



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

YRON MOREIRA RODRIGUES

**PESQUISA DE ESPÉCIES DE *Vibrio* spp. ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM
ANIMAL CLANDESTINOS E EFLUENTES HÍDRICOS DO NORTE DO
TOCANTINS**

Araguaína/TO

2023

Yron Moreira Rodrigues

PESQUISA DE ESPÉCIES DE *Vibrio* spp. ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL CLANDESTINOS E EFLUENTES HÍDRICOS DO NORTE DO TOCANTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSASPT) da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

Araguaína/TO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- R696p Rodrigues, Yron Moreira.
PESQUISA DE ESPÉCIES DE *Vibrio* spp. ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL CLANDESTINOS E EFLUENTES HÍDRICOS DO NORTE DO TOCANTINS. / Yron Moreira Rodrigues. – Araguaína, TO, 2023.
44 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2023.
Orientador: José Carlos Ribeiro Júnior
1. Doenças Transmitidas por Alimentos. 2. Segurança de Alimentos. 3. Saúde Pública. 4. Microbiologia de Alimentos. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

YRON MOREIRA RODRIGUES

PESQUISA DE ESPÉCIES DE *Vibrio* spp. ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL CLANDESTINOS E EFLUENTES HÍDRICOS DO NORTE DO TOCANTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

Data de aprovação: 14/12/2023

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR
Data: 22/12/2023 17:39:19-0300
Verifique em <https://validar.id.gov.br>

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior, UFNT

Cátia Maria de Oliveira Lobo

Prof. Dra. Cátia Maria de Oliveira Lobo

Ronaldo Tamanini

Prof. Dr. Ronaldo Tamanini

AGRADECIMENTOS

Dedico o primeiro agradecimento e todo o esforço ao trabalho para minha mãe, a quem minhas conquistas são como troféis na estante de nossa casa e que como a mesma diz: “podem lhe tirar tudo, menos a educação”.

Agradeço também ao meu orientador por ter me dado a oportunidade, toda a ajuda e orientação. Sou extremamente grato por tudo e ter sido seu orientado foi uma honra.

Agradeço ao meu amigo Mateus Pinheiro.

Agradeço aos meus queridos estagiários Loydes, Elifaz, Kariny e Bianca que me ajudaram na rotina do laboratório.

Agradeço a minha amiga Cristiane, uma pessoa que nem palavras conseguem descrever o quão incrível é. Sou grato por sua amizade e este trabalho eu dedico a você minha amiga.

RESUMO

As bactérias do gênero *Vibrio* spp. são causas comuns de gastroenterites associadas ao consumo de frutos do mar. Estes microrganismos possuem veiculação hídrica e podem ser transmitidos por alimentos, porém, poucas são as estimativas dos mesmos e os casos de infecção são subdiagnosticados. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são as principais espécies associadas a infecções em humanos. Estudos recentes centraram-se em potenciais fatores ambientais e reservatórios, contudo, por constituírem importantes fatores de risco para os seres humanos, como agentes de transmissão de doenças, especialmente através dos alimentos, é fundamental monitorar sua presença em alimentos. Objetivou-se neste trabalho verificar a especificidade de ensaio biomolecular para espécies de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*; isolar bactérias sugestivas e confirmar a identificação morfológica sugestiva das espécies; verificar a especificidade de ensaio biomolecular PCR e determinar se o ensaio é suficiente para a detecção de espécies patogênicas de *Vibrio* spp. em produtos de origem animal clandestinos e amostras de efluentes hídricos do rio Lontra em Araguaína, Tocantins. Foram avaliados 565 isolados sugestivos de *Vibrio* spp., entre os quais, 103 isolados foram confirmados utilizando metodologia PCR-Uniplex para espécies de *Vibrio* spp. e, entre estes, selecionados 10 isolados para sequenciamento genético do gene 16S rRNA. O resultado do sequenciamento confirmou as espécies *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* e *Morganella* spp. como espécies para os isolados utilizados. Nas condições realizadas, não foi possível estabelecer a especificidade das técnicas PCR-Uniplex e PCR-Multiplex que fossem capazes de determinar as espécies de *Vibrio* spp. estudadas. Portanto, outras abordagens metodológicas ou alterações nos protocolos descritos na literatura devem ser validados para a pesquisa dos microrganismos patogênicos desse gênero.

Palavras-chave: Saúde pública; PCR; Doenças Transmitidas por Alimentos; Segurança de Alimentos.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Vibrio* spp. are common causes of gastroenteritis associated with the consumption of seafood. These pathogens are waterborne and can be transmitted by food, but there are few estimates of them and cases of infection are underdiagnosed. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* are the main species associated with infections in humans. Recent studies have focused on potential environmental factors and reservoirs, however, as they are important risk factors for humans, as agents of disease transmission, especially through food, it is essential to monitor their presence in food. The aim of this study was to verify the specificity of a biomolecular assay for species of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*; isolate suggestive bacteria and confirm the morphological identification suggestive of the species; verify the specificity of a biomolecular PCR assay and determine whether the assay is sufficient for the detection of pathogenic species of *Vibrio* spp. in clandestine animal products and water effluent samples from the Lontra River in Araguaína, Tocantins. 565 isolates suggestive of *Vibrio* spp. were evaluated, of which 103 isolates were confirmed using PCR-Uniplex methodology for *Vibrio* spp. species and, among these, 10 isolates were selected for genetic sequencing of the 16S rRNA gene. The sequencing results confirmed *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* and *Morganella* spp. as species for the isolates used. Under the conditions performed, it was not possible to establish the specificity of the PCR-Uniplex and PCR-Multiplex techniques that were capable of determining the species of *Vibrio* spp. studied. Therefore, other methodological approaches or changes to the protocols described in the literature should be validated for research into pathogenic microorganisms of this genus.

Keywords: Public health; PCR; Foodborne diseases; Food safety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da análise de <i>V. cholerae</i> pelo método APHA 40.61:2015.....	22
Figura 2. Esquema da análise de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> pelos métodos APHA 40.62/40.63:2015.....	23

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
BHI	Brain Heart Infusion
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CC	Ágar Celobiose Colistina
COVIS	Serviço de Informações sobre Cólera e outros Vibrios
DNTP	Desoxirribonucleótidos Trifosfatados
DTA	Doença Transmitida por Alimento
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
<i>et al.</i>	E outros
FDABAM	Bacteriological Analytical Manual
g	Gramma
gDNA	Ácido Desoxirribonucleico Genômico
IAC	Controle de Amplificação Interna
ISO	International Organization for Standardization
ITS	Internal Transcript Spacer
LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por Loop
LPS	Lipopolissacarídeo
m-CPC	Polimixina Colistina Modificado
mg	Miligrama
mmol	Milimol
mPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PCA	Ágar Padrão de Contagem
pmol	Picomol
ppm	Partes Por Milhão
POA	Produto de Origem Animal
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
TCBS	Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
U	Unidade Unificada de Massa Atômica
V	Volt
°C	Graus Célsius

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitros
μm	Micromol
%	Percentual
®	Marca Registrada
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....
2	OBJETIVOS.....
2.1	OBJETIVO GERAL.....
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....
3	REVISÃO DE LITERATURA.....
3.1	<i>Vibrio</i> spp. patogênicos.....
3.1.1	<i>Vibrio cholerae</i>
3.1.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3.1.3	<i>Vibrio vulnificus</i>
3.2	Técnicas de diagnóstico para detecção rápida de espécies de <i>Vibrio</i>.....
3.2.1	Método APHA 40.61:2015 para presença/ausência ou NMP de <i>Vibrio cholerae</i> em alimentos e água.....
3.2.2	Métodos APHA 40.62/40.63:2015 para presença/ausência ou NMP de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i>
3.2.3	Reações em Cadeia da Polimerase.....
3.2.4	Reações em Cadeia da Polimerase <i>Multiplex</i>
3.3	Riscos à saúde pública associados a espécies patogênicas de <i>Vibrio</i> spp.....
	REFERÊNCIAS.....
4	CAPÍTULO II - ARTIGO.....
1.1	INTRODUÇÃO.....
2.1	METODOLOGIA.....
3.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....
4.1	CONCLUSÃO.....
5.1	REFERÊNCIAS.....
5	CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....

1 CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Alimentos produzidos de maneira clandestina podem configurar um risco à saúde do consumidor, pois não possuem garantia da qualidade higiênico sanitária (GRAÇA *et al.*, 2023). Na fabricação de alimentos a água é um importante ponto a ser considerado já que pode ser um veículo de agentes patogênicos caso sua potabilidade não seja observada (NASCIMENTO, 2000).

Entre os patógenos que podem ser disseminados pela água de má qualidade microbiológica estão as bactérias do gênero *Vibrio* spp. (FORSYTHE, 2000). A maioria das bactérias deste gênero não são patogênicas, contudo, algumas espécies como *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são causadoras de doenças em humanos (CANELLAS e LAPORT., 2021).

As bactérias deste gênero causam as doenças chamadas de vibrioses e a cólera, sendo esta uma grave doença diarreica, com altas taxas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento, onde estima-se que ocorram 4 milhões de casos por ano, resultando numa média de 21.000 a 143.000 mortes (WHO, 2020). A doença ainda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente em países onde o agente etiológico *V. cholerae* é endêmico, a densidade populacional é alta, o saneamento é precário e o acesso à água potável é escasso (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018).

Há um aumento global na frequência de vibrioses associada ao consumo de alimentos, embora há estimativas de que as doenças causadas pelas bactérias deste grupo sejam subnotificadas (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018). Enquanto no Brasil, a monitorização da frequência de *Vibrio* spp. está centrada na identificação e notificação de infecções por *V. cholerae*, o que torna mais difícil investigar a ocorrência de infecções por outras espécies (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em território brasileiro não existem muitos registros de surtos por contaminação de alimentos e água causados por bactérias deste gênero. Contudo, em São Luís, no estado do Maranhão, Rodrigues *et al.* (2001) isolaram, em 18% dos pescadores, o agente *V. parahaemolyticus* a partir de amostras de lesões cutâneas existentes nos seus membros inferiores, demonstrando a ocorrência de vibrioses no país.

