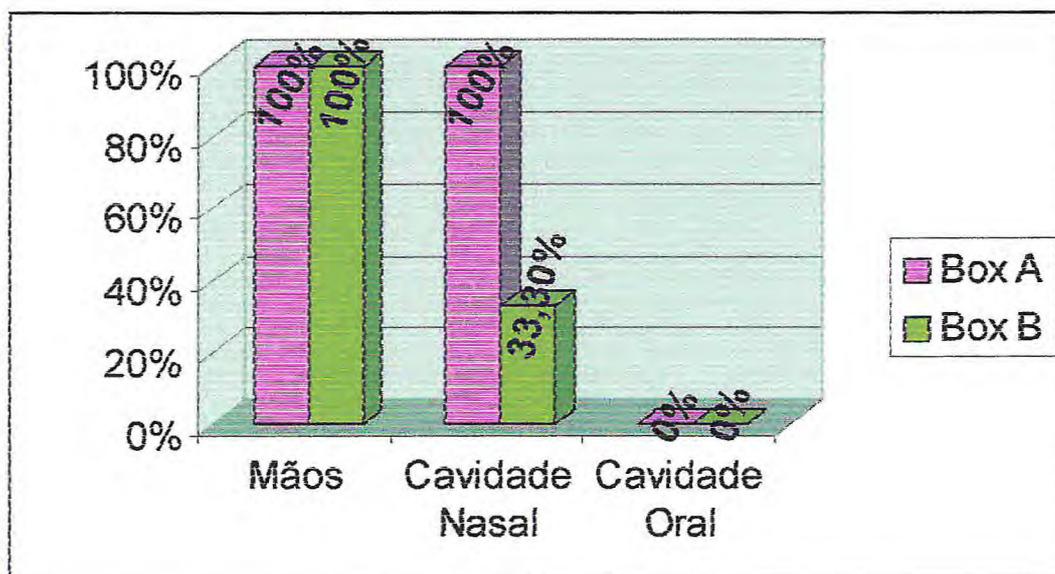


FIGURA 7 - Percentual das cepas *Staphylococcus coagulase positiva*, isoladas das mãos, cavidade nasal e oral de manipuladores de dois Boxes (A e B) de venda de camarão da Feira do Mucuripe, CE.

O método da Contagem Padrão em Placas (CPP) foi realizado a fim de se estimar o número de células viáveis das amostras de camarão marinho.

A Contagem Padrão em Placas (CPP) é uma metodologia muito usada, embora não conste mais na legislação brasileira para pescado já que muitas vezes um número grande de microrganismos não significa, necessariamente, um pescado inaceitável para o consumo e vice-versa (VIEIRA; TÔRRES, 2004).

A TABELA 4 mostra os resultados obtidos nas contagens padrão em placas para as amostras de camarão, com carapaça e cabeça, dos Boxes A e B.

A TABELA 5 mostra os resultados obtidos nas contagens padrão em placas para as amostras de camarão, sem carapaça e cabeça, dos Boxes A e B.

A alta carga bacteriana em alimentos perecíveis pode indicar abuso durante o armazenamento do produto em relação ao binômio tempo x temperatura, fator crucial para o desenvolvimento de microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

TABELA 4: Resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) UFC/g das amostras de camarão com carapaça e cabeça coletados dos Boxes A e B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.

Coletas	Contagens	
	Box A	Box B
1ª Coleta	< 10	< 10
2ª Coleta	3,6X10 ⁴	3,8X10 ⁵
3ª Coleta	< 10	32,5X10 ⁴
4ª Coleta	6X10 ⁵	>250
5ª Coleta	62,5X10 ⁵	17,5X10 ⁴
6ª Coleta	2,6X10 ⁵	5,5X10
7ª Coleta	4,9X10 ⁴	<10
8ª Coleta	>250	3,7X10 ⁴
9ª Coleta	15,5X10 ⁴	<10
10ª Coleta	< 10	< 10

TABELA 5: Resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) UFC/g das amostras de camarão sem carapaça e cabeça (filé) coletados dos Boxes A e B da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.

