NADIA CATALINA ALFONSO VARGAS

CARACTERIZAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Vibrio cholerae* EM
AMOSTRAS DE ÁGUA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/ IPT, para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2017

NADIA CATALINA ALFONSO VARGAS

CARACTERIZAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Vibrio cholerae* EM
AMOSTRAS DE ÁGUA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg

Orientadora: Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*)

Co-orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araujo

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Alfonso Vargas, Nadia Catalina

Caracterização, detecção e quantificação de *Vibrio cholerae* em amostras de água / Nadia Catalina

Alfonso Vargas; orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Clara

Guerrini Schenberg ; coorientador Prof. Dr.

Wellington Luiz de Araujo. -- São Paulo, 2017.

157 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Vibrio cholerae*. 2. Antibiógrama. 3. PCR em
Tempo Real. 4. Genes associados à virulência. 5.
Análise de sequências multilocus. I. Guerrini
Schenberg , Prof^a. Dr^a. Ana Clara , orientador. II.
de Araujo, Prof. Dr. Wellington Luiz , coorientador.
III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Nadia Catalina Alfonso Vargas

Título da Tese: Caracterização, detecção e quantificação de *Vibrio cholerae*
em amostras de água

Orientadora: Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg

Co-orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araujo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura.....
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura.....
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura.....
Nome:
Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.002.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção **CEP-ICB nº 521/2012**, de 18/04/2012, e por solicitação do Prof. Dr. *Wellington Luiz de Araújo*, do departamento de Microbiologia, co-orientador do projeto, informo que o título do projeto de doutorado da aluna *Nadia Catalina Alfonso Vargas* foi alterado para "**Caracterização, detecção e quantificação de *Vibrio cholerae* em amostras de água**" visto que o projeto inicial teve algumas modificações, sendo: avaliação somente da bactéria *V. cholerae* e experimento utilizando a lagarta *Galleria mellonella*, conforme descrição metodológica.

São Paulo, 20 de março de 2017.

Prof. Dra. **Camila Squarzoní Dale**
Coordenadora 3 da CEP SH-ICB/USP

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da CEUA-ICB/USP

Dedico a ...

A Deus por ser minha fortaleza e meu refúgio. Por me iluminar nos momentos mais escuros, por dar sentido à minha vida e encher minha alma de paz e confiança.

À Doutora Maria Luisa Piraquive por ser exemplo de valores e virtudes. Por me ensinar o que realmente é importante na vida e qual é o caminho para atingir essa meta.

A minha família pelo amor, apoio incondicional, por sempre me motivar a seguir em frente e por ser exemplo de amor, paciência, trabalho, entrega e fortaleza.

À Professora Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*) que dedicou a sua vida ao estudo dos vibrios e que, tristemente, não pode ver a conclusão desta Tese, mas que acompanhou cada uma das etapas do trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o meu Orientador por excelência.

Aos meus pais Alvaro Alfonso e Deyanira Vargas por seu apoio e amor incondicional, por me ensinar a lutar e enfrentar a vida com amor, valor e responsabilidade. Aos meus irmãos Silvia, Alvaro e Pilar, pelo companheirismo e paciência em todos os momentos. Aos meus familiares e amigos pela torcida constante e carinho. Muito obrigada!!!

À Professora Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera, quero agradecer do mais profundo do meu coração pela oportunidade oferecida, pelas portas sempre abertas da sua casa e sua vida, pela dedicação como orientadora deste trabalho. Muito obrigada pela amizade e por todos os ensinamentos transmitidos a nível acadêmico e pessoal. Muita Saudade!!!

À Professora Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg, por toda sua atenção, gentileza, pelo apoio, clareza, sinceridade para o desenvolvimento da pesquisa, por ter as portas sempre abertas ao dialogo e pela orientação neste trabalho.

Ao Professor Dr. Welington Luiz de Araujo, por toda sua atenção, pelo apoio, clareza, sinceridade para o desenvolvimento da pesquisa, por ter as portas sempre abertas ao dialogo e pela orientação neste trabalho.

Ao Professor Dr. Gabriel Padilla, pelo apoio e respaldo nos momentos mais oportunos.

Ao Flávio Augusto Cardozo, pela amizade, muito obrigada pelo apoio, orientação pela paciência principalmente, pelos almoços brasileiros, e por me incluir no seu seletto grupo de amigos. Obrigada por tudo!