Quanto à epidemiologia, é possível que os isolados presentes em água fresca sejam fonte de contaminação de produtos clandestinos, possivelmente durante o transporte ou armazenagem, uma vez que tais alimentos não são submetidos à fiscalização e nem possuem a

garantia de boas práticas de fabricação (BPF) (ALMEIDA *et al.*, 2010). Explorar os reservatórios naturais destes patógenos pode fornecer informações importantes acerca da patogênese deles, uma vez que existe o risco de os isolados presentes em alimentos adentrarem o trato intestinal humano causando doenças (STOCCO *et al.*, 2016).

Estudos sobre gastos e impactos econômicos causados por doenças transmitidas por alimentos e água ainda são escassos, mas já demonstraram os danos acarretados como grandes perdas para as indústrias, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000). Quanto ao impacto no âmbito da saúde pública, os números demonstram dados preocupantes, onde o número de surtos causados pelas DTAs e água, entre o período de 2012 a 2022, foram de 6.523 surtos, 12.722 internações hospitalares e 112 óbitos (BRASIL, 2023).

Embora escassas pesquisas indicando a presença de espécies de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos em alimentos e água, casos de doenças causadas por estes microrganismos têm sido amplamente relatados em outras nações (MARTINS *et al.*, 2022).

Contudo, em vista dos dados apresentados, novos estudos realizados com alimentos preparados de maneira clandestina e água podem aprofundar o conhecimento sobre os mesmos como veículos de contaminação de espécies de *Vibrio* spp. e sua distribuição, além de contribuir com informações importantes para o progresso na compreensão da patogenicidade das bactérias do gênero.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Verificar a especificidade de ensaio biomolecular para a identificação de espécies de *Vibrio* spp. em produtos de origem animal clandestinos e em efluentes hídricos do rio Lontra, norte do Tocantins.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias sugestivas de *Vibrio* spp. em amostras de alimentos de origem animal clandestinos e em amostras de água coletada em diferentes pontos do rio Lontra;
- Confirmar a identificação morfológica sugestiva em ensaio de PCR espécie específica para *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, principais relacionadas com doenças de veiculação hídrica e alimentar;
- Verificar a especificidade de ensaio biomolecular para a identificação de espécies de *Vibrio* spp.; e,
- Determinar se o ensaio biomolecular de PCR qualitativa é suficiente para a detecção de espécies patogênicas de *Vibrio* spp.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Vibrio* patogênicos

Os constituintes do gênero *Vibrio*, família Vibrionaceae, são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas e em formato de bastonetes curvos ou retos (ENCICLOPÉDIA BRITANNICA, 2023). São microrganismos que habitam ambiente tipicamente marinho e estuarino, necessitando de cloreto de sódio para o seu crescimento (SILVEIRA *et al.*, 2016).

O gênero é o mais diverso e abundante de bactérias marinhas com mais de 150 espécies descritas, e sua taxonomia está em constante revisão devido à incorporação de análises genotípicas e moleculares, as quais demonstram que o gênero é altamente heterogêneo (FARMER E HICKMAN-BRENNER, 2006).

As espécies de *Vibrio* podem trocar elementos genéticos entre si devido à sua diversidade inerente nos seus ambientes naturais. Este fato ajuda as bactérias a adquirir genes relacionados com a virulência e a resistência aos antibióticos, o que melhora a capacidade de adaptação da bactéria ao seu novo ambiente (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018; CARVALHO, 2021).

Dentre as 20 espécies patogênicas *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus* são as principais causadoras de enfermidades em humanos (CENTRO DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2023). Segundo Silveira (2016) as espécies patogênicas mais comuns são *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* e, portanto, são as espécies de maior importância médica a partir de uma perspectiva de segurança alimentar e saúde pública, ao possuírem potencial epidêmico maior do que os outros membros do gênero *Vibrio* spp. (BREHM *et al.*, 2020).

São microrganismos responsáveis pela maioria das doenças humanas atribuídas à microbiota natural dos ambientes aquáticos e frutos do mar (BOAS, 2018). As infecções causadas por estes patógenos têm distribuição sazonal marcante, com a maioria dos casos ocorrendo durante os meses mais quentes e, de um modo geral, a partir da exposição a água contaminada, bem como o consumo de frutos do mar contaminados crus ou malcozidos (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018).

A sintomatologia das infecções pode progredir de uma simples gastroenterite para um quadro de septicemia, principalmente associadas ao consumo de matérias primas contaminadas ou através da exposição de feridas cutâneas abertas expostas à água ou animais aquáticos contaminados por vibriões (MARKMAN, 2009; ALI *et al.*, 2020).

Embora agências nacionais e internacionais, como o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) reúnam dados epidemiológicos globais sobre esses patógenos, nenhuma estrutura de vigilância sistemática global existe e poucos países individuais dedicaram sistemas de vigilância para *Vibrio* spp. (CENTRO DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2023; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Uma exceção é os Estados Unidos, onde os dados epidemiológicos são coletados sistematicamente desde 1988, através do Serviço de Informações sobre Cólera e outros Vibrios (COVIS) (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018). Este serviço coleta informações como descrições das doenças das pessoas e das condições de saúde subjacentes, consumo recente de frutos do mar, exposição recente a massas de água, entre outras que podem ser utilizadas para o estabelecimento de medidas de monitoramento e controle, a fim de garantir a segurança dos alimentos ao consumidor (CENTRO DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2023).

Até 2020, a RDC 12/2001, a lei brasileira que estabeleceu padrões microbiológicos para alimentos, era a única legislação em que determinava a detecção de *Vibrio*. Nesta legislação era sugerido que refeições prontas para consumo, que contivessem peixe cru ou algo semelhante, deveriam ser verificadas quanto à presença de *V. parahaemolyticus* (BRASIL, 2001).

Ao mesmo tempo, muitas infecções de etiologia idiopática e que são semelhantes as causadas por espécies de *Vibrio* spp. não são reportadas ou investigadas no Brasil, resultando em um cenário carente de informações epidemiológicas mais completas (CANELLAS e LAPORT, 2021).

3.1.1 *Vibrio cholerae*

Desde a antiguidade há relatos de infecções semelhantes à cólera, uma infecção gastrointestinal, e o vibrião colérico foi e tem sido associado a múltiplos surtos epidêmicos

(MARTINS, 2022). Seu agente etiológico, *V. cholerae*, presente tanto em águas salobras como em águas doces, foi originalmente isolado das fezes de doentes pelo médico alemão Robert Koch no final do século XIX (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018).

A doença que é endêmica na Ásia (delta do Ganges, Baía de Bengala), é causada principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados, embora a transmissão de pessoa para pessoa também seja possível apesar de incomum (CENTRO DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2023). Os casos mais graves de cólera podem fazer com que uma pessoa elimine até um litro de fezes por hora, ao ponto de estas se assemelharem a água de arroz e de a desidratarem gravemente (CENTRO DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS, 2023).

As principais medidas preventivas, além da educação sanitária e do saneamento básico, são a fervura ou cloração da água nos locais sem água potável, e a cocção dos alimentos como peixes e frutos do mar (SILVA, 2017).

Após ser ingerido, *V. cholerae* possui mecanismos para perceber as mudanças ocorridas no ambiente, respondendo por meio da ativação de uma série de genes cujos produtos são essenciais para a colonização e o estabelecimento da doença no hospedeiro, incluindo os genes que codificam a toxina da cólera e a toxina correguladora *pili*, entre outros (SILVEIRA *et al.*, 2016).

Existem cerca de 200 sorogrupos distintos de *V. cholerae*, que se distinguem pelo antígeno lipopolissacarídeo (LPS) na sua superfície e pela sua composição química. O sorotipo O1, que tem duas variações biológicas significativas conhecidas como biótipos clássico e El Tor, é responsável pela grande maioria dos casos de cólera (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018).

3.1.2 *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus é um habitante onipresente de áreas costeiras tropicais e temperadas em todo o mundo. Sua epidemiologia se caracteriza por casos esporádicos de infecção ao longo dessas áreas costeiras, maioritariamente associado ao consumo de matérias-primas ou frutos do mar contaminados malcozidos (SILVEIRA *et al.*, 2016).

Todavia, a exposição de feridas a materiais contaminados também pode ocasionar infecção e essa espécie não se espalha por transmissão de pessoa para pessoa ou via fecal-oral

(BAKER-AUSTIN *et al.*, 2016). Refrigeração inadequada ou manutenção dos alimentos contaminados em temperatura favorável à proliferação são as principais causas da doença. A prática de lavar os pescados e frutos do mar com a água do mar são também uma causa de contaminação (SILVA, 2017).

Embora a infecção causada por *V. parahaemolyticus* seja, geralmente, autolimitada, a infecção pode causar septicemia que oferece risco de vida a pessoas com condições médicas específicas, como doença hepática ou distúrbios imunes (SILVA, 2016).

É importante salientar que nem todas as estirpes de *V. parahaemolyticus* são patogênicas e que a diversidade genética é elevada entre elas, tal como acontece com outras espécies do gênero. O gene da hemolisina relacionada com a TDH (*trh*) e o gene da hemolisina direta termoestável (*tdh*), ou uma combinação de ambos, são os marcadores moleculares normalmente utilizados para indicar a patogenicidade e utilizados para identificação da espécie (WANG *et al.*, 2015)

Estudos observaram que estes marcadores estão presentes em 90% dos isolados clínicos, enquanto os isolados ambientais ou alimentares têm uma baixa probabilidade de possuir estes genes, com apenas 1-10% dos isolados a possuindo os marcadores (RAGHUNATH, 2015).

Até o final da década de 1960, os casos das infecções por *V. parahaemolyticus* foram geograficamente restritos ao Japão, mas a partir de 1969, as infecções foram relatadas em regiões de diversas localidades geográficas, incluindo o Atlântico, Pacífico e Estados do Golfo e Havaí, nos Estados Unidos, onde, de acordo com estimativas, existem cerca de 30.000 infecções por ano (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2016).