Coletas	Contagens	
	Box A	Box B
1ª Coleta	< 10	2,2X10 ⁵
2ª Coleta	3,2X10 ⁴	<10
3ª Coleta	11X10 ⁴	10,8X10 ³
4ª Coleta	>250	4,5X10 ⁴
5ª Coleta	5,3X10 ⁴	98,5X10 ⁻³
6ª Coleta	7,6X10 ⁴	<10
7ª Coleta	17,5X10 ³	>250
8ª Coleta	2,1X10 ⁻⁴	7,8X10 ³
9ª Coleta	> 250	<10
10ª Coleta	<10	<10

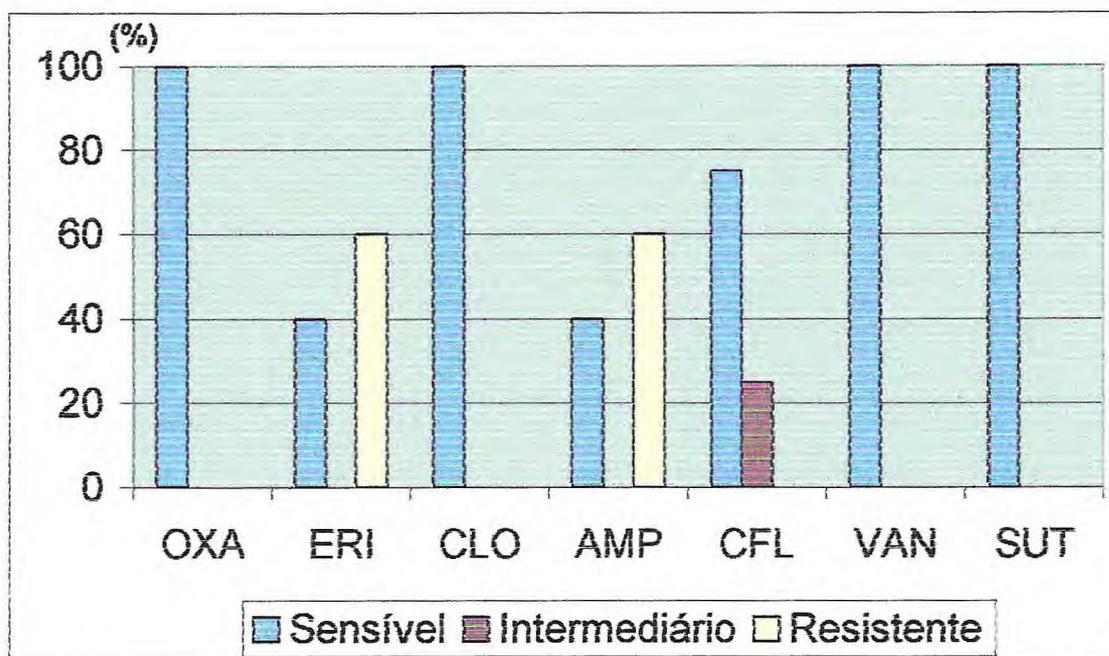
De acordo com as contagens padrão em placas realizadas, para microrganismos mesófilos, verificamos uma maior contaminação nos camarões sem carapaça e cabeça do Box A em comparação aos adquiridos no Box B. O mesmo não se pode afirmar dos camarões inteiros. Os dois boxes, nesse caso, apresentam os produtos com contagens semelhantes. Contagens a 37° C não se correlacionam com deterioração, uma vez que as psicrófilas é que alteram o pescado (SIMMONDS; LAMPRECHT, 1980b). Segundo SIMMONDS; LAMPRECHT (1980a), as enzimas proteolíticas do músculo do pescado e as de origem bacteriana têm um papel mais importante na deterioração do pescado tropical do que as das espécies de águas frias, razão por que os peixes tropicais podem deteriorar-se mais rapidamente em temperaturas ambientes. As contagens de mesófilas são usadas mais como um controle na qualidade do pescado. É importante se saber se o pescado está mais ou menos contaminado para se desenvolver um bom plano de qualidade.

