

Estudo da sensibilidade *in vitro* de diferentes cepas de *Vibrio cholerae* 01 à radiação gama de ^{60}Co *

Study about the sensibility *in vitro* of different strains of *Vibrio cholerae* 01 exposed to ^{60}Co gamma radiation

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Nélida Lúcia Del Mastro
IPEN/CNEN/USP
05422-970 – São Paulo – SP
e-mail: nlmastro@net.ipen.br

1 - Serviços de Saúde do Instituto Adolfo Lutz – SP
2 - Seção de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz – SP
3 - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CNEN – SP

Ivany Rodrigues de MORAES¹; Dilma Scala GELLI²; Miyoko JAKABI²; Nélida Lúcia Del MASTRO³

RESUMO

A presença de certos microrganismos nos alimentos ou de metabolitos originados durante sua multiplicação pode dar lugar a várias enfermidades no homem: as intoxicações e as infecções alimentares. Dentre os agentes causadores das Enfermidades Transmitidas por Alimentos encontra-se o *Vibrio cholerae* 01. Estudou-se no presente trabalho a radiosensibilidade *in vitro* de quatro cepas de *V. cholerae* 01, submetidas ao tratamento com diferentes doses de radiação ionizante de ^{60}Co , e compararam-se os resultados obtidos com dados da literatura relacionados a problemas de veiculação alimentar de bactérias patogênicas, incluindo a água.

UNITERMOS: *Vibrio cholerae*; Doenças por alimentos; Radiação ionizante.

INTRODUÇÃO

Desde 1991, o *Vibrio cholerae* tem sido uma das maiores preocupações para as autoridades de Saúde Pública na região latino-americana¹¹, pois nesse ano a sétima pandemia de cólera se estendeu à região, atingindo populações previamente intocadas pelo biotipo El Tor. A cólera epidêmica reapareceu na América Latina após um século de ausência^{9,13,15,17}. A possível aplicação de vacina como forma de controle da doença e proteção da população é tema de estudo e discussões¹⁰. Outras formas de controle incluem fatores que interferem com o agente no meio ambiente e nos alimentos^{6,18}.

O *V. cholerae* é classicamente considerado como de veiculação hídrica e pode permanecer viável por 10 a 13 dias em água do mar à temperatura ambiente, e acima de 60 dias quando sob refrigeração. Esta bactéria sobrevive melhor na água do mar do que nos alimentos, embora estes últimos não devam ser desprezados como agentes veiculadores desta bactéria ao homem^{2,8}. A permanência do *V. cholerae* El Tor em água mineral engarrafada está entre 1 e 19 dias⁵. Na presença de NaCl, o *V. cholerae* se desenvolve quando este sal está em concentrações de 5 a 15 mM, embora também possa se desenvolver e multiplicar na sua ausência^{1,18}.

A quantidade de células viáveis necessárias para desencadear a doença no homem é elevada: nas pessoas que apresentam pH estomacal normal são necessárias 10^8 - 10^{10} bactérias/g ou ml do alimento ou bebida, enquanto em pessoas gastrectomizadas ou com

supressão/inativação do suco gástrico, o número é menor (10^3 - 10^5 bactérias/g ou ml); assim, assume-se que o pH estomacal é uma barreira natural à doença, pois é capaz de inativar esta bactéria antes que ela alcance o intestino¹, impedindo a doença, que ocorre por sua fixação, multiplicação e conseqüente produção de toxina colérica em nível intestinal.

As formas de controle desta bactéria possíveis em situações epidêmicas são várias: cloração da água potável; cocção adequada dos alimentos que a possam veicular; acidificação de alimentos, entre outras^{6,18}. Entretanto, alimentos que são consumidos sem cocção prévia e/ou acidificação, como as ostras e verduras, podem veicular a doença ao homem⁸. É importante assinalar que esta bactéria pode se adaptar em ecossistema marinho, em especial na costa, onde se encontram os moluscos bivalves. Águas superficiais contaminadas são veículos da bactéria ao homem, seja pelo consumo direto ou indireto, como exemplo por contaminação de frutas e verduras por água de irrigação⁵.

Em 1992, foi realizada uma consulta conjunta OPS-OMS/IAEA/FAO-ONU¹² sobre o uso de irradiação como medida de intervenção de saúde pública para o controle das Enfermidades Transmitidas por Alimentos na América Latina e Caribe, que, entre outras, concluiu que “a irradiação é um método especial para a desinfecção e descontaminação de alimentos sólidos, especialmente aqueles que são consumidos crus ou sem cocção completa”.