À Zita Maria de Oliveira Gregório, pela amizade, por compartilhar comigo as suas experiências de vida, por ser essa ajuda constante e por cada um dos ensinamentos estarei por sempre agradecida.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana - LABMEM - 136 e aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular/ Laboratório Quimioterapia Antifúngica - 150, pela convivência e amizade, pelas dicas oferecidas em cada uma das etapas deste trabalho, pelo apoio e por compartilhar comigo cada um desses cafezinhos, que faziam mais alegre ainda o dia.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer, Dra. Elisabete José Vicente e Dra. Maria Regina Lorenzetti pelas importantes sugestões.

A Alvaro Camacho, Stephany Hernandez pela amizade e valiosas orientações. A Penelope, Yiscelys, Katherine, Viky, Paola, Sofia, Marcela, Carolina, Cielo, Angélica, Glória, Tatiana, Debora, William, Christian, Joel, Juan e a todos aqueles que não mencionei aqui, mas que com sua amizade e carinho incentivaram o desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada!!

As funcionárias Fábica e Eliane da secretaria de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela atenção e suporte fornecido nos momentos em que precisei.

Ao Brasil, à Universidade de São Paulo - USP e ao Instituto de Ciências Biomédicas - ICB, por me acolher nestes cinco anos. Também, pela oportunidade de aprender numa das melhores universidades do mundo, pela sua ótima qualidade a nível acadêmico e de recursos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES,
pela concessão da bolsa de doutorado direto.

Agradeço à FAPESP, pelo apoio no desenvolvimento do projeto: Caracterização de *Vibrios* isolados de ecossistemas costeiros, com ênfase na quantificação de *V. cholerae*.

Processo FAFESP N°: 2013/09186-0.

RESUMO

ALFONSO VARGAS, N. C. **Caracterização, detecção e quantificação de *Vibrio cholerae* em amostras de água**. 2017. 157 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Vibrio cholerae é um micro-organismo autóctone em ecossistemas aquáticos e pode ser encontrada vivendo livremente na água ou em associação com outros organismos. Esta espécie pode causar a cólera, um dos principais problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento e algumas cepas, tais como *V. cholerae* O1 e O139 toxigênicas, têm sido associadas a epidemias e surtos pandêmicos. Os sorotipos não-O1/não-O139 estão associados às gastroenterites esporádicas e os demais sorogrupos podem causar pequenos surtos de diarreia, além de outras doenças extraintestinais, como septicemia, cistite e celulite. Os principais fatores responsáveis pela virulência e indução da diarreia e desidratação são as toxinas colérica (CT) e correguladora do pilus (TCP). No entanto, existem outros fatores de virulência que podem contribuir com a patogenicidade do micro-organismo. Esses fatores podem ser influenciados por fatores genéticos e ambientais e contribuir para o desenvolvimento de novas estirpes patogênicas. Assim, considerando a importância e necessidade de conhecer, monitorar e controlar *V. cholerae*, o presente estudo tem como objetivo caracterizar isolados selecionados desta espécie, originários de ambiente aquático e padronizar uma metodologia para detectar e quantificar *V. cholerae* em amostras de água. Isolados da família *Vibrionaceae* pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram inicialmente avaliados por metodologias clássicas. Os isolados, caracterizados como presuntivos *V. cholerae*, foram avaliados por *Multilocus sequence analysis* (MLSA), utilizando sete *housekeeping genes* (*adk*, *gyrB*, *metE*, *purM*, *pyrC*, *mdh* e *pntA*), para confirmação da espécie. Além disso, foi avaliada nestes isolados a presença de cinco genes associados à virulência (*wbe* O1, *wbe* O139, *ctxA*, *tcpA* e NAG-ST (*st/sto*), a susceptibilidade a antibióticos e a patogenicidade de cinco isolados selecionados em modelo invertebrado animal. Três marcadores moleculares foram avaliados para a detecção e quantificação de *V. cholerae*, dois específicos para identificação de espécie (*purM* e *pntA*) e um associado a um fator de virulência (*ctxAB*), por meio de PCR convencional e PCR em Tempo Real. Observou-se que 70 dos isolados pertenciam à espécie *V. cholerae* pelo sequenciamento dos *housekeeping genes* utilizados. Os isolados mostraram uma variação na prevalência dos genes associados à virulência e ao perfil de susceptibilidade aos antibióticos. No entanto, não foi observada correlação entre a presença dos fatores de virulência dos isolados e a susceptibilidade do modelo invertebrado animal, mas sim, uma influência da concentração do inóculo e da temperatura de incubação. Os marcadores moleculares selecionados mostraram que é viável detectar e quantificar *V. cholerae* por meio de PCR em Tempo Real com os genes *purM* e *ctxAB*, uma vez que apresentaram uma adequada especificidade e sensibilidade.