As TABELAS 6 e 7 mostram o perfil de sensibilidade/resistência para cepas isoladas de camarão com e sem carapaça e cabeça dos Boxes A e B.

Sessenta por cento (60%) das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas dos camarões do Box A foram resistentes a ampicilina e a eritromicina (Tabela 6, Figura 8). As cepas isoladas dos camarões do Box B também apresentaram resistência aos mesmos antibióticos sendo em maiores proporções: 85,71% a eritromicina e 100% a ampicilina (Tabela 7, Figura 9).

TABELA 6: Perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de camarão, com e sem carapaça e cabeça, do Box A., da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.

ANTIBIÓTICO	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	n	%	n	%	n	%
OXACILINA	5	100	0	0	0	0
ERITROMICINA	2	40	0	0	3	60
CLORANFENICOL	5	100	0	0	0	0
AMPICILINA	2	40	0	0	3	60
CEFALOTINA	3	75	1	25	0	0
VANCOMICINA	4	100	0	0	0	0
SULFAZOTRIN	4	100	0	0	0	0

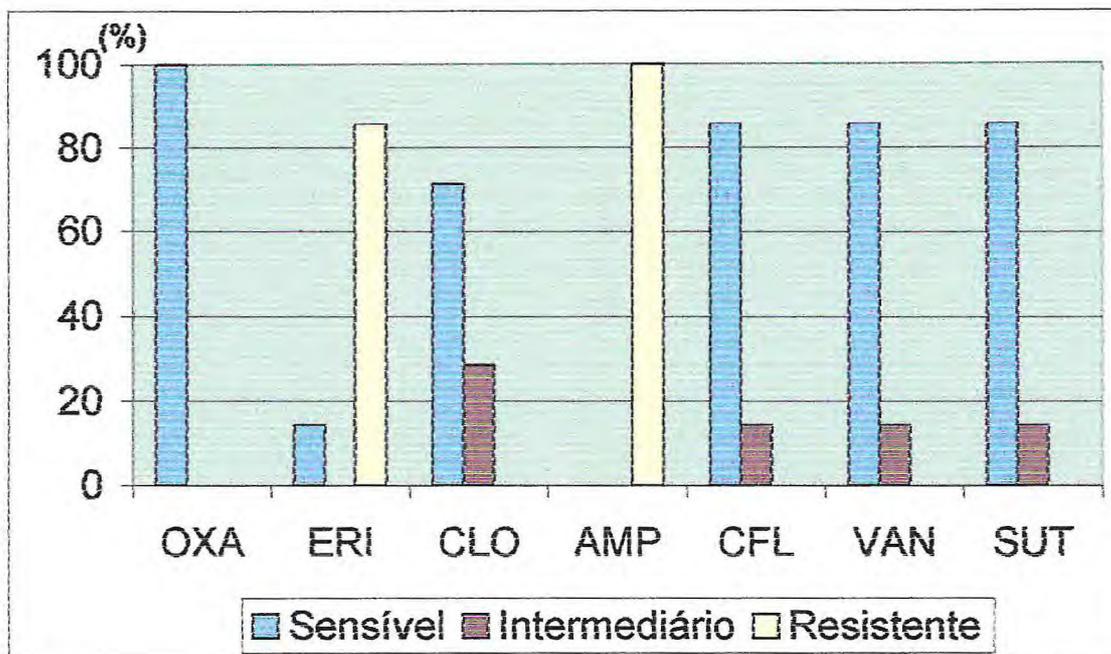


OXA – oxacilina; ERI – eritromicina; CLO – cloranfenicol; AMP – ampicilina; CFL – cefalotina; VAN – vancomicina; SUT – sulfazotrim.

FIGURA 8 – Percentual de resistência aos antimicrobianos, das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva*, isoladas de camarão com e sem carapaça e cabeça do Box A, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.

TABELA 7: Perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de camarão com e sem carapaça e cabeça do Box B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.