O objetivo deste trabalho foi estudar a radiosensibilidade *in vitro* de diferentes cepas de *Vibrio cholerae* 01, em meio mínimo

* Parte da Dissertação de Mestrado, Moraes, I. R. Estudo da Sensibilidade do *Vibrio cholerae* 01 à Radiação Gama de ^{60}Co in vitro e in vivo em Ostras (*Crassostrea brasiliana*), Artificialmente Contaminadas. Projeto IAEA/IAL/CNEN. São Paulo, 1996. Tese (Mestrado) – IPEN – USP.

APA (Água Peptonada Alcalina) por tratamento com diferentes doses de radiação ionizante (0 kGy; 0,5 kGy e 1,0 kGy) de ^{60}Co , para avaliação de medida de controle deste contaminante patogênico nos moluscos bivalves. Para o cálculo desta radiosensibilidade, foi usado o valor médio de D_{10} , ou seja, o valor requerido para eliminar 90% da população bacteriana inicial, ou diminuir a população em 1 década logarítmica⁷.

MATERIAL E MÉTODO

Descrição das Cepas Utilizadas - as cepas de *Vibrio cholerae* utilizadas no presente trabalho foram obtidas liofilizadas, na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo. São elas, conforme indicado pela Seção de procedência (IAL): *V. cholerae* 01 – Não-Toxigênico – Isolada de água do mar da costa marinha do litoral de São Paulo, 1974; *V. cholerae* 01 - Inaba Ref. 008 - Isolada de caso humano de cólera no Peru, 1991; *V. cholerae* 01 - Ogawa Ref. 124 – Isolada de caso humano de cólera na Bolívia, 1992; e *V. cholerae* 01 – Clássico – Ogawa Ref. VC 12 - I.A.L.

Cálculo da D_{10} – conforme descrito em Jay⁷.

Irradiação – utilizou-se o irradiador de ^{60}Co modelo Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Limited (AECL), Ottawa-Canada, da Coordenadoria de Aplicações na Engenharia e Indústria, IPEN-CNEN/SP.

A dosimetria da fonte foi realizada previamente, segundo metodologia de Fricke; Hart⁴.

As amostras foram colocadas dentro da câmara de irradiação cilíndrica medindo 14,5 cm de diâmetro e 20 cm de altura e irradiadas em condições normais de trabalho.

Dependendo do mês da irradiação, o tempo de exposição para atingir uma determinada dose era corrigido, levando-se em consideração a queda da radioatividade do ^{60}Co (T 1/2 : 5, 263 anos). As células bacterianas foram irradiadas em suspensão, em tubos de vidro de 12x120 mm contendo 5 ml, mantidos em posição vertical num suporte de plástico. A taxa de dose média utilizada foi calculada em Gy/h; para avaliação estatística dos resultados de radiosensibilidade, foram realizados pelo menos três testes para cada uma das cepas.

Preparo das Amostras – os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL), SP. As cepas de *Vibrio cholerae*, obtidas sob forma liofilizada, foram reativadas em APA (Água Peptonada Alcalina) e incubadas a 35°C por 18 – 20 horas. 5 ml das amostras com culturas foram distribuídas em 3 tubos de ensaio de 12x120 mm, que foram transportados em caixa de isopor à temperatura ambiente. Após a irradiação, foram imediatamente encaminhadas ao laboratório e analisadas. Para a quantificação, prepararam-se diluições seriadas, por transferência de 1 ml da diluição anterior para 9 ml de APA, até a diluição 10^{-10} . Os tubos com a cultura inicial e suas respectivas diluições seriadas foram incubados a 35°C por 18 - 24 horas. Após incubação, o caldo APA de cada tubo que apresentava película característica na superfície e/ou turvação foi semeado em superfície de ágar TCBS (Tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose), método de estrias, para caracterização de colônias sacarose positiva (colônias amarelas) e incubado a 35°C por 18 - 24 horas. As colônias amarelas foram isoladas em meio IAL¹⁴ com 1% de NaCl e em ágar T_1N_1 e T_1N_0 (Meio de Cultura Triptcase com 1% de NaCl e sem NaCl, respectivamente), Elliot *et al.*³.

As colônias com características de *V. cholerae* em meio IAL foram testadas para oxidase, (“Spot Test” – Oxidase Reagent, Difco Laboratories), e sorologia polivalente de *V. cholerae* 01 (IAL-SP-Lote 20, data de fabricação 10/4/95).