Palavras-chave: *Vibrio cholerae*. Antibiógrama. PCR em Tempo Real. Genes associados à virulência. Análise de sequências multilocus. *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

ALFONSO VARGAS, N. C. **Characterization, detection and quantification of *Vibrio cholerae* in water samples**. 2017. 157 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Vibrio cholerae is an autochthonous micro-organism in aquatic ecosystems and can be found free living in water or in association with other organisms. This species can cause cholera, one of the major public health problems in developing countries, and some strains, such as toxigenic *V. cholerae* O1 and O139, have been associated with epidemics and pandemic outbreaks. Non-O1/non-O139 serotypes are associated with sporadic gastroenteritis and other serogroups may cause small outbreaks of diarrhea, as well as other extra-intestinal diseases such as septicemia, cystitis and cellulitis. The main factors responsible for the virulence and induction of diarrhea and dehydration are the cholera toxin (CT) and the toxin coregulated pilus (TCP). However, there are other virulence factors that may contribute to the pathogenicity of the micro-organism. These factors can be influenced by genetic and environmental factors and contribute to the development of new pathogenic strains. Therefore, considering the importance and necessity of knowing, monitoring and controlling *V. cholerae*, the present study aims to characterize selected isolates of this species originating from aquatic environment and to standardize a methodology to detect and quantify *V. cholerae* in water samples. Isolates of the *Vibrionaceae* family belonging to the collection of the Laboratory of Environmental Microbiology and Microbial Molecular Ecology of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo were initially evaluated by classical methodologies. The isolates characterized as presumptive *V. cholerae* were evaluated by Multilocus sequence analysis (MLSA), using seven housekeeping genes (*adhA*, *gyrB*, *metE*, *purM*, *pyrC*, *mdh*, and *pntA*) for species confirmation. In addition, the presence of five virulence-associated genes (*wbe* O1, *wbe* O139, *ctxA*, *tcpA* and NAG-ST (*stx*/*stx2*)), the antibiotics susceptibility and the pathogenicity in invertebrate animal model were evaluated. Three molecular markers were evaluated, two for species identification (*purM* and *pntA*), and one associated with a virulence factor (*ctxAB*), by conventional PCR and Real-time PCR. Upon sequencing of the used housekeeping genes, 70 isolates were found to belong to the species *V. cholerae*. The isolates showed a variation in the prevalence of virulence-associated genes and in their susceptibility profile to antibiotics. However, no correlation was found between the presence of the virulence factors of the isolates and the susceptibility in the invertebrate animal model; rather there was an influence of the inoculum concentration and the incubation temperature in this model. The selected molecular markers showed that it is feasible to detect and quantify *V. cholerae* by Real-time PCR, with the *purM* and *ctxAB* genes, since they presented an adequate specificity and sensitivity.

Keywords: *Vibrio cholerae*. Antibigram. Real Time PCR. Factors associated with virulence Multilocus sequence analysis. *Galleria mellonella*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(+) – Presença
(-) – Ausência
°C – Grau centígrado (s)
< - Menor que
> - Maior que
≥ - Maior ou igual
% - Porcentagem
μL – Microlitro
μM - Micromolar
AD - Água doce
AMP – Ampicilina
AS - Água salgada
ASS - Sedimento
ATCC – “American Type Culture Collection”
BAM – “Bacteriological Analytical Manual”
CECOM - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico
CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIP – Ciprofloxacina
CLO – Cloranfenicol
CLSI – “Clinical Laboratory Standards Institute”
CT – Toxina Colérica
CTX - Cefotaxima
ctxA - Subunidade A da Toxina Colérica
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA – Ácido etileno-diamino tetracético
FAO – “Food and Agriculture Organization”
FDA – “Federal and Drug Administration”
FIOCRUZ - Laboratório de Micro-organismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz
g – Gravidade
IAL - Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz
Km – Quilômetro (s)
Km² - Quilômetros Quadrados
Kb – Kilobase (s)
M – Marcador
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mL – Mililitro
MLSA - Análise de Sequências Multilocus
mM - Milimolar
n – Número de Isolados
n° - número
NaCl – Cloreto de Sódio
NCBI – “National Center for Biotechnology Information”
NAG - Enterotoxina Termoestável de *Vibrio cholerae* Não Aglutinável