ANTIBIÓTICO	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	n	%	n	%	n	%
OXACILINA	7	100	0	0	0	0
ERITROMICINA	1	14,28	0	0	6	85,71
CLORANFENICOL	5	71,43	2	28,57	0	0
AMPICILINA	0	0	0	0	7	100
CEFALOTINA	6	85,71	1	14,28	0	0
VANCOMICINA	6	85,71	1	14,29	0	0
SULFAZOTRIN	6	85,71	1	14,29	0	0



OXA – oxacilina; ERI – eritromicina; CLO – cloranfenicol; AMP – ampicilina; CFL – cefalotina; VAN – vancomicina; SUT – sulfazotrim.

FIGURA 9 – Percentual de resistência aos antimicrobianos, das cepas de *Staphylococcus coagulase positiva*, isoladas de camarão inteiro e sem carapaça e cabeça do Box B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.

Tanto a ampicilina como a eritromicina têm um largo espectro de ação sobre as bactérias gram positivas e são semelhantes à penicilina G (TAVARES, 2001).

DAS; KHANNA et al. (1995) trabalhando com isolados de estafilococos de peixes encontraram 72,72% e 63,63% de cepas resistentes a eritromicina e a ampicilina. O grande problema desses achados é o fato da circulação de bactérias com genes de resistência a antibióticos comumente usados.

A TABELA 8 mostra o perfil de resistência para cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas dos manipuladores (Box A e B) de acordo com o sítio de coleta (mão e cavidade nasal).

A oxacilina, eritromicina e sulfazotrim mostraram-se cem por cento (100%) eficientes para as cepas testadas das mãos e cavidade nasal do manipulador do Box A. As cepas isoladas da mão do manipulador A

apresentaram, 20%, 40% e 20% de resistência aos antibióticos cloranfenicol, ampicilina e cefalotina, respectivamente. Da cavidade nasal do mesmo manipulador, apresentaram resistência a ampicilina 5 (100%) das cepas analisadas e 1 (20%) cepas foi resistente-intermediária a vancomicina.

Resultado semelhante foi obtido por Vanzo e Azevedo (2003) ao testar o perfil de resistência a antibióticos e a quimioterápicos de cepas de *S. aureus* isoladas de manipuladores de alimentos de Unidades de Alimentação e Nutrição de Ribeirão Preto – São Paulo. Nenhuma das cepas mostrou-se resistente a oxacilina. Todas (100%) foram sensíveis ao antibiótico sendo chamadas "*Staphylococcus aureus* sensíveis a oxacilina", cepas OSSA. O mesmo aconteceu para as cepas isoladas das mãos e da cavidade nasal do manipulador do Box B. No entanto, foram encontradas cepas resistentes à eritromicina (15,38%), ampicilina (66,67%), vancomicina (7,69%) e sulfazotrim (7,69%) isoladas das mãos desse manipulador do Box B. Além do que, 66,67% também, das cepas isoladas da sua cavidade nasal e mão apresentaram resistência a ampicilina.

Albuquerque (2004) ao analisar o perfil de resistência a antibióticos de isolados de *S. aureus*, provenientes de manipuladores de pescado de dois boxes de comercialização da feira de pescado do Mucuripe, Fortaleza, Ceará, encontrou cem por cento (100%) das cepas, dos três sítios de coleta (mão, cavidade nasal e oral), resistentes a ampicilina e 40% das cepas provenientes da cavidade nasal, de um dos manipuladores, com resistência intermediária a vancomicina. Portanto os dados da atual pesquisa corroboram com os de Albuquerque (2004).

Um fato importante e preocupante foi a presença de uma cepa das amostras isoladas da cavidade nasal do manipulador A e outra das amostras isoladas da mão manipulador B apresentarem resistência intermediária a vancomicina, visto, ser esta droga a escolhida para o tratamento de infecções para "*Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina" (MRSA) nas últimas três décadas (LINARES, 2001).

TABELA 8: Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus coagulase* positiva, de acordo com o sítio de coleta do manipulador dos boxes A e B, da Feira de Pescado do Mucuripe, CE.