Foram caracterizadas como *V. cholerae* as colônias sacarose (+), glicose (+) sem produção de gás, urease (-), L – triptofanodesaminase (-), H₂S (-), oxidase (+), crescimento a 0 e 1% de NaCl e reação sorológica polivalente (+), considerando os respectivos controles de meios, reagentes e anti-soros com cepa padrão de *V. cholerae* 01, e ausência de auto-aglutinação, tanto na cepa controle como nas obtidas das culturas sob teste.

A quantificação do número de células viáveis foi baseada nas diluições positivas em caldo APA. Esta quantificação foi realizada a partir dos tubos que foram irradiados (0,5 e 1,0 kGy), como dos não-irradiados (0 kGy – tubos controle).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com cada uma das cepas estão descritos nas Tab. 1 (*V. cholerae* 01 - não toxigênico), 2 (*V. cholerae* 01 – El Tor – Inaba 008), 3 (*V. cholerae* 01 - El Tor - Ogawa 124) e 4 (*V. cholerae* Clássico – Ogawa VC12). Os valores de D_{10} estão expressos na Tab. 5.

Segundo os dados das tabelas, a radiação diminuiu drasticamente a contagem de células/ml de *V. cholerae* 01 – não-toxigênico, sendo os valores das médias aritméticas e desvios padrões para as doses de 0,5 kGy e 1,0 kGy, respectivamente, significantes, de acordo com o teste de *t* de Student, para os testes realizados.

Da análise dos resultados obtidos com as diferentes cepas de *V. cholerae* 01, observa-se que o tratamento com a dose de 1,0 kGy é estatisticamente superior para a redução da concentração inicial dos microrganismos testados, quando comparado com a de 0,5 kGy.

Observa-se, pelos dados da Tab. 5, que os valores médios de D_{10} obtidos para as diferentes cepas de *V. cholerae* 01 variaram entre 0,10 kGy e 0,13 kGy. Estes resultados são da mesma ordem de grandeza que os encontrados por outros autores. Segundo Rubio¹⁶, o valor de D_{10} obtido para *V. cholerae* 01 (sorotipo Ogawa) foi de 0,1015 kGy.

Tabela 1

Radiossensibilidade de *Vibrio cholerae* 01 – não-toxigênico – São Paulo, 1995.

Experimento	0 kGy Vc/ml	0,5 kGy Vc/ml	1,0 kGy Vc/ml
1	10^9	10^5	10^1
2	10^{10}	10^3	aus.
3	10^{10}	10^7	10^1
4	10^{10}	10^5	10^1
$\bar{x} \pm s$	$(7,8 \pm 4,5) \times 10^9$	$(2,6 \pm 5,0) \times 10^6$	$(7,5 \pm 5,0) \times 10^0$

Tabela 2

Radiossensibilidade do *Vibrio cholerae* 01 - El Tor - Inaba 008. São Paulo, 1995.

Experimento	0 kGy Vc/ml	0,5 kGy Vc/ml	1,0 kGy Vc/ml
1	10^{10}	10^5	aus.
2	10^9	10^3	aus.
3	10^9	10^7	10^3
4	10^{10}	10^5	aus.
$\bar{x} \pm s$	$(5,5 \pm 5,2) \times 10^9$	$(2,6 \pm 5,0) \times 10^6$	$(2,5 \pm 5,0) \times 10^2$

Tabela 3

Radiossensibilidade do *Vibrio cholerae* 01 - El Tor - Ogawa 124. São Paulo, 1995.

Experimento	0 kGy Vc/ml	0,5 kGy Vc/ml	1,0 kGy Vc/ml
1	10 ¹⁰	10 ⁵	10 ¹
2	10 ¹⁰	10 ⁷	aus.
3	10 ¹⁰	10 ⁵	aus.
4	10 ⁹	10 ⁶	aus.
x ± s	(7,8±4,5) x10 ^{9*}	(5,5±5,2) x10 ^{5*}	(2,5±6,0) x10 ^{0*}

Tabela 4

Radiossensibilidade do *Vibrio cholerae* Clássico - Ogawa Vc 12. São Paulo, 1995.

Experimento	0 kGy Vc/ml	0,5 kGy Vc/ml	1,0 kGy Vc/ml
1	10 ⁹	10 ⁵	10 ²
2	10 ¹⁰	10 ⁶	aus.
3	10 ¹⁰	10 ⁵	aus.
x ± s	(7,0±5,2) x10 ^{9*}	(4,0±5,2) x10 ^{5*}	(3,3±5,7) x10 ^{1*}

Observação - Legenda das tabelas de 1 a 4:

Vc/mL = *Vibrio cholerae* por ml; aus = ausente; * = média estatística das contagens.