NAL - Ácido Nalidíxico

ng – Nanograma

nt - Nucleotídeos

ORF - Associado à biossíntese de lipopolissacarídeos (específico para o sorogrupo O139)

pb – Pares de Base

PBS - Solução Fisiológica Tampão Fosfato

PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

R – Resistente (s)

RNA – Ácido Ribonucléico

rRNA – RNA ribossomal

T – Temperatura

TAE – Tampão Tris-Acetato EDTA

TCBS - Tiosulfato Citrato Bile Sacarose

TCP - Toxina Correguladora do Pilus

tcpA - fator de colonização correulado com a toxina colérica

TET - Tetraciclina

TRI - Trimetoprima

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

USP – Universidade de São Paulo

V - Volt

VBNC – Viável Mas Não Cultivável

wbe - Gene que participam na biossíntese do antígeno O

WHO – “World Health Organization”

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - EVENTOS EVOLUTIVOS DA EPIDEMIOLOGIA DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	23 23 23
FIGURA 2 - CASOS DE CÓLERA RELATADOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE ENTRE OS ANOS 1989 E 2015.	24 24 24
FIGURA 3 - ESTRUTURA DO CTX-PHI, ELEMENTOS RS1 E RS2 EM DIFERENTES VARIEDADES DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> SOROTIPO O1 ..	29 29 29
FIGURA 4 - INSTRUMENTO E METODOLOGIA DE INFECÇÃO DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> COM ISOLADOS DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	71 71 71
FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CONCATENADAS DOS GENES <i>ADK</i> , <i>GYRB</i> , <i>MET E</i> , <i>PURM</i> , <i>PYRC</i> , <i>MDH</i> , <i>PNTA</i> DOS ISOLADOS DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> DE ORIGEM AMBIENTAL COM AS SEQUÊNCIAS DISPONÍVEIS NO NCBI E NA BASE DE DADOS DO MLST DE <i>V. CHOLERAE</i>	76 76 76
FIGURA 6 - ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> INFECTADA COM <i>VIBRIO CHOLERAE</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES A 37 °C DE TEMPERATURA.....	79 79 79
FIGURA 7 - ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> INFECTADA COM CINCO ISOLADOS DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> A 37 °C DE TEMPERATURA.	80 80 80
FIGURA 8 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO NA PATOGENICIDADE DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> ISOLADOS NC06 E NC88 EM <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	81 81 81
FIGURA 9 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO NA PATOGENICIDADE DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> ISOLADO NC88 EM <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	82 82 82
FIGURA 10 - PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS (EM PORCENTAGEM) DOS ISOLADOS SELECIONADOS DE <i>VIBRIO</i> <i>CHOLERAE</i>	84 84 84
FIGURA 11 - PONTOS DE COLETA NO ESTADO DE SÃO PAULO SELECIONADOS.	130 130 130
FIGURA 12 - PONTOS DE COLETA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO SELECIONADOS.	131 131 131
FIGURA 13 - SENSIBILIDADE DA DETECÇÃO DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> ATCC 14035 POR PCR EM TEMPO REAL.....	133 133 133
FIGURA 14 - PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL DOS FRAGMENTOS DOS GENES <i>PURM</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	135 135 135

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RELAÇÃO DOS ISOLADOS INCLUÍDOS NO ESTUDO.	68 68
TABELA 2 - ISOLADOS DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> SELECIONADOS PARA AVALIAR A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	72 72
TABELA 3 - PORCENTAGEM DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS DOS <i>HOUSEKEEPING GENES</i> AVALIADOS COM AS SEQUÊNCIAS DISPONIBILIZADAS DAS BASES DE DADOS DO GENBANK E DO MLST.	75 75
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	77 77
TABELA 5 - GENÓTIPOS DE VIRULÊNCIA REPRESENTATIVOS EM ISOLADOS DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	78 78
TABELA 6 - ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS DESENHADOS NESTE ESTUDO PARA DETECÇÃO DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).	132 132
TABELA 7 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS COLETAS NO RIO DE JANEIRO E SÃO PAULO.	134 134