Durante evento científico na cidade de Fortaleza/Ceará, realizado no período de 17 a 20 de setembro de 2002, ocorreu um surto de gastroenterite aguda entre os participantes. A Secretaria Estadual de Saúde verificou a ocorrência de seis casos com queixa de cólicas abdominais e diarreia aquosa, das quais foram coletadas amostras de fezes e análises laboratoriais demonstraram a presença de *V. parahaemolyticus* em 45% dos casos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Já um estudo realizado no estado de São Paulo indicou que o registro da densidade média de *V. parahaemolyticus*, nos meses de inverno é mais baixo do que nos meses de verão, quando a temperatura da água apresenta temperaturas em torno de 24°C (SILVA, 2016).

A preferência dos vibriões por águas quentes é o que tem suscitado preocupações relativamente às alterações climáticas e à subida do nível do mar. Numerosos estudos relacionaram positivamente grandes surtos com eventos de clima quente, e também

mostraram uma tendência ascendente no número de casos em populações que já foram afetadas (FROELICH e OLIVER, 2013; BAKER-AUSTIN *et al.*, 2016).

3.1.3 *Vibrio vulnificus*

Este patógeno é comum em águas estuarinas e foi isolado de uma variedade de diferentes fontes ambientais, incluindo água do mar, sedimentos e frutos do mar (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018). Ao contrário de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* é um patógeno oportunista, com praticamente todos os casos ocorrendo naqueles com uma doença subjacente (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018).

A bactéria pode ser encontrada em ambientes marinhos onde a temperatura varia entre 9 a 31°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento de 18°C, e salinidade entre 15 a 25 ppm (SILVA, 2016), a salinidade acima de 30 ppm reduz a incidência de *V. vulnificus* independentemente da temperatura da água (RASZL, 2016).

Devido à sua elevada taxa de mortalidade, *V. vulnificus* pode causar vibriose grave, o que exige um diagnóstico rápido e uma terapia antibiótica adequada (SAMPAIO *et al.*, 2022). Os fatores de risco mais comuns são doenças hepáticas, tais como cirrose ou hepatite, diabetes mellitus e doenças malignas (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018). Estudos anteriores apontaram que indivíduos com doença hepática crônica, como cirrose, possuem oitenta vezes mais chances de desenvolver septicemia primária associada a *V. vulnificus* do que aqueles saudáveis (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2016).

Os sintomas iniciais da infecção consistem em febre, mialgia, náuseas e dor abdominal, onde a coagulação intravascular disseminada e as lesões cutâneas bolhosas, particularmente nas extremidades, são sintomas comuns que acompanham o desenvolvimento da sepse (MANDEL *et al.*, 2012).

Uma vez que pode ser difícil distinguir *V. vulnificus* de outros *Vibrio* spp. em meios de cultura, os isolados são normalmente confirmados por reação em cadeia da polimerase. Embora a presença de *V. vulnificus* possa ser verificada utilizando o gene *vvhA*, o mesmo não é capaz de distinguir entre estirpes que podem ser nocivas e não patogênicas (RASZL *et al.*, 2016).

No Brasil, em 2013, foi relatado um caso no estado do Paraná, onde um paciente de 39 anos, do sexo masculino, com colite ulcerativa e colangite esclerosante foi internado para um

transplante hepático eletivo. Antes de ser admitido no hospital, o homem havia passado um dia no litoral. Os sintomas primários de septicemia começaram antes da cirurgia e, apesar de ter sido diagnosticado e tratado, faleceu 32 horas após o aparecimento dos sintomas (FRANÇA *et al.* 2013).

3.2 Técnicas de detecção para espécies de *Vibrio* spp.

O uso de métodos convencionais é de suma importância para identificar patógenos causadores de doenças. Para a identificação e diferenciação de espécies de *Vibrio* spp. podem ser utilizados testes bioquímicos como coloração de Gram, teste da catalase, teste da oxidase, avaliação da fermentação da glicose, entre outros (CANELLAS e LAPORT, 2021).

Os testes sorológicos baseados no antígeno O (constituente do lipopolissacarídeo) também podem ser empregados, especialmente no estudo de *V. cholerae*. Este tipo de teste é de suma importância para estudos epidemiológicos, principalmente desta espécie, que possui mais de 200 sorogrupos, sendo O1 e O139 os associados às pandemias de cólera (CANELLAS e LAPORT, 2021).

Como métodos de identificação e diferenciação baseados nas características fenotípicas em meios de crescimento descritos na literatura, pode ser utilizados os disponíveis na *American Public Health Association* (APHA), descritos na 5ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DE PAOLA & JONES, 2015), para o isolamento ou contagem de vibriões em alimentos e amostras ambientais. Estes testes são baseados, principalmente, na capacidade de crescer em condições alcalinas e na presença de concentrações relativamente altas de sais biliares (DE PAOLA & JONES, 2015).

Para o teste de presença/ausência e a determinação do Número Mais Provável (NMP) é incluída uma etapa de enriquecimento, em que é utilizada a Água Peptonada Alcalina (APA), com pH entre 8,4 e 8,6, tanto para *V. cholerae* como para *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (SILVA *et al.*, 2017). Para a análise de *V. cholerae*, o período de incubação não deve ser muito prolongado, sob o risco de ocorrer um predomínio da microbiota competidora (exceto no caso de alimentos processados ou com população esperada muito baixa, em que a incubação é prolongada por 18- 21h) (SILVA *et al.*, 2017).

Na etapa de diferenciação, o meio de cultura mais amplamente utilizado para o isolamento de *Vibrio* spp. é o Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), um ágar desenvolvido especificamente para o isolamento de espécies de *Vibrio* spp. a partir de amostras tanto de diferentes origens (CANELLAS e LAPORT, 2021). Em geral, o crescimento de *Vibrios* spp. é satisfatório em meios contendo sais biliares, onde se explora a resistência à bile e a capacidade de crescer em condições alcalinas (pH 8,6) como principais características seletivas (SILVA *et al.*, 2017).

Uma característica de diferenciação entre as espécies é a fermentação ou não da sacarose, algumas espécies como *V. alginolyticus* e *V. cholerae* produzem colônias amarelas enquanto outras espécies produzem colônias verdes. O TCBS é utilizado para o isolamento de *V. cholerae* (colônias amarelas) e *V. parahaemolyticus*/*V. vulnificus* (colônias verdes). *V. mimicus*, que é estreitamente relacionado ao *V. cholerae*, pode ser diferenciado no TCBS, pela incapacidade de fermentar a sacarose (SILVA *et al.*, 2017).

Para o isolamento preferencial de *V. vulnificus* são recomendados o Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado (m-CPC) ou o Ágar Celobiose Colistina (CC), que utilizam a fermentação da celobiose a 40°C como característica diferencial. Outras espécies de *Vibrio* spp. e a maioria das cepas de *V. parahaemolyticus* não crescem nesses meios. Devido a isto estes meios são recomendados como segundo meio de plaqueamento para a análise diferencial de *V. cholerae*, pois ajudam a reduzir a interferência de outras espécies (SILVA *et al.*, 2017).

As cepas do biótipo clássico de *V. cholerae*, sensíveis à polimixina, não vão crescer no m-CPC, porém são cepas são muito raras. Uma alternativa de meio de plaqueamento diferencial foi introduzida na 5ª edição do *Compendium*, o CHROMagar Vibrio, desenvolvido por Hara-Kudo *et al.* (2001) para diferenciar *V. parahaemolyticus*.

O uso de “kits” que disponham de uma chave de identificação constantemente atualizada é essencial para o sucesso da identificação. No caso da análise de *V. cholerae* pode ser feita uma seleção inicial das cepas suspeitas com base na capacidade de crescer na ausência de NaCl e na lise das células com desoxicolato de sódio 0,5% (teste do fio) (SILVA *et al.*, 2017).

3.2.1 Método APHA 40.61:2015 para presença/ausência ou NMP de *Vibrio cholerae* em alimentos e água

Neste método da APHA, descrito na 5ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DE PAOLA e JONES, 2015), os alimentos destinados à detecção de vibrios devem ser estocados sob resfriamento moderado (7-10 °C) e analisados entre 24 e 48h após a coleta (SILVA *et al.*, 2017). O esquema da análise de *V. cholerae* pelo método APHA 40.61:2015 encontra-se descrito na Figura 1.