BOX A								
ANTIBIÓTICO	MÃO				CAVIDADE NASAL			
	Resistente		Sensível		Resistente		Sensível	
	n	%	n	%	n	%	n	%
OXACILINA	0	0	5	100	0	0	5	100
ERITROMICINA	0	0	5	100	0	0	5	100
CLORANFENICOL	1	20	2	40	0	0	1	20
AMPICILINA	2	40	3	60	5	100	0	0
CEFALOTINA	1	20	4	80	0	0	5	100
VANCOMICINA	0	0	4	80	1	20	4	80
SULFAZOTRIN	0	0	5	100	0	0	5	100

BOX B								
ANTIBIÓTICO	MÃO				CAVIDADE NASAL			
	Resistente		Sensível		Resistente		Sensível	
	n	%	n	%	n	%	n	%
OXACILINA	0	0	13	100	0	0	3	100
ERITROMICINA	2	15,38	11	84,61	0	0	3	100
CLORANFENICOL	0	0	8	61,54	0	0	0	0
AMPICILINA	2	66,67	0	0	2	66,67	1	33,33
CEFALOTINA	0	0	13	100	0	0	3	100
VANCOMICINA	1	7,69	12	92,31	0	0	3	100
SULFAZOTRIN	1	7,69	11	84,61	0	0	3	100

4. CONCLUSÕES

Baseado na legislação da ANVISA (RDC N. 21, 12 janeiro de 2001) os camarões comercializados na feira livre de pescados do Mucuripe podem ser classificados como um alimento potencialmente causador de intoxicações alimentares, visto que mesmo sofrendo cozimento estes crustáceos não terão suas toxinas bacterianas inativadas.

Os manipuladores de pescados da referida feira de comercialização devem ser orientados para a importância dos hábitos de higiene e sobretudo para as temperaturas das bancadas dos boxes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. (Disponível em: http://www.anvisa.gov.Br/legis/resol/12_01rde.htm >acesso em: 16 set. 2004)

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Portaria nº 326 de 30 de julho de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de fabricação para os estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 1997. Seção I, 16.560-3.

ALBUQUERQUE, W. F., VIEIRA, R. H. S. F. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em camarões sete barbas (*Xiphopenaeus Kroyeri*) comercializados na feira livre de pescadao do Mucuripe-Fortaleza, Ceará, XIX CBCTA, Recife, no período de 07 a 10 de setembro de 2004.

ALMEIDA et al. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**. 29 (4), p. 290-294, 1995.

ANAND, C. et al. Bactriological quality of seafoods landed in tuticorin fishing harbour of Tamil Nadu, India. **Journal of Science and Technologu-Mysore**. 39 (6): 694-697, nov-dec 2002.

ANGELILLO, I. F. ET AL., Food handlers and foodborne dieases: knowledge, attitudes and reported behavoir in Italy. **Journal of Food Protection**, Des. Moines, v. 63, n. 3, p. 381-385, 2000.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococcal-na introduction. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, s1-8s, suppl. s, 1990.

BENNET, R. W. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Manual: of the Division of Microbiology**. 6th ed. Arlington, VA: US. Food and Drug Administration, 1984. cap. 14, p. 14.01-14.05

BERGDOLL, M. S. **Staphylococcal food poisoning. foodborne diseases**. cliver, d. o. (ed) San Diego Academic Press, cap. 5, p. 86-106, 1990.

CARMO, L. S. Intoxicação alimentar. **Revista FAPEMIG**, Minas Gerais, nº 11, p. 25-27. jun./ago. 2002

CARVALHO, C. O.; SERAFIM, A. B. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do restaurante da Universidade Federal de Goiás. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 45, p. 19-24. Set/out. 1996.

CONSTANTINIDO, G. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. **Revista Higiene Alimentar**, v. 8 n. 32: p. 5-6, 1994 [apresentado no 1º Seminário de Vigilância Sanitária Pesqueira: Qualidade dos Pescados. 1994, São Paulo]

DAS, S. C.; KHANNA, P. N. Antibiogram and phage typing of *Staphylococcus aureus* isolated from meat, fish and food handlers. **Indian Journal of Animal Sciences** 65(9): 953-956, September 1995.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo, editora Atheneu, 2002. 184 p.

FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, 1996. p. 43 – 46.

FRAZIER, W. ET AL. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Acribia, 1993, p. 550-555.

GERMANO, P.M.L.; OLIVEIRA, J.C.F.; GERMANO, M.I.S.O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 7, n.28, p. 40-5,1993.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. São Paulo. Varela. 2001. 629 p.

HOBBS, C. B.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. SÃO PAULO. VARELA. 1999. 377 p.

KLOSS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999. cap. 16, p. 264-282

KOLETAR, S. L.; *Staphylococcus*. In: MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. JR. (Ed). **Textbook Diagnostic Microbiology**. Editora Saunders Company, Philadelphia, 1995. cap. 3, 50-96.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: DONNES, F. P.; ITO, K. (Ed). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 39, p. 387-403

LARSEN, H. S., MAHON, C. R. *Staphylococcus*. In: **Diagnistic Microbiology**. Ed. Connie R. Mahon, George Manuseelis Jr. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. cap. 10, p. 325-338.

LEITÃO, M. F. F. Microbiologia de alimentos. In: **Tratado de Microbiologia**. Ed. Isaac Roitman, Luiz R. Travassos, João L. Azevedo. São Paulo: Manoele, 1988, p. 03-81.

LIMA, F. C. Vírios marinhos: 1. *Vibrio parahaemoliticus*. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11 n. 47, p. 14-22, 1997.

LINARES, J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. **Clinical Microbiology and Infection**. Oxford, v. 7, p. 8-15, Suppl. 4, 2001.

OLIVEIRA, A. G. et al., Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**. Rio de Janeiro, v. 37, n. 4 p. 239-246, 2001.

OLIVEIRA, A. M.; GONÇALVES, M. O.; SHINOHARA, N. K. S.; STAMFORD, T. L. M. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. **Revista Higiene Alimentar**. v. 17, n. 114/115 p. 12-19, 2003.

MARTINS L. T. *Staphylococcus*. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F.; Candeias, J. A. N. (Ed.). (1999^a). **Microbiologia**. 3^a ed., São Paulo: Atheneu. p. 157 – 170.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F; BRESSEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607-625

PEREIRA, M. L. et al. Antibiotic activity of brazilian "gren propolis" against bacteria from human clinical etiology. In: **CONGRESS APIMANDIA**, 36, 1999, p. 225.

PIAZZA, R. M. F; MENEZES, C. A.; Fatores de virulências II: toxinas. **Microbiologia**. 4^a ed., São Paulo: Atheneu. p. 149 – 156, 2004..

QUEIROZ, A. T. et al, Boas práticas de fabricação em restaurantes "self-service" a quilo. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 14, n. 78/79, p. 45-49, nov./dez. 2000.

Revista Aquicultura e Pesca (Disponível em:
http://www.saudeemmovimento.com.br/conteudos/conteudo_exibe1.asp?cod_noticia=1447– Acessado dia 16 de setembro de 2004)

ROITMAN, I; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L; **Tratado de Microbiologia**. São Paulo. Ed. Manoele, 1988 v. 1 p. 44-46.

SANTOS, M. G. et al. Coliformes isolados de utensílios e equipamentos, na linha de produção de camarão, de uma indústria de pescado de Fortaleza, Ceará. **Revista Higiene Alimentar**. v. 16, n. 101 p. 67-75, 2002.

SIKORSKI, Z. E. (1990) **Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritive y conservation.** Zaragoza: Acribia.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1997, 295 p.

SILVA, W. P. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vaca com mastite subclínicas e de outras fontes em propriedades produtoras de leite, 1998. **tese (doutorada em ciências de alimentos).** Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo.

SILVA, C. H. P.M. **Bacteriologia: um texto ilustrado.** Teresópolis: Eventos, 1999. p. 121-134.

SILVA, W. P. GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar.** v. 18 n. 122. p. 32-37, 2004.

SIMMONDS, C. K.; LAMPRECHT, E. C. (1980a). South African fishing industry research. **Institute Annual Report.**, n. 34, p.88-91

SIMMONDS, C. K.; LAMPRECHT, E. C. In: CONNELL, J. J. (Ed).(1980b) **Advances in fish science and technology.** London: Fishing News Books. p. 298-299.

SIMÕES, A. M. M ET AL. Avaliação das refeições servidas por uma unidade de alimentação e nutrição de Salvador. Bahia, no período de 1998. In Congresso Brasileiro de Microbiologia, 20, 1999, Salvador. **anais...** Salvador: SBM, 1999.

SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. Gram positive cocci. In: **Berguey's Manual of Determinative Bacteriology.** 9 ed. Baltimore: 1986. v. 2, p. 999-1103

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemáticas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 33 (3), p. 281-301, maio/junho, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. Classificação dos antibióticos.** 3ª ED., São Paulo, Ed. Ateneu, 1215 p, 2001.

TRABULSI, L. R.MARTINS. L. T. BUERIS, V. In: **Microbiologia.** 4ª ed., São Paulo: Atheneu. p. 175-182. 2004.

VALENTINI, H, F D'INCAO, LF RODRIGUES, JE REBELO NETO &, LG DOMIT. 1991. Análise da pesca do camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. **Atlântica,** Rio Grande, 13 (1):143-157.

VANZO, S. P., AZEVEDO, R. V. P. Detecção de *S. aureus* em manipuladores de alimentos – perfil de resistência a antibióticos e quimioterápicos. **Revista Higiene Alimentar**. v.17, n. 104/105, p. 114 –123.

VIEIRA, R. H. S. F et al., *S. aureus* em camarão fresco e superfícies de bancadas da feira livre de pescado do Mucuripe, Fortaleza, Ce. – registro de pontos crítico de controle e medidas de controle. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 12, n.55, p. 47 – 50, mai./ jun. 1998.

VIEIRA, R. H. S. F. et al.. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. Ed. VARELA, São Paulo, 380 p., 2004.

ANEXO - Meios de Cultura e Reagentes

1 – AGUA PEPTONADA

2 – CALDO INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO (BHI) (Difco-0037-01)

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

3 – ÁGAR BAIRD-PARKER (Merck)

No preparo deste meio foi seguida a técnica recomendada pelo fabricante. Assim, 63 g do meio desidratado foram adicionados a 1.000 mL de água destilada e a seguir aquecido até a ebulição, a fim de se obter a dissolução completa dos ingredientes. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e, posteriormente, resfriado a $\pm 50^{\circ}\text{C}$, quando então, eram adicionados em 50 mL de emulsão de gema de ovo e 3 mL de solução de telurito de potássio a 1%. Em seguida, o meio era distribuído em placas de Petri esterilizadas, em volumes de aproximadamente 15 mL, e após sua solidificação eram depois mantidas em geladeira a 4°C por um período não superior a 48 horas.

3.1 – Preparo da Emulsão de Gema de Ovo (Segundo SIQUEIRA, 1995)

Ovos frescos de galinha eram lavados e imersos por algum tempo (não menos que três minutos) em álcool a 70%. Posteriormente os ovos eram retirados da solução de álcool, flambados e, uma vez abertos assepticamente, as claras eram separadas das gemas e então com o auxílio de uma pipeta de

10 mL estéril, as gemas eram transferidas para um erlenmeyer também estéril, adicionando-se-lhe igual volume de solução salina a 0,85% estéril e, em seguida, homogeneizada com movimentos rotatórios. Para cada 95 mL do meio basal são adicionados 5 mL da emulsão de gema de ovo.

4 – ÁGAR TRIPTONA SOJA (TSA) INCLINADO (Merck 1.05458)

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

5– PLATE COUNT AGAR (Merck CM 325)

O meio era preparado de acordo com as instruções do fabricante. Logo, 17,5 g do produto desidratado eram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e, posteriormente, o meio era distribuído em placas de Petri esterilizadas, em volumes de aproximadamente 15mL.

6 – PLASMA DE COELHO LIOFILIZADO (CECON)

Segundo o fabricante, o plasma de coelho liofilizado foi diluído em 3 mL de água destilada estéril.