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 - FÓRMULA UTILIZADA PARA O DESENVOLVIMENTO DA CURVA PADRÃO.	129 129
--	-------------------------------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1818
2 REVISÃO DE LITERATURA	2020
2.1 TAXONOMIA, OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>VIBRIO</i>	2020
2.2 HISTÓRICO DA CÓLERA.....	2222
2.3 ECOLOGIA DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	2525
2.4 PATOGENICIDADE, GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	
2727	
2.5 MONITORAMENTO E DETECÇÃO DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	3333
REFERÊNCIAS	3838
3 OBJETIVOS	6363
3.1 OBJETIVO GERAL	6363
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6363
4 CAPÍTULO 1 - UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS CLÁSSICAS E MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DA FAMÍLIA <i>Vibrionaceae</i> DE AMBIENTES AQUÁTICOS NO BRASIL.	6464
4.1.1 Introdução	6565
4.1.2 Materiais e métodos	6767
4.1.2.1 Cultivo e identificação presuntiva utilizando métodos tradicionais.....	6767
4.1.2.2 Confirmação de <i>V. cholerae</i> por métodos moleculares	6868
4.1.2.3 Detecção de genes associados à virulência em <i>V. cholerae</i> por meio de PCR.....	6969
4.1.2.3.1 Avaliação da virulência de isolados selecionados de <i>V. cholerae</i> em modelo invertebrado de <i>Galleria mellonella</i>	7070
4.1.2.3.1.1 Criação de <i>G. mellonella</i>	7070
4.1.2.3.1.2 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>V. cholerae</i>	7070
4.1.2.3.1.3 Susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção experimental por cinco isolados de <i>V. cholerae</i> caracterizados por métodos moleculares com a presença/ausência de fragmentos de genes associados à virulência (Curva de sobrevivência).	7171
4.1.2.3.1.4 Influência da temperatura e concentração na patogenicidade de <i>V. cholerae</i> em <i>G.mellonella</i>	7272
4.1.2.3.2 Teste de susceptibilidade aos antibióticos	
7272	
4.1.2.4 Análise dos Resultados	7373
4.1.2.4.1 Análise das sequências dos genes conservados (housekeeping).....	
7373	
4.1.2.4.2 Análises da avaliação da virulência de isolados selecionados de <i>V. cholerae</i> em modelo invertebrado de <i>G. mellonella</i>	7373
4.1.3 Resultados	7474
4.1.3.1 Cultivo e identificação presuntiva utilizando métodos tradicionais.....	7474
4.1.3.2 Confirmação de <i>V. cholerae</i> utilizando métodos moleculares	7474
4.1.3.3 Detecção por PCR de genes associados à virulência em <i>V. cholerae</i>	7777
4.1.3.3.1 Avaliação da virulência de isolados selecionados de <i>V. cholerae</i> em modelo invertebrado de <i>G. mellonella</i>	
7878	
4.1.3.3.1.1 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>V. cholerae</i>	7878
4.1.3.3.1.2 Susceptibilidade à infecção experimental de <i>G. mellonella</i> por cinco isolados de <i>V. cholerae</i> caracterizados por métodos moleculares com a presença/ausência de fragmentos de genes associados à virulência (Curva de sobrevivência).	7979
4.1.3.3.1.3 Influência da temperatura e concentração na patogenicidade de <i>V. cholerae</i> em <i>G. mellonella</i>	8080