Tabela 5

Valores médios de D₁₀ obtidos para as diferentes cepas de *Vibrio cholerae* 01, segundo a dose de radiação ionizante. São Paulo, 1995.

Vc 01	D ₁₀	
	0,5 kGy	1,0 kGy
Não toxigênico	0,10	0,11
E1-Tor Inaba 008	0,13	0,12
E1-Tor Ogawa 124	0,13	0,11
Clássico Ogawa Vc12	0,11	0,11

Vc 01 = *Vibrio cholerae* 01.

FARKAS**, informa que, de acordo com trabalhos realizados na Itália e China, a D₁₀ encontrada para *V. cholerae* foi de 0,11 kGy.

A sensibilidade dos microrganismos à radiação, considerando-se mesmo gênero e espécie, pode diferir/variá em função de cepas (biótipos, sorotipos, origem etc.). As diferenças de resistência entre as cepas de uma mesma espécie são geralmente pequenas, e devem ser levadas em conta para efeitos práticos; por outro lado, a resistência de gêneros diferentes pode ser significativa^{6,12}. Neste experimento, a cepa

não-toxigênica apresentou maior radiosensibilidade. As doses recomendadas para o tratamento das ostras e outros moluscos bivalves é de 1,0 kGy para *Vibrio sp* e de 3,0 kGy para *Salmonella spp*¹⁸, compatíveis com as doses empregadas no presente trabalho no que se refere ao *Vibrio sp*. Observa-se que a dose de 3,0 kGy é recomendada com base na sensibilidade de outras bactérias patogênicas, notadamente a *Salmonella spp*, que pode apresentar maior resistência do que as Vibrionaceae⁷. Ainda, a radiação usada deve considerar o número máximo do microrganismo em questão, presente no produto a ser irradiado⁷. Em 1992, a OPS-OMS/IAEA/FAO-ONU¹² recomendou que se realizassem estudos para avaliar a função da irradiação no controle de agentes de Enfermidades Transmitidas por Alimentos, assim como a necessidade de que os governos elaborassem regulamentos técnicos que autorizassem e normalizassem a utilização da irradiação como medida de intervenção em Saúde Pública na América Latina e Caribe. Os dados levantados por este trabalho, que utilizou cepas isoladas na América do Sul, assim como os constantes nas literaturas citadas, comprovaram a pertinência e adequacidade do uso da radiação no controle de doenças de veiculação alimentar, incluída a água. Os resultados obtidos com cepas da região são similares aos obtidos com cepas isoladas de outras regiões geográficas. Para a recomendação legal da aplicação da radiação como medida de saúde pública, devem ser consideradas as possíveis interferências do substrato ou alimento em que será aplicado, assim como a diversidade, natureza e características dos agentes patogênicos^{7,12,18}.

CONCLUSÕES

As quatro diferentes cepas de *Vibrio cholerae* 01 estudadas no presente trabalho mostraram-se sensíveis à ação da radiação ionizante de ⁶⁰Co, quando irradiadas *in vitro*, em meio mínimo. Uma dose de 0,5 kGy foi efetiva na redução de pelo menos 3 log₁₀ da população inicial de *V. cholerae* 01. Por sua vez, o tratamento com a dose de 1,0 kGy, resultou na redução da população inicial de pelo menos 7 log₁₀. A inativação de células das bactérias testadas, portanto, é diretamente proporcional a quantidades mais elevadas de radiação.

A utilização da radiação ionizante como processo tecnológico pode contribuir para o controle de doenças causadas por este tipo de bactéria. É uma medida recomendada pelo Codex Alimentarius e pela OMS-OPS/IAEA/FAO como intervenção adequada para perigos e riscos microbiológicos relacionados com o consumo de alimentos.

SUMMARY

The presence of some microorganisms in food, or the metabolites originated during their own multiplication, may bring several diseases to humans: intoxications and foodborne infections. Among the agents that may cause those diseases, we find *Vibrio cholerae* 01. In this experiment, the studies are focused on the radiosensitivity *in vitro* of four strains of *V. cholerae* 01, exposed to different doses of ionizing radiation of ⁶⁰Co. The results are compared with other data related to bacterial foodborne diseases, including water.

UNITERMS: *Vibrio cholerae*; Foodborne disease; Ionizing Radiation.