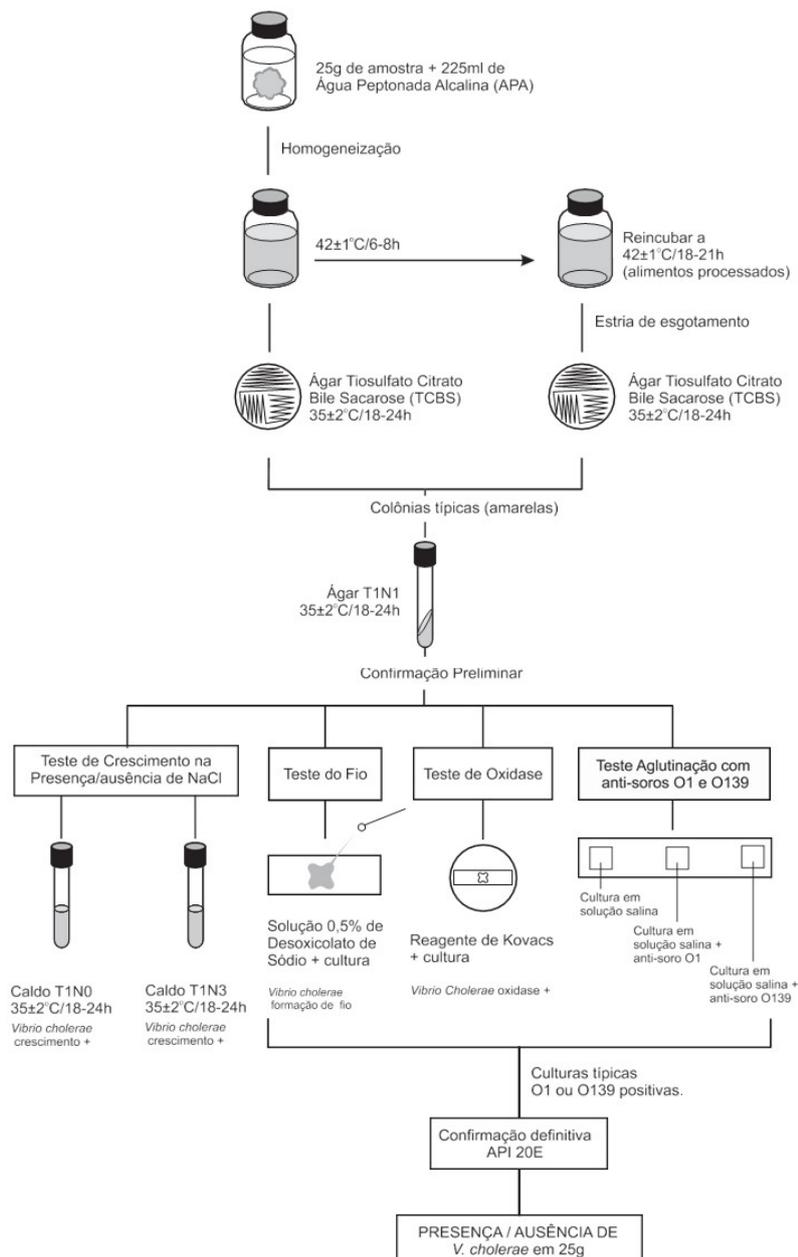


Figura 1. Esquema da análise de *V. cholerae* pelo método APHA 40.61:2015 (DE PAOLA e JONES, 2015). Métodos APHA 40.62/40.63:2015 para presença/ausência ou NMP de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*

Neste método de detecção descrito pela APHA, a estocagem das amostras e os cuidados na realização dos ensaios são os mesmos descritos para *V. cholerae*. O esquema da análise de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* pelos métodos APHA 40.62/40.63:2015 encontra-se descrito na Figura 2.

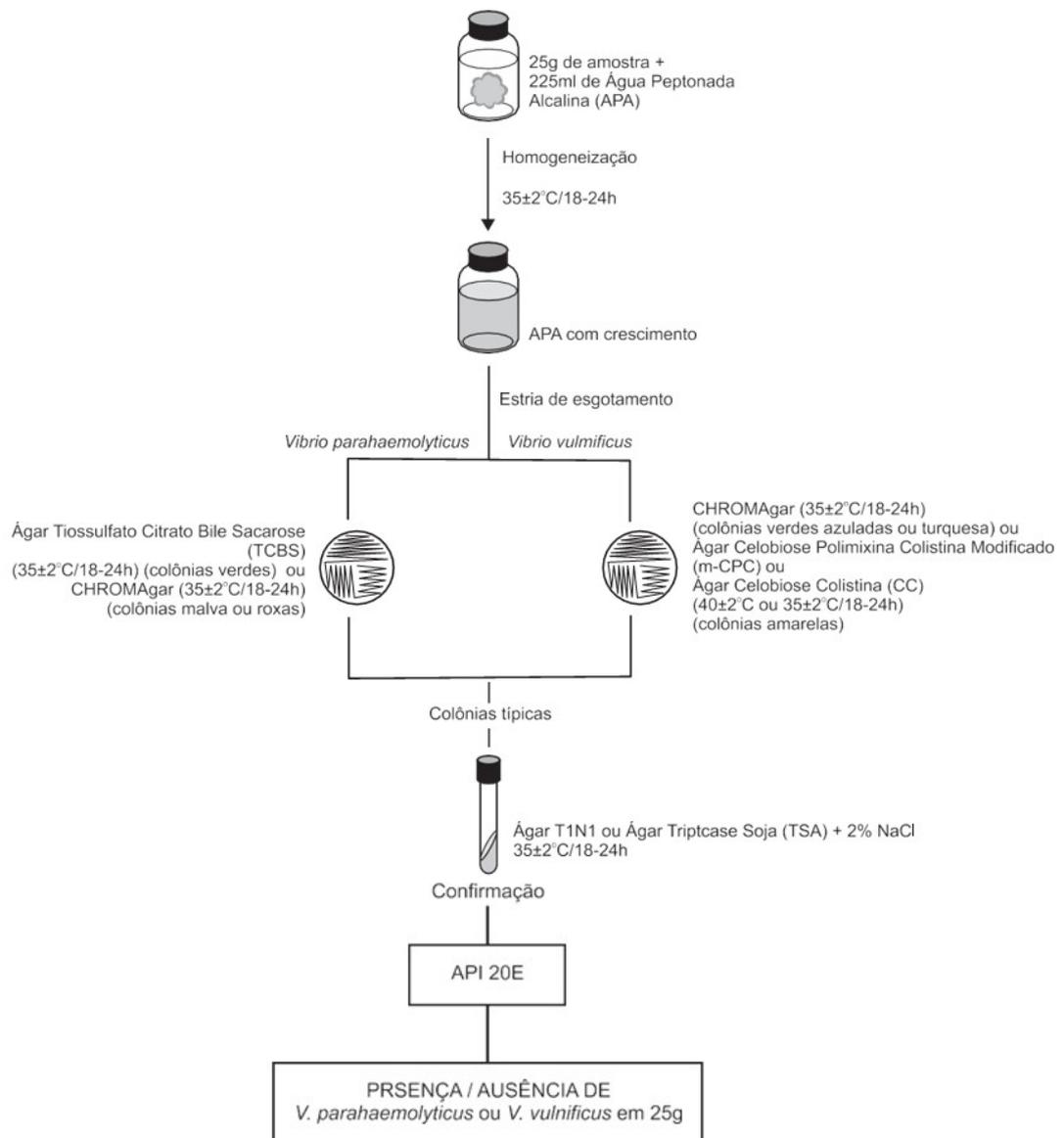


Figura 2. Esquema da análise de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* pelos métodos APHA 40.62/40.63:2015 (DE PAOLA e JONES, 2015).

3.2.2 Reações em Cadeia da Polimerase

A PCR apresenta-se como uma boa alternativa aos métodos convencionais em detecção de patógenos, pois são necessários testes bioquímicos mínimos para obter um número gerenciável de cepas para triagem. O processo é rápido, econômico e pode ser concluído em algumas horas. Desenvolvidos na década de 1980, os ensaios de PCR operam principalmente no reconhecimento de sequências de genes específicos da espécie, seguidos pela amplificação desses ácidos nucleicos usando iniciadores especificamente projetado (KADRI, 2019).

Na PCR, o DNA de fita dupla é primeiro desnaturado em DNA de fita simples em altas temperaturas. Em seguida, ocorre o recozimento dos *primers* direto e reverso específicos para as sequências de genes alvo nas fitas de DNA. Por fim, ocorre a polimerização na qual os *primers* complementares às fitas de DNA são alongados. Este processo requer DNA polimerase termoestável e desoxirribonucleotídeos (KADRI, 2019).

Uma vez concluída a amplificação, os produtos de PCR podem ser visualizados em gel de eletroforese como bandas usando manchas de ácido nucleico. A PCR tem sido amplamente aplicada para confirmar as identidades de patógenos transmitidos por alimentos e para rastrear genes específicos associados à patogenicidade (XU *et al.*, 2017).

Embora os ensaios de PCR tenham sido mais bem-sucedidos na identificação total e/ou cepas patogênicas de *Vibrio* spp. do que os testes de bioquímica convencional, a necessidade de eletroforese em gel de agarose para visualizar e analisar o produto de PCR pode tornar o processo moroso (KADRI, 2019).

Além disso, falha de equipamento, inativação da polimerase DNA e inibidores de PCR presentes nas amostras podem afetar a eficiência da identificação de *Vibrio* spp. Isso pode ser superado usando um controle de amplificação interna (IAC), como 16s rRNA, para evitar resultados falso-negativos e garantir a integridade da PCR (CORTINA, 2015). Para ensaios de PCR, os fatores limitantes são geralmente a pureza da amostra e o tamanho do volume. Também existe a possibilidade de que os ensaios de PCR não sejam uma escolha apropriada de métodos de detecção se o número de cepas patogênicas presentes nas amostras cair abaixo do limite de detecção (WEI *et al.*, 2014).

Uma etapa de pré-enriquecimento em água peptonada alcalina pode ser feita para garantir que uma amostra suficiente esteja presente para facilitar a detecção de *Vibrio* spp. usando ensaios de PCR. Em contrapartida, a PCR oferece sensibilidade e poder de detecção

muito maiores, esta técnica ainda não é a ferramenta preferida em configurações de diagnóstico, pois requer espaço operacional para ajustar instrumentações avançadas que incorrem em altos custos de manutenção e pessoal (WEI *et al.*, 2014).

Quanto à especificidade, geralmente os métodos moleculares, de forma geral, apresentam alta confiabilidade quanto ao alvo (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). A especificidade está relacionada justamente ao primer delineado para a sequência alvo (ZURRON, 2016). No entanto, é possível que os *primers* possam se ligar em outros genes do DNA referência, alterando a sua especificidade. Dessa forma, é fundamental a validação da sensibilidade e especificidade de um conjunto de *primers* gênero e/ou espécie específicos para a determinação da viabilidade de um ensaio (MASCARENHAS, 2017).

3.2.3 Reações em Cadeia da Polimerase *Multiplex*

Ao contrário do PCR convencional, que detecta apenas um gene por vez, PCR-Multiplex detecta vários genes ou espécies simultaneamente, o que oferece grandes benefícios em termos de tempo de análise durante uma triagem em grande escala (LOO *et al.*, 2022).

O princípio central da técnica é baseado na PCR convencional, mas a principal diferença está no número de *primers* usados, em que vários conjuntos de *primers* específicos são utilizados para detectar vários genes de uma só vez. Assim, para produzir um ensaio PCR-Multiplex bem-sucedido, é crucial projetar os mesmos com temperaturas semelhantes (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017).

Além disso, a interação entre vários conjuntos de *primers* em PCR-Multiplex pode ocorrer e resultar em dímeros, levando a produtos de PCR não confiáveis (OLIVEIRA, 2007). Deste modo, as concentrações dos conjuntos de *primers* precisam ser ajustadas para garantir que a reação produza resultados precisos e confiáveis (ZHAO *et al.*, 2014).

3.3 Riscos à saúde pública associados a espécies patogênicas de *Vibrio* spp.

Dada a sua sensibilidade às variações de temperatura e salinidade, a sua elevada reatividade aos estímulos ambientais e os seus curtos tempos de geração, as bactérias do gênero *Vibrio* spp. têm sido propostas como potenciais marcadores dos impactos do aquecimento global, particularmente nas águas costeiras (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2016).

De acordo com esta perspectiva, pode haver uma ligação entre o aumento das temperaturas e o aumento das infecções por *Vibrio* spp. Esta teoria enfatiza o fato de a maioria destas infecções tender a ocorrer durante o verão, quando as pessoas visitam ambientes aquáticos com mais frequência e as temperaturas da água são geralmente mais elevadas (CANELLAS e LAPORT, 2021).

Isto posto, vale ressaltar-se também que a incidência global de doenças transmitidas por alimentos é de difícil estimativa, mas estudos da OMS relatam que as diarreias ainda representam a segunda causa de morte em menores de cinco anos em escala mundial, produzindo cerca de 760.000 mortes por ano (WHO, 2020). Um número considerável desses casos pode ser atribuído à contaminação de alimentos e água potável. Por sua vez, o CDC estima que, a cada ano, cerca de 1 em cada 6 pessoas contraem doenças, são hospitalizadas e morrem devido a doenças transmitidas por alimentos, como é o caso da contaminação por *Vibrio* spp. (SILVEIRA *et al.*, 2016).

Outro problema à saúde pública é o aparecimento de resistência antimicrobiana nos vibriões, que também tem sido mais generalizado a nível mundial, tal como foi registado de forma semelhante em outros grupos bacterianos. A presença de vários elementos genéticos móveis, incluindo *integrons*, elementos de transposição e plasmídeos, que transportam genes de resistência a medicamentos, foi encontrada nas análises do genoma destes microrganismos (DUTTA *et al.*, 2021). Estas descobertas sugerem que a transferência horizontal de genes é um processo altamente dinâmico neste grupo e é muito provavelmente o mecanismo primário pelo qual a resistência antimicrobiana se espalha entre estas bactérias. A propagação destes genes de resistência põe em perigo a saúde pública a nível mundial e reduz a eficácia dos antibióticos atualmente utilizados para tratar estas infecções (DUTTA *et al.*, 2021).

De maneira geral, *Vibrio* spp. tendem a serem sensíveis a maioria dos antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária (SHAW *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2018). Contudo, diversos estudos relatam altas taxas de resistência a amino e carboxipenicilinas por *Vibrio* spp., especialmente *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* (CANELLAS e LAPORT, 2021).

Portanto, estudos voltados para a compreensão do papel de bactérias ambientais como fontes de genes de resistência, bem como para a avaliação da transferência horizontal desses genes no ambiente, tornam-se cada vez mais pertinentes (CANELLAS e LAPORT, 2021).

O consumo de peixes e mariscos aumentou globalmente nos últimos tempos, o que coincidiu com um aumento notável da incidência de vibrioses. Este aumento foi observado principalmente em países que estabeleceram programas de monitorização destas doenças infecciosas. Apesar das estimativas de que as infecções causadas por bactérias deste grupo microbiano são subnotificadas, há um aumento na incidência de vibriose associada a alimentos (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018).

Vibrio spp. é considerado um patógeno emergente devido ao aumento da incidência de infecções esporádicas de origem alimentar e surtos, nos últimos anos, em muitas partes do mundo (TRAORÉ *et al.*, 2016). Neste sentido, os órgãos de fiscalização e de inspeção devem voltar sua atenção para a garantia da qualidade dos produtos associados a estes microrganismos, intensificando ainda mais a observância das práticas de higiene em todas as fases da cadeia produtiva (FOOD SAFETY BRASIL, 2016).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem a função de fiscalizar os estabelecimentos que produzem e comercializam alimentos, a fim de proteger e promover a saúde da população por meio do controle da produção e da distribuição dos mesmos. Deste modo, novos estudos e o levantamento de dados epidemiológicos precisos sobre as DTA são extremamente importantes para a formulação de políticas, estabelecimento de prioridades em saúde pública e alocação de recursos adequados para o controle da segurança alimentar (MARQUES e TRINDADE, 2022).

Apesar da relevância dessas informações nota-se que a incidência de doenças associadas aos alimentos aumenta cada vez mais no país e se estima que um número elevado de casos não é notificado, já que a maior parte dos enfermos com DTA apresenta sintomas leves, não buscando por atendimento médico (MARQUES e TRINDADE, 2022). Em vista disto, estudos realizados indicam que a maior parte dos surtos de diarreia encontra-se relacionado à ingestão de alimentos que possuem boa aparência, sabor e odor normais sem que haja qualquer alteração sensorial aparente (AMORIM, 2019). Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de microrganismos necessária para degradar os alimentos (JUNIOR *et al.*, 2020).

Embora seja impossível impedir completamente que o vibrião entre em contacto com o aos frutos do mar e pescado, é possível abrandar o seu crescimento quando é transportado e armazenado num ambiente frio. Além disso, a utilização de estratégias alternativas, como a

adição de substratos naturais (óleos essenciais, bacteriocinas, entre outros), também poderiam ser utilizadas para prolongar o tempo de vida útil do marisco e inibir agentes patogênicos de origem alimentar patogênicos de origem alimentar (BAPTISTA *et al.*, 2020; BARBOZA *et al.*, 2021).

É concludente que as doenças transmitidas por alimentos contaminados com patógenos de origem alimentar representam um problema significativo de saúde pública. Neste cenário, as empresas de alimentos são responsáveis por desenvolver e implementar programas de segurança alimentar que sejam eficazes no controle de perigos e devem cumprir com os regulamentos atuais de segurança alimentar (BRASIL, 2008).

REFERÊNCIAS

- ALI, A.; PARISI, A.; CONVERSANO, M. C.; IANNACCI, A.; D'EMILIO, F.; MERCURIO, V.; NORMANNO, G. Food-borne bacteria associated with seafoods: a brief review. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, 7, 4-10. 2020.
- ALMEIDA, A.C.; SOUZA, R.M.; PINHO, L.; SOBRINHO, E.M.; SILVA, B.C.M. Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de abates clandestinos e comércio ilegal. **Acta Veterinaria Brasilica**. 4. 278-285. 2010.
- AMORIM, C.C.M; TRINANES, J. A; SALMENLINNA, S.; LÖFDAHL, M.; SIITONEN, A.; TAYLOR, N. G. H; URTAZA, J. M. **Percepção de higiene e segurança de alimentos por consumidores das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/1127251>. Acesso em: 06 out. 2023.
- BAKER-AUSTIN, C. *et al.* Heat wave-associated vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Nature Reviews Disease Primers*, p. 1-19, 2018. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 22, n. 7, p. 1216-1222, jul. 2016.
- BAKER-AUSTIN, C.; OLIVER, J.D.; ALAM, M.; ALI, A.; MATTHEW, K.; WALDOR, M.K. Qadri, F. & Martinez-Urtaza, J. *Vibrio* spp. infections. **Nature Reviews Disease Primers**, 4: 8. 2018.
- BAPTISTA, R. C.; RODRIGUES, H.; SANT'ANA, A. S. Consumption, knowledge, and food safety practices of Brazilian seafood consumers. **Food Research International**, 132, 109084. 2020.
- BARBOZA, G. R.; ALMEIDA, J. M.; SILVA, N. C. C. Use of natural substrates as an alternative for the prevention of microbial contamination in the food industry. **Food Science and Technology**. 2021.
- BOAS, D. M. V. **Qualidade microbiológica da água de consumo e ocorrência de doenças de veiculação hídrica nas mesorregiões do estado da Bahia**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, 2018. Disponível em: <https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7121613>. Acesso em: 06 out. 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 16 ago. 2023.
- BRASIL. Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera. **Ministério da Saúde**. 2008. Disponível em: <https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_colera.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2023.

BREHM, T. T.; BERNEKING, L.; ROHDE, H.; CHISTNER, M.; SCHLICKWEI, C.; SENA MARTINS, M. *et al.* Wound infection with *Vibrio harveyi* following a traumatic leg amputation after a motorboat propeller injury in Mallorca, Spain: a case report and review of literature. **BMC Infect. Dis.** 20, 104, 1–7, 2020.

CANELLAS A. L. B. & LAPORT M. S. The biotechnological potential of *Aeromonas*: a bird's eye view. **Crit Rev Microbiol**, 49(5), 543-555. 2021.

CARVALHO, E. A.; DUARTE, E. A. A.; OLIVEIRA, T. A. S.; BISPO, A. S. R.; MARQUES, V. F.; MATEUS JUNIOR, S.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Perfil fenotípico e genotípico de resistência e virulência de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de água. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, 4(4), 6352–6368, 2021.

Centers for Disease Control and Prevention. 2023. National Cholera and Vibriosis Surveillance: Cholera and Other Vibrio Illness Surveillance (COVIS). Disponível em: <http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera-vibrio-surveillance.html>. Acesso em: 15 ago. 2023.

CORTINA, P. F. **Comparação de metodologias para detecção de *Vibrio* spp. e o efeito no crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* em diferentes condições de armazenamento de ostras (*Crassostrea gigas*)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/169512>. Acesso em: 06 out. 2023.

DE PAOLA, A.; JONES, J. L. *Vibrio*. In: SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M.L. (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 5th ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2015. Chapter 40, p.527-573.

DUTTA, D.; KAUSHIK, A.; KUMAR, D.; Bag, S. Foodborne pathogenic vibrios: antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, 12, 638-331. 2021.

ENICICLOPÉDIA BRITANNICA. The Editors of Encyclopedia. "*Vibrio*". **Encyclopedia Britannica**, 25 Sep. 2023. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/vibrio>. Acesso em: 15 ago. 2023.

FARMER, J.J.; HICKMAN-BRENNER, F.W. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH e Stackebrandt E. *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria*. Volume 6. 3. ed. (Singapura: Springer), p. 508-563. 2006.

FOOD SAFETY BRAZIL. **A importância da microbiologia na cadeia de pescado e seus impactos na segurança de alimentos**. 2016. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/importancia-da-microbiologia-na-cadeia-de-pescado-e-seus-impactos-seguranca-de-alimentos-entrevista-dr-edivaldo-sampaio-universidade-federal-do-mato-grosso/>. Acesso em: 14 ago. 2023.

FORSYTHE, S. J. *et al.* **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 424 p.

FRANÇA, J.; RABONI, S.; SANFELICE, E.; POLIDO, D.; GENTILI, A.; MARQUES, F. *Vibrio vulnificus* infection in Southern Brazil - Case report. **Anais brasileiros de dermatologia**. 2013.

FROELICH, B.; OLIVER, J.D. The interactions of *Vibrio vulnificus* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Microb Ecol*. May;65(4):807-16. 2013.

GRAÇA, B. A.; BARRETO, E. M. & ALE, V. M. M. A importância da certificação sanitária para garantir a segurança alimentar em produtos de origem animal. *Brazilian Journal of Health Review*, 6(2), 6557–6573. 2023.

HARA-KUDO, Y.; NISHINA, T.; NAKAGAWA, H.; KONUMA, H.; HASEGAWA, J.; KUMAGAI, S. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. **Applied and Environmental Microbiology** 67(12):5819-5823. 2001.

JUNIOR, G. A.; ANDRADE, C.; MILANESI, G.; MILANESI, F.; MILANESI, Almir & Silva, Livia & Bezerra, Rodrigo. A relevância do responsável técnico nutricionista na prevenção de surtos alimentares em unidades de alimentação. **Brazilian Journal of Development**, 6(10), 77795–77807, 2020.

KADRI, K. Polymerase Chain Reaction (PCR): **Principle and Applications**: Perspectives on Polymerase Chain Reaction. 2019.

LEE, L. H.; MUTALIB, N. S. A.; LAW, J. W.F.; WONG, S. H.; LETCHUMANAN, V. Discovery on antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor reveals carbapenemase producing *Vibrio parahaemolyticus* in marine and freshwater fish. **Frontiers in Microbiology**. 9: 1–13. 2018.

LOO, K. Y. *et al.* Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio* species. **Aquaculture**, v. 561, 2022.

MANDEL, M. J.; SCHAEFER, A. L.; BRENNAN, C. A. *et al.* Squid-derived chitin oligosaccharides are a chemotactic signal during colonization by *Vibrio fischeri*. **Appl Environ Microbiol**.78:4620–6. 2012.

MARKMAN, C. V. **Caracterização de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras da região costeira do estado de São Paulo, de regiões portuárias brasileiras e de tanques de lastro de navios**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências: Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-16072009-132501/pt-br.php>. Acesso em: 14 ago. 2023.

MARQUES, P. R. C.; TRINDADE, R. V. R. Panorama Epidemiológico Dos Surtos De Doenças Transmitidas por Alimentos entre 2000 e 2021 no Brasil. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, 2022.

MARTINS, V. G. P.; NASCIMENTO, J. S.; MARTINS F. M. S. & VIGODER, H. C. Vibriosis and its impact on microbiological food safety. **Food Science and Technology**. 42. 2022.

MASCARENHAS, D.R. **Validação da técnica de pcr em tempo real (qpcr) para detecção de *mycobacterium bovis* e *brucella abortus* em amostras de leite cru.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/11117>. Acesso em: 14 ago. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento ambiental de *Vibrio cholerae*. 2015. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/svs/19567-monitoramentoambiental-do-Vibrio-cholerae>. Acesso em: 14 ago. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view>. Acesso em 05 de out. 2023.

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em Pauta**, v. 40, p. 22-26, 2000.

OLIVEIRA, R. R. **Padronização e comparação de técnicas de reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção do metapneumovírus humano em secreções respiratórias.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências: Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-05082008-151021/publico/renatodosoliveira.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2023.

OLIVEIRA, W. K.; WADA, M. Y.; LIMA, J. R. C.; PINHEIRO, A. M. C.; BRITO, N. P. B.; ARCANJO, S. R. S. *et al.* Investigação do surto de gastroenterite por *Vibrio parahaemolyticus* em Fortaleza/Ceará, Setembro, 2002. **Bol Eletrôn Epidemiol.** 4:5-7. 2002.

RAGHUNATH P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. **Front. Microbiol.** 5:805. 2015.

RASZL, S. M. ***Vibrio vulnificus* em ostras (*crassostrea gigas*) em Santa Catarina: caracterização genotípica e comparação da eficácia de métodos microbiológicos de detecção.** 2016. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/171718>. Acesso em: 14 ago. 2023.

RODRIGUES, S. M. A.; GONÇALVES, E. G. R.; MELLO, D. M. *et al.* Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa - MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 407-411. 2001.

SAMPAIO, A.; SILVA, V.; POETA, P.; AONOFRIESEI, F. *Vibrio* spp.: Life strategies, ecology, and risks in a changing environment. **Diversity.** 14:1–26. 2022.

SHAW, K. S.; ROSENBERG GOLDSTEIN, R. E.; HE, X.; JACOBS, J. M.; CRUMP, B. C.; SAPKOTA, A. R. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio*

parahaemolyticus recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. **PLoS One**. 9: 1–11. 2014.

SILVA, H. S. **Ocorrência de *vibrio parahaemolyticus* em moluscos bivalves produzidos em Santa Catarina e desenvolvimento de método para quantificação por PCR em tempo real**. 2016. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/168174>. Acesso em: 05 out. 2023.

SILVA, Neusely et al. **Manual de Métodos Microbiológicos de Análise de Alimentos e Água**, 5ª ed, São Paulo: Blucher, 560 p., 2017.

SILVEIRA, D. R. *et al.* Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 83, p. 1-7, 2016.

STOCCO, C. W.; ALMEIDA, L.; BARRETO, E. H.; BITTENCOURT, J. V. M. Controle de qualidade microbiológico no processamento de frigorífico bovino. **Rev Espacios**, 38, 1-14. 2016.

TRAORÉ, S. G. *Risk of Vibrio Transmission Linked to the Consumption of Crustacean in Coastal Towns of Côte d’Ivoire*. **J Food Prot**, v. 75, n. 6, p. 1004-1011, abr. 2016.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 181p. 2017.

XU, Y. G. *et al.* Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay. **Food Control**, 71, 64–70. 2017.

WANG R, Z. Y.; GU, X.; YUAN, J.; SAEED, A. F.; WANG, S. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol.* Mar 5;6:144. 2015.

WEI, S. *et al.* Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 79, p. 115–118. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2020. **Cholera**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cholera#tab=tab_1. Acesso em: 14 de ago. 2023.

ZHAO, X. *et al.* Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 297–312, 2014.

ZURRON, A. C. B. P. **Biologia molecular e biotecnologia**. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A. 224 p. 2016.

4 CAPÍTULO II – ARTIGO¹

Validação de ensaio biomolecular para a pesquisa de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em produtos de origem animal clandestinos e em amostras de efluentes hídricos no norte do Tocantins

RESUMO

Espécies de *Vibrio* spp. são responsáveis por diversas doenças, como a cólera, de importância em saúde pública e ambiental. Estes patógenos possuem veiculação hídrica e também podem ser transmitidas por alimentos, causando sérios danos à sociedade devido ao seu potencial de infectar um grande número de pessoas e em um curto espaço de tempo. A determinação da presença ou ausência de microrganismos patogênicos numa grande variedade de amostras, seja no domínio alimentar, sanitário ou ambiental, tornou-se possível graças à difusão de abordagens baseadas na biologia molecular. Em comparação aos métodos de cultura convencionais, estas metodologias apresentam vantagens, nomeadamente em termos de sensibilidade da análise e de rapidez relativa. Considerando o risco à saúde pública, visto a importância da amplitude das doenças causadas por estes patógenos, objetivou-se neste trabalho verificar a especificidade de ensaio biomolecular para isolados de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* oriundos de produtos de origem animal clandestinos e de amostras de efluentes hídricos do rio Lontra em Araguaína, Tocantins. Foram avaliados 565 isolados sugestivos de *Vibrio* spp., dos quais, 103 isolados foram confirmados utilizando metodologia PCR-Uniplex para espécies de *Vibrio* spp. e, entre estes, selecionados 10 isolados para sequenciamento genético. O resultado do sequenciamento confirmou as espécies *Aeromonas* sp., *Escherichia coli* e *Morganella* sp. como espécies para os isolados utilizados. Nas condições realizadas, não foi possível estabelecer a especificidade das técnicas PCR-Uniplex e PCR-Multiplex que fossem capazes de determinar as espécies de *Vibrio* spp. estudadas.

Palavras-chave: Doenças Transmissíveis por Alimentos; PCR; Saúde pública; Segurança dos Alimentos.

¹ Formatado de acordo com as normas da Revista Semina: Ciências Agrárias

Validation of a biomolecular test for *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in clandestine animal products and in water effluent samples in northern Tocantins

ABSTRACT

Vibrio spp. is responsible for several diseases, such as cholera, of public and environmental health importance. Waterborne and foodborne diseases cause serious harm to society due to their potential to infect large numbers of people in a short time. The presence or absence of pathogenic microorganisms in a wide variety of samples, whether in the food, health or environmental domain, has become possible thanks to the spread of molecular biology-based approaches. Compared to conventional culture methods, these methodologies have advantages, notably in terms of sensitivity of analysis and relative speed. Considering the risk to public health, given the importance of the range of diseases caused by these pathogens, the aim of this project was to verify the specificity of biomolecular assay for *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in clandestine animal products commercialized in northern Tocantins and in water effluents from the Lontra River, in Araguaína. A total of 189 isolates from animal products and 366 isolates from water samples were evaluated. Twenty-five isolates from animal products and 78 isolates from water samples of *Vibrio* spp. were confirmed by uniplex PCR methodology, of which 10 isolates were sequenced. The sequencing result demonstrated the specificity of the biomolecular assays performed, with *Aeromonas* sp., *Escherichia coli* and *Morganella* sp. samples as results. Under the conditions performed these assays could lead to false positive results for *Vibrio* spp.

Keywords: Public health; PCR; Foodborne diseases; Food safety.

INTRODUÇÃO

Vibrio spp. é um diverso gênero de bactérias ubíquas presentes em ambientes aquáticos marinhos e estuarinos ao redor do mundo (Baker-Austin *et al.*, 2018). A maioria das espécies não é patogênica, com as espécies *V. cholera*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* sendo as espécies que causam doenças em seres humanos mais relatadas em resultado a exposição à água contaminada, o consumo de alimentos crus ou malcozidos contaminados por estas espécies (Baker-Austin *et al.*, 2018).

A cólera, uma doença grave doença diarreica que fez parte da formação da história da humanidade, é causada por *V. cholerae* e pode ser fatal se não for tratada (Moura, 2018). As espécies de *Vibrio* que não causam cólera, como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, causam as chamadas vibrioses, doenças de sintomatologia adversa e que representam um risco de vida a indivíduos com doenças subjacentes (Baker-Austin *et al.*, 2018).

O Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) estima que a vibrioses afetam em torno de 80 000 pessoas e resultam em cerca de 100 mortes por ano (Center for Disease Control and Prevention, 2023). No Brasil, não existe um sistema de vigilância ativo para *Vibrio* spp. e poucos estudos realizados no país avaliaram o potencial patogênico destes microrganismos utilizando metodologias moleculares, focando principalmente no isolamento e na identificação de algumas estirpes bacterianas (Martins *et al.*, 2021).

Até 2020, a RDC 12/2001, a lei brasileira que estabeleceu os padrões microbiológicos dos alimentos, sugeria que os alimentos prontos para consumo à base de peixe cru e alimentos comparáveis fossem verificados quanto à presença de *V. parahaemolyticus*, porém esta lei não está mais em vigor e nenhum padrão microbiológico para espécies patogênicas de *Vibrio* spp. existe no país (Brasil, 2001).

Segundo Oliva *et al.* (2016), a existência de genes de virulência em cepas retiradas do ambiente aquático sugere que esse ambiente serve como reservatório de cepas potencialmente virulentas e que podem ser prejudiciais à saúde humana. A propagação destes tipos de genes põe em perigo a saúde pública e podem reduzir a eficácia dos antibióticos atualmente utilizados para tratar estas infecções (Dutta *et al.*, 2021).

A alta diversidade de *Vibrio* spp. dificulta a identificação precisa de espécies isoladas com menor frequência e, portanto, os ensaios fenotípicos e bioquímicos muitas das vezes não são suficientes para a discriminação fidedigna a nível de espécie (Canellas & Laport, 2021).

Uma vez que o consumo de alimentos e exposição à água contaminados por *Vibrio* spp. podem representar um risco para a saúde pública, o presente trabalho verificou a especificidade de ensaio biomolecular para identificação de espécies de *Vibrio* spp.

patogênicas em amostras produtos de origem animal clandestinos e de efluentes hídricos de um rio no norte do estado do Tocantins, determinando se o ensaio biomolecular é suficiente para detecção de espécies patogênicas de *Vibrio* spp. bem como atendendo a demanda pela introdução de novas metodologias na investigação destes microrganismos na região norte do país.

METODOLOGIA

Foram utilizados 565 isolados sugestivos de *Vibrio* spp. obtidos a partir de amostras de produtos de origem animal (POA) coletados no comércio varejista e de rua, e a partir de amostras de água do rio Lontra de Araguaína, região norte do estado do Tocantins, Brasil.

Os isolados oriundos de POA foram obtidos em parceria com outros projetos de pesquisa do Programa de Pós Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) e foram obtidos a partir de amostras de carne moída bovina, linguiça frescal suína, camarão, frango “caipira” e filé de peixe coletadas no comércio varejista e de rua no município de Araguaína, Tocantins.

As amostras de POA foram submetidas à pesquisa qualitativa de *Vibrio* spp. conforme método recomendado pela *American Public Health Association* (APHA), descrito na 5ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (De Paola & Jones, 2015), com modificações na inclusão de ensaio molecular para a confirmação das espécies em isolados sugestivos obtidos nas placas de ágar tiosulfato-citrato-sacarose-sacarose (TCBS). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da UFNT.

Foram obtidos 189 isolados sugestivos *Vibrio* spp. a partir de amostras de POA que foram previamente confirmados por metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex para as espécies de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* spp. conforme protocolo descrito por Izumiya *et al.* (2011).

Entre o período de setembro de 2021 a junho de 2022 foram realizadas cinco coletas de amostras de água superficial em oito diferentes pontos ao longo do rio Lontra. Os pontos de coleta selecionados estão localizados próximos a córregos afluentes ao rio e à região de lançamento de efluente da rede de esgoto municipal, regiões estratégicas de possíveis pontos de contaminação microbiológica. As amostras de água foram analisadas conforme a mesma metodologia descrita para os alimentos.

Posteriormente os isolados de amostras de POA e água foram inoculados em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e purificados em ágar padrão de contagem (PCA). Em

seguida, os isolados purificados foram inoculados em caldo BHI para extração de DNA genômico (gDNA) por fervura simples conforme protocolo descrito por Ribeiro Júnior *et al.* (2016).

No total, 565 isolados sugestivos obtidos foram submetidos a confirmação individual das espécies *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* por PCR-Uniplex conforme metodologia descrita por Izumiya *et al.* (2011).

Para o protocolo de confirmação biomolecular foram aplicados os produtos da extração (≈ 50 ng), 100 nM de cada DNTP, 2,5 μ L de tampão 10x, 75 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 20 pmol L⁻¹ de cada *primer* para a respectiva espécie, 2.5 U de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume final de 25 μ L.

A amplificação foi realizada em termociclador (BioRad) utilizando as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos; seguido de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os produtos então amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados em solução de brometo de etídio a 20 mg L⁻¹ por 20 minutos e documentados sob luz ultravioleta. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram os produtos de amplificação de 160 pb para *V. cholerae*; *V. parahaemolyticus* produtos de 794 pb; e *V. vulnificus* produtos de 373 pb (Izumiya *et al.*, 2011).

Do total de 103 isolados confirmados na PCR-Uniplex, 10 isolados contendo as três espécies foram selecionados e submetidos à amplificação parcial do gene 16S rRNA utilizando os *primers* 27f (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492r (5'- GGYTACCTTGTTACGACTT – 3') (Osborne *et al.*, 2005) para o sequenciamento genético. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e, 1 ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Para sequenciamento de DNA utilizou-se o método de Sanger (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) em ambas as direções. Para tanto, o produto da PCR do gene 16S rRNA, foi submetido à purificação (PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, Invitrogen). A qualidade das sequências do 16S rRNA foi avaliada pelo software BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) e as sequências consensuais foram geradas pelo CAP 3 (Huang e Madan, 1999). A identificação foi realizada pelo *Blast tool* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram confirmadas as espécies de 25 isolados de *Vibrio* spp. por meio da metodologia PCR-Uniplex a partir do total de 189 isolados sugestivos oriundos de amostras de POA que, previamente, foram confirmados para as espécies de *Vibrio* spp. patogênicas por metodologia PCR-Multiplex. Os resultados dos ensaios de confirmação das espécies através das metodologias PCR-Uniplex e PCR-Multiplex estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Resultados dos ensaios PCR-Uniplex e PCR-Multiplex para espécies de *Vibrio* spp. patogênicas em isolados oriundos de amostras de produtos de origem animal e amostras de água na região Norte do estado do Tocantins.

Amostra	Número de isolados sugestivos	<i>V. cholerae</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
		Multiplex	Uniplex	Multiplex	Uniplex	Multiplex	Uniplex
Frango Caipira	8	3	-	1	-	4	3
Peixe	4	2	-	2	-	0	2
Carne Moída	45	30	-	6	-	9	8
Camarão	65	13	-	25	1	17	5
Linguiça Suína	77	29	6	24	-	24	-
Água	366	-	18	-	6	-	54
Total	565	77	24	58	7	54	72

Foram confirmadas, individualmente, as espécies de 78 isolados de *Vibrio* spp. por metodologia PCR-Uniplex a partir do total de 366 isolados sugestivos identificados por espécie fenotipicamente por meio da etapa de isolamento e diferenciação em meio de cultura TCBS.

Pode-se observar uma diminuição na confirmação das espécies de *Vibrio* spp. oriundas de POA por metodologia PCR-Uniplex em relação à metodologia PCR-Multiplex. A PCR-Multiplex pode apresentar várias dificuldades, incluindo baixa sensibilidade ou especificidade e/ou amplificação preferencial de determinados alvos específicos em relação à PCR tradicional (Polz & Cavanaugh, 1998).

Foram confirmadas as espécies do total de 78 isolados sugestivos de *Vibrio* spp. oriundos de amostras de água por PCR-Uniplex, onde 18 isolados foram confirmados para a espécie *V. cholerae*; 6 isolados para *V. parahaemolyticus*; e 54 isolados confirmados para *V. vulnificus*.

O resultado do sequenciamento genético dos 10 isolados escolhidos entre os 25 isolados identificados em amostras de POA e 78 isolados em amostras de água, está identificado da Tabela 2.

Tabela 2 Resultado do sequenciamento genético para espécies de *Vibrio* spp. patogênicas em isolados oriundos de produtos de origem animal e amostras de água na região Norte do estado do Tocantins.

Amostra	Resultado da PCR-Uniplex	Resultado do sequenciamento
Linguiça	<i>V. cholerae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Água	<i>V. cholerae</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
Água	<i>V. cholerae</i>	<i>Morganella</i> spp.
Água	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Morganella</i> spp.
Camarão	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
Camarão	<i>V. vulnificus</i>	<i>Morganella</i> spp.
Carne Moída	<i>V. vulnificus</i>	<i>Morganella</i> spp.
Água	<i>V. vulnificus</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
Água	<i>V. vulnificus</i>	<i>Morganella</i> spp.
Água	<i>V. vulnificus</i>	<i>Morganella</i> spp.

Foi observado que o ensaio molecular delineado, utilizando os *primers* espécie-específicos descritos por Izumiya *et al.* (2011), apresentaram reações inespecíficas com o mesmo tamanho de fragmento esperado para as espécies patogênicas, principalmente no ensaio PCR-Uniplex. O ensaio PCR-Uniplex não confirmou a identificação da maioria dos isolados, enquanto no sequenciamento genético verificou-se que os alvos não foram específicos e nenhum *Vibrio* spp. foi identificado.

As variações nas características bioquímicas entre espécies de *Vibrio* spp. puseram em causa a confiabilidade dos métodos de identificação baseados no fenótipo, que são procedimentos morosos e laboriosos que incluem a identificação microbiológica baseada em culturas para a detecção destes microrganismos (Kim *et al.*, 2015).

Kim e Lee (2014) observaram uma contagem inferior em ágar TCBS em comparação com a PCR em tempo real quando compararam as contagens em placas de ágar TCBS com a soma de três contagens de *Vibrio* spp. obtidas com diferentes conjuntos de primers por PCR em tempo real. No entanto, esta disparidade pode ser explicada pelo fato de, apesar de ser

seletivo para espécies de *Vibrio*, o TCBS pode inibir o crescimento de células bacterianas danificadas devido a agentes seletivos (Oliver *et al.* 1998).

As técnicas de biologia molecular, em particular a PCR, foram desenvolvidas para a detecção e identificação de espécies patogênicas de *Vibrio* nos domínios da microbiologia alimentar e clínica, como alternativa à identificação baseada em culturas. Tais técnicas se mostram de grande valor para vigilância ambiental, especialmente porque *Vibrio* spp. são capazes de permanecer no ambiente em estado “viável, mas não cultivável” como um mecanismo de adaptação, não sendo detectados por métodos convencionais de cultivo, mas sim por estratégias moleculares (Vezzulli *et al.*, 2020).

Um dos impactos da validação de um ensaio biomolecular para espécies de *Vibrio* spp. patogênicas é o de fornecer uma base de dados metodológica, uma vez que utilizando os métodos de referência confiáveis para a detecção destes microrganismos os mesmos não foram suficientes para a detecção fidedigna destes microrganismos, como demonstrado na Tabela 2.

O diagnóstico confiável e fidedigno à realidade de espécies patogênicas do gênero *Vibrio* é crucial. Contudo, o presente estudo é extenso e válido, ao passo que um amplo conjunto de amostras de diferentes fontes foi utilizado seguindo as metodologias propostas na literatura, além de importante pois fornece uma base de dados metodológicos para estudos futuros na pesquisa de espécies de *Vibrio* spp. na região norte do país.

CONCLUSÃO

O isolamento e identificação das espécies de *Vibrio* spp., nas condições realizadas, não foram específicos através do semeio em ágar TCBS. O isolamento e identificação fenotípica é frequentemente utilizado para a confirmação de *Vibrio* spp. patogênicos, entretanto os resultados deste estudo demonstram que tal identificação poderia levar a resultados falso positivos para *Vibrio* spp. em amostras de POA clandestinos e em amostras de água e novos meios de cultura, de marca diferente, devem ser utilizados em pesquisas posteriores.

Os protocolos de PCR Multiplex e Uniplex utilizados, nas condições apresentadas, não foram específicos e sensíveis o suficiente para a correta identificação das espécies patogênicas de *Vibrio* spp. a partir dos isolados obtidos em amostras de POA e em amostras de água. A adequação das reações PCR através de alterações no protocolo é frequentemente realizada, adicionando ou subtraindo conjuntos de *primers* iniciadores ao método de acordo com a disponibilidade de sequências genômicas para melhor detecção nos ensaios. Entretanto essas

alterações por si só não são capazes de garantir verdadeiros positivos e estudos posteriores devem ser realizados.

Contudo, são necessários novos estudos para validar a pesquisa de *Vibrio* spp. patogênicos em alimentos e água, de forma a criar uma ferramenta rápida de identificação desses micro-organismos para o monitoramento da segurança dos alimentos e da água.

REFERÊNCIAS

Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Matthew, K., Waldor, M.K., Qadri, F. & Martinez-Urtaza, J (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nat Rev Dis Primers* 4, 1–19. doi: 10.1038/s41572-018-0005-8

Brasil, RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. (2001). Estabelece Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasil.

Canellas A. L. B. & Laport M. S. (2022). The biotechnological potential of *Aeromonas*: a bird's eye view. *Crit Rev Microbiol*, 49(5), 543-555. doi: 10.1080/1040841X.2022.2083940

Centers for Disease Control and Prevention. (2023). National Cholera and Vibriosis Surveillance: Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance (COVIS).

<http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/choleravibrio-surveillance.html>

Dutta, D., Kaushik, A., Kumar, D. & Bag, S. (2021). Foodborne pathogenic vibrios: antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 12, 638-331.

doi.org/10.3389/fmicb.2021.638331. PMID:34276582.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Huang, X. & Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*., 9 (9): 868-877.

Izumiya, H., Matsumoto, K., Yahiro S., Lee, J., Morita, M., Yamamoto, S., Arakawa, E. & Kim J.Y. & Lee J.L. (2014). Multipurpose assessment for the quantification of *Vibrio* spp. and total bacteria in fish and seawater using multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Sci Food Agric*. 94:2807–2817. doi: 10.1002/jsfa.6699

Kim, H.J., Ryu, J.O., Lee, S.Y., Kim, E.S. & Kim, H.Y. (2015). Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiol*. 15, 239. doi.org/10.1186/s12866-015-0577-3

- Martins, V. G. P., Nascimento, J. S., Martins F. M. S. & Vigoder, H. C. (2021). Vibriosis and its impact on microbiological food safety. *Food Science and Technology*. 42. doi: 10.1590/fst.65321
- Moura, J. G. L., Gemelli, T., & Muller, J. (2018). *Vibrio cholerae*: doença, manifestações clínicas e microbiologia. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 8(4), 483-488. doi: 10.17058/reci.v8i4.11290
- Oliva, M. S., Bronzato, G. F., Soares, L. C., Pereira, I. A., Pribul, B. R., Souza, M. A. S., Coelho, S. M. O., Coelho, I. S., Rodrigues, D. P., & Souza, M. M. S. (2016). Detection of virulence and antibiotic resistance genes in environmental strains of *Vibrio* spp. from mussels along the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *African Journal of Microbiological Research*, 10(24), 906-913. doi: 10.5897/AJMR2015.7636
- Oliver, J. D., Nilsson, L. & Kjelleberg, S. (1998). Formation of nonculturable *V. vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:2640–2644. doi: 10.1128/aem.57.9.2640-2644.1991
- Osborne, C. A., Galic, M., Sangwan, P. & Janssen, P. H. (2005). PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*. 248-2. pg. 183–187. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.043
- Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol*, 64(10), 3724-30. doi: 10.1128/AEM.64.10.3724-3730
- Ribeiro Júnior, J. C., Tamanini, R., Soares, B. F., Oliveira, A. M., Silva, F. G., Silva, F. F., Augusto, N. A. & Beloti, V. (2016). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina Ciências Agrárias*, v. 7, p. 3069–3078. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069
- Silva, N., Junqueira, V. C. M., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., Okazaki M. M. (2017). *Manual de Métodos Microbiológicos de Análise de Alimentos e Água*, 5ª ed, São Paulo: Blucher, 560 p.
- Vezzulli L., Baker-Austin C., Kirschner A., Pruzzo C. & Martinez-Urtaza J. (2020). Global emergence of environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* infections linked with climate change: a neglected research field?. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4342–4355. doi: 10.1111/1462-2920.15040

5 CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resultado do sequenciamento genético demonstrou que os ensaios realizados não conseguiram ser específicos para detecção de *Vibrio* spp. A inespecificidade pode ser constatada na diferente quantidade de isolados confirmados entre as duas metodologias de PCR. Sendo assim, novos testes de identificação e isolamento de espécies patogênicas de *Vibrio* spp. devem ser utilizados, alterando-se a metodologia utilizada para incluir novos meios de cultivo ou métodos mais acurados de detecção a nível fenotípico.

Também devem ser adaptados ou incluídos novos protocolos biomoleculares para a pesquisa de *Vibrio* spp., utilizando diferentes condições das utilizadas como novos *primers*, uma vez que os utilizados na pesquisa apresentaram inespecificidade para espécies de *Vibrio* spp.

Estudos futuros poderão centrar-se na melhoria dos métodos de detecção, visando a detecção simples, rápida e acurada das espécies de *Vibrio* spp. Assim, espera-se que a eficiente detecção ajude a reduzir o risco associado à detecção tardia de fontes de infecção e também ajude a compreensão da ecologia natural e da evolução dos agentes patogênicos de *Vibrio* spp.

A fiscalização também é necessária a fim de eliminar os riscos para a saúde pública associados ao consumo de produtos de origem animal não inspecionados. Contudo, o desenvolvimento de novas tecnologias é muito importante para melhorar a detecção de espécies de *Vibrio* spp.