4.1.3.3.2 Teste de Susceptibilidade aos antibióticos	8383
4.1.4 Discussão	8585
4.1.4.1 Cultivo e identificação presuntiva	8585
4.1.4.2 Confirmação de <i>V. cholerae</i> utilizando métodos moleculares	8686
4.1.4.3 Detecção de genes associados à virulência em <i>V. cholerae</i> utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	8888
4.1.4.3.1 Avaliação da virulência de isolados selecionados de <i>V. cholerae</i> em modelo invertebrado de <i>G. mellonella</i>	8989
4.1.4.3.2 Teste de Susceptibilidade aos antibióticos.....	9292
4.1.5 Conclusões	9494
APÊNDICES	9595
A - Origem dos isolados	9595
B - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para confirmação de espécie.	9797
C - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de fragmentos dos genes associados à virulência.	9898
D - Isolados de <i>Vibrio cholerae</i> utilizados como referência nas análises do MLSA.	9999
E (I) - Informação dos isolados selecionados no estudo para caracterização pelas análises de MLSA.	100100
E (II) - Informação dos isolados selecionados no estudo para caracterização pelas análises de MLSA.	101101
F - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene <i>adk</i>	102102
G - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene <i>gyrB</i>	103103
H - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene <i>mdh</i>	104104
I - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene <i>metE</i>	105105
J - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene <i>pntA</i>	106106
K - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene <i>purM</i>	107107
L - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene <i>pyrC</i>	108108
M - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos housekeeping genes <i>adk</i> , <i>gyrB</i> , <i>metE</i> , <i>purM</i> , <i>pyrC</i> , <i>mdh</i> , <i>pntA</i> de isolados de origem ambiental com as sequências disponíveis no NCBI e na base de dados do MLST de <i>Vibrio cholerae</i>	109109
N - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos housekeeping genes <i>adk</i> , <i>gyrB</i> , <i>metE</i> , <i>purM</i> , <i>pyrC</i> , <i>mdh</i> , <i>pntA</i> , em isolados de origem ambiental com duas das sequências disponíveis no NCBI de <i>V. cholerae</i>	110110
O - Distribuição dos genes associados à virulência em isolados de <i>Vibrio cholerae</i> detectados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	111111
P - Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados selecionados de <i>V. cholerae</i> segundo a origem.	112112
REFERÊNCIAS	113113
5 CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>Vibrio cholerae</i> EM AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL.....	125125
5.2.1 Introdução	126126
5.2.2 Materiais e métodos	127127
5.2.2.1 Isolados microbianos e condições de cultura	127127
5.2.2.2 Seleção e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores.....	127127
5.2.2.3 Preparo e extração de DNA	128128
5.2.2.4 Avaliação da sensibilidade da detecção por PCR em Tempo Real de <i>V. cholerae</i> e do gene da toxina colérica.	129129

5.2.2.5 Avaliação por PCR em Tempo Real da detecção de <i>V. cholerae</i> e do gene da toxina colérica em amostras ambientais	130 130
5.2.3 Resultados	132 132
5.2.3.1 Seleção e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores	132 132
5.2.3.2 Avaliação da sensibilidade da detecção por PCR em Tempo Real de <i>V. cholerae</i> e do gene da toxina colérica.	132 132
5.2.3.3 Avaliação por PCR em Tempo Real da detecção de <i>V. cholerae</i> e do gene da toxina colérica em amostras ambientais	133 133
5.2.4 Discussão	136 136
5.2.4.1 Seleção e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores	136 136
5.2.4.2 Avaliação da sensibilidade da detecção por PCR em Tempo Real de <i>V. cholerae</i> e do gene da toxina colérica.	137 137
5.2.4.3 Avaliação por PCR em Tempo Real da detecção de <i>V. cholerae</i> e do gene da toxina colérica em amostras ambientais	139 139
5.2.5 Conclusões	141 141
APÊNDICES	142142
Q - Informação dos isolados selecionados no estudo para a padronização da metodologia de PCR em Tempo Real.	142142
R - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção de espécie e do fragmento do gene associado à virulência.	143143
S - Produtos de amplificação de PCR dos fragmentos dos genes <i>purM</i> e <i>pntA</i> para identificação de espécie <i>Vibrio cholerae</i> e do fragmento do gene <i>ctx</i> da toxina colérica.	144144
T - Curva padrão dos genes <i>purM</i>, <i>pntA</i> e <i>ctxAB</i> para avaliação da sensibilidade na detecção de <i>Vibrio cholerae</i> por PCR em Tempo Real.	145145
U - Produtos de amplificação de PCR dos fragmentos dos genes <i>purM</i>, <i>pntA</i> e <i>ctxAB</i> para identificação de espécie <i>Vibrio cholerae</i> utilizando como DNA as diluições realizadas dos inóculos 1:10.....	146146
V - Logaritmo do número de cópias do gene alvo na detecção de <i>Vibrio cholerae</i>.	147147
REFERÊNCIAS	148148
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	157157

1 INTRODUÇÃO

A cólera é uma doença infecciosa intestinal aguda, causada pelo micro-organismo *Vibrio cholerae* sorogrupos O1 e O139 (World Health Organization - WHO, 2014 a, b). A transmissão deste micro-organismo ocorre por meio da ingestão de alimentos ou águas contaminadas (MORRIS, 2011). *V. cholerae* é autóctone do ecossistema aquático, o qual atua como fonte e reservatório das infecções em humanos (COLWELL, 1996; ISLAM et al., 1994). *V. cholerae* não-O1 tem sido isolado de ambientes marinhos, particularmente de baías, estuários e águas salgadas em diversas partes do mundo (HUQ et al., 1994). A maior parte dos isolados ambientais de *V. cholerae* não possui ou possui com menor frequência os fatores associados à virulência (RIVERA et al., 2001). No entanto, estes isolados têm sido associados a doenças diarreicas, gastrointestinais, septicemias e infecções extraintestinais (CHEN, et al., 2015; MORRIS et al., 1990).

A cólera ocorre quando *V. cholerae* é ingerido, e, após passar através da barreira ácida do estômago, adere-se às células epiteliais do intestino delgado dando início à infecção. Durante a colonização do intestino, *V. cholerae* expressa vários fatores associados à virulência (FAV), entre os quais se encontra a toxina colérica (CT – *Cholera Toxin*), responsável pela diarreia, principal sintoma da cólera (FARUQUE et al., 1998; MEKALANOS, 1985), e o pilus tipo IV, que atua na colonização (TCP – *Toxin Coregulated Pilus*) (BOLAÑOS et al., 2009; TAYLOR et al., 1987).

Como resultado da diarreia, inúmeros micro-organismos são liberados do intestino, o que provoca sua reintrodução no ambiente (PROUTY; KLOSE, 2006). A dinâmica da cólera é complexa, pelas múltiplas interações entre o hospedeiro humano, o patógeno e o meio ambiente, o que facilita a disseminação da doença (NELSON et al., 2009). O período médio de incubação da cólera toxigênica é de 1 a 5 dias (AZMAN et al., 2013) e a dose requerida para causar a infecção, em humanos saudáveis, varia de 10^6 a 10^8 UFC, dependendo das condições do inóculo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2003; HANDA, 2007; HORNICK et al., 1971).

A cólera continua sendo uma ameaça a nível mundial e é um dos principais indicadores de desenvolvimento social. Os principais padrões epidêmicos observados estão relacionados à precariedade das condições higiênico-sanitárias, ao forte crescimento populacional sem condições de saneamento básico, à comercialização de produtos

alimentares sem higiene adequada e controle sanitário, à péssima qualidade da água servida e as ligações clandestinas no sistema de água (PETTA et al., 2011).

As práticas de monitoramento são de vital importância para avaliar aspectos ecológicos e de prevenção da disseminação de *V. cholerae*, antes da ocorrência de epidemias (FARUQUE et al., 2006). Esta ação mantém a rede de vigilância em alerta e preparada para uma possível emergência em saúde pública (BRASIL, 2014 a, b). Devido à importância do monitoramento de *V. cholerae*, foram realizadas várias pesquisas para o estudo da ecologia de *V. cholerae* no ecossistema aquático brasileiro, lideradas pela Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera. Deste modo, foram obtidos por metodologias clássicas e moleculares isolados da família *Vibrionaceae* e *V. cholerae* (ALMEIDA 2009; ALVARADO, 1997; LAVEZZO, 2015; MARKMAN, 2008; MARTINS, 1988; SOUZA, 2001).

Dando continuidade a estas pesquisas de relevante importância e, com o objetivo de aprofundar ainda mais o conhecimento da ecologia deste micro-organismo, foram selecionadas 807 linhagens da família *Vibrionaceae*, isoladas de diferentes fontes (água salgada, água doce, sedimento, plâncton e ostras), pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Estas linhagens foram caracterizadas por metodologias clássicas (Gram, TCBS, oxidase e teste da alça), moleculares (MLSA e fatores associados à virulência), e foi determinado o seu perfil de susceptibilidade a antibióticos. Além disso, as linhagens foram utilizadas para avaliar a virulência em modelo invertebrado animal. Estes testes foram realizados com o objetivo de desenhar e padronizar oligonucleotídeos iniciadores específicos de espécie, a partir de isolados caracterizados do ambiente aquático brasileiro em conjunto com isolados tipo, para serem usados na detecção e quantificação de *V. cholerae* por PCR em tempo real e posterior avaliação em ecossistemas aquáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA, OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Vibrio*

O gênero *Vibrio* corresponde a um dos mais antigos gêneros microbianos conhecidos (DREWS et al., 2000). A avaliação taxonômica deste grupo teve início após estudos realizados por Filippo Pacini, o qual, em 1854, identificou a primeira espécie do gênero *Vibrio*, sendo *V. cholerae* o agente causal da cólera (BAUMANN, et al., 1984; BENTIVOGLIO et al., 1995). Até a metade do século 20, a taxonomia dos vibrios era baseada em estudos morfológicos, que agrupavam as cepas segundo as suas características fenotípicas, incluindo a presença de flagelos, morfologia, curvatura celular e aspectos de cultivo (HOWARD-JONES, 1984). De acordo com o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* e *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (BAUMANN et al., 1984), os vibrios pertencem à classe Gamaproteobacteria, são Gram-negativos, móveis, mesófilos, quimiorganotróficos, fermentadores facultativos e podem ser encontrados em ambientes aquáticos e em associação com eucariotos. São geralmente capazes de crescer em Agar marinho e TCBS e na grande maioria são oxidase positivos.

O gênero *Vibrio* pode ser encontrado em abundância no ambiente aquático, incluindo estuários, águas marinhas costeiras, sedimentos e em sistemas de aquicultura (BARBIERI et al., 1999; DENNER et al., 2002; HEIDELBERG et al., 2002; ORTIGOSA et al., 1989; 1994; REHNSTAM et al., 1993; URAKAWA et al., 2000; YUMOTO et al., 1999). Diversos estudos dependentes e independentes de cultivo têm mostrado que o gênero *Vibrio* aparece em altas densidades e/ou em associação com organismos marinhos, tais como, corais (LI et al., 2016; ROSENBERG et al., 2002; RUBIO-PORTILLO et al., 2014), peixes (ARIAS et al., 1995; BJELLAND et al., 2013; BLUFORD et al., 2016; GRISEZ et al., 1997; HUYS et al., 2001), moluscos (KLEIN et al., 2016; ROMALDE et al., 2014; SAWABE et al., 2003; SHAW et al., 2014), plânctons, esponjas, camarões (BELLÉS-GARULERA et al., 2016; GOMEZ-GIL et al., 1998; MAIN et al., 2015; TURNER et al., 2014; VANDENBERGHE et al., 1998; 1999; 2003) e zooplâncton (HEIDELBERG et al., 2002; NANDINI et al., 2015; SUANTIKA et al., 2001; VERDONCK et al., 1994).

Existem indícios de que o gênero *Vibrio* exerça um papel essencial no ciclo de nutrientes nos ambientes aquáticos, degradando a matéria orgânica e disponibilizando-a para outros organismos (SHERR et al., 2000; 2002). Espécies desse gênero são capazes de hidrolisar a quitina, o polissacarídeo mais abundante no ambiente marinho e principal

componente do exoesqueleto de artrópodes (COTTRELL et al., 2000 a, b; COTTRELL et al., 2003; ITOI et al., 2007). Também já foi observado que algumas espécies são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos tóxicos, em sedimentos marinhos poluídos (HEDLUND et al., 2001), enquanto outras espécies são importantes produtores de antibióticos entre os micro-organismos marinhos (LONG et al., 2001). Compostos inibidores produzidos por cepas do gênero *Vibrio* possuem a capacidade de reduzir o número de membros de outras comunidades microbianas, tais como Alfa-proteobacteria e *Alteromonas*, sendo esta estratégia presente em microescala e relacionada à competição entre populações microbianas (LONG et al., 2001).

O gênero *Vibrio* sofreu diversas modificações taxonômicas devido à sua complexidade genética. A análise de sequência do gene 16S rRNA foi considerada inicialmente como uma das ferramentas mais utilizadas para alocação de gêneros e espécies dentro da família *Vibrionaceae* (DORSCH et al., 1992). No entanto, foi verificado que este gene em espécies do gênero *Vibrio* apresenta similaridades de 80% por hibridação DNA-DNA e de $\geq 99,7$ - 100% de similaridade por análises de sequência (LE ROUX et al., 2004; SAWABE et al., 2007; THOMPSON et al., 2003). Deste modo, outros genes constitutivos, tais como *recA*, *rpoA* e *pyrH*, foram propostos como marcadores moleculares, embora seja observada uma similaridade de 85% entre espécies de *Vibrio* (TALL et al., 2013; THOMPSON et al., 2004; 2005; 2008). Assim mesmo, os genes *atpA* (THOMPSON et al., 2007), *gyrB* (LE ROUX et al., 2004; LUO et al., 2008) e *fur* (ACHENBACH et al., 1997; COLQUHOUN et al., 2002; JOGLER et al., 2009; MACHADO et al., 2015), apresentaram similaridade de 80-99%, 84% e 97% para discriminar entre espécies do gênero *Vibrio*, respectivamente, o que indica então, que um único gene como marcador filogenético, não oferece uma