** FARKAS, J. Comunicação pessoal. Budapest, Hungary : Institute of Preservation and Livestock Products Technology da University of Horticulture and Food Industry, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.B.Jr. Bacteria and Mycotic Infections. In: Mc CARTY. (ed.). **Microbiology** - Including immunology and molecular genetics. 2.ed. London : [s.n.], [s.d.]. p.779.
- 2- DE PAOLA, A.A.; PRESNELL, N.; MOTES, A. Non 01 *Vibrio cholerae* in shellfish, sediment and waters of U.S. Gulf Coast. **Journal of Food Protection**, v.46, n.9, p.802, 1983.
- 3- ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrios* spp. In: FDA. **Bacteriological analytical manual**. 7.ed. Arlington: AOAC, 1992. p.111-40.
- 4- FRICKE, H.; HART, E.J. In: **Radiation dosimetry**, New York : Academic Press, 1996. p.167: Chemical Dosimetry.
- 5- HUGHES, J.M.; BOYLE, J.M.; LEVINE, R.J.; KHAN, M.; AZIZ, K.; HUQ, M.I.; CURLIN, G.T. Epidemiology of El Tor cholera in rural Bangladesh: importance of surface water in transmission. **Bulletin of the World Health Organization**, v.60, n.3, p. 395-402. 1982.
- 6- ICMSF. **Microbial ecology of foods**. London : Academic Press, 1980. V.1. 332p.
- 7- JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 4.ed. New York : Chapman & Hall, 1992. p.297-300; 342.
- 8- KLONTZ, K.C.; TAUXE, R.V.; COOK, W.L.; RILEY, W.H.; WACHSMUTH, K. Cholera after the consumption of raw oysters. **Annals of International Medicine**, v.107, n.6, p.846, 1987.
- 9- LEVINE, M.M. South America: the return of cholera. **Lancet**, v.338, n.8758, p.45-6, 1991.
- 10- LEVINE, M.M.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L.; NALIN, D.R.; CISNEROS, L.; FINKELSTEIN, R.A. Volunteer studies in development of vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli*: a review. In: HOLME, T.; MERSON, M.H.; MOLLBY, R. (Eds.). **Acute enteric infections in children**. New prospects for treatment and preventions. Amsterdam : Elsevier, 1981, p.443-59.
- 11- OPS-OMS/FAO. **Informe final de la consulta técnica FAO/OPS-OMS en inocuidad y comercialización de alimentos frente a la epidemia del Cólera en las Américas**, 1991.
- 12- OPS-OMS/IAEA-FAO-ONU. **Informe final**. Consulta técnica conjunta FAO/AIEA/OPS-OMS sobre el uso de irradiación como medida de intervención de salud pública para el control de las enfermedades transmitidas por alimentos en Latino America y El Caribe. 1992. 1a.p. (HPV/FOS/126/92).
- 13- PAHO – Pan American Health Organization. Cholera situation in the Americas. **Epidemiological Bulletin**, v.12, p.1-4, 1991.
- 14- PESSÔA, G.V.; SILVA, E.A.M. Millieu pour la identification presumptive rapide des enterobactéries, des aeromonas et des vibrions. **Annals of Microbiology**, v.125 A, p.341-7, 1974.
- 15- RIES, A.A.; VUGIA, D.J.; BEINGOLEA, L.; PALACIOS, A.M.; VASQUEZ, E.; WELLS, J.G.; BACA, N.G.; SWERDLOW, D.L.; POLLACK, M.; BEAN, N.H.; SEMINARIO, L.; TAUXE, R.V. Cholera in Piura, Peru: a modern urban epidemic. **Journal of Infectious Diseases**, v.166, n.6, p.1429-33, 1992.
- 16- RUBIO, T.C. “**Uso de la irradiación como medida de intervención para controlar enfermedades transmitidas por alimentos, en LatinoAmerica y el Caribe**”. Informe preliminar del contrato de Investigación n.7781 / RB. Período de 15 de diciembre 1993 - 15 de septiembre 1994.
- 17- SWERDLOW, D.L.; MINTZ, E.D.; RODRIGUEZ, M.; TEJADA, E.; OCAMPO, C.; ESPEJO, L.; GREENE, K.D.; DALDANA, W.; SEMINÁRIO, L.; TAUXE, R.V.; WELLS, J.G.; BEAN, N.H.; RIES, A.A.; POLLACK, M.; VERTIZ, B.; BLAKE, P.A. Waterborne transmission of epidemic cholera in Trujillo, Peru: lessons for a continent at risk. **Lancet**, v.340, n.8810, p.28-32, 1992.
- 18- VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens** - An Illustrated Text. London : Wolfe, 1991. p.69; 176-7.

Recebido para publicação: 16/12/1996
Aprovado para publicação: 05/08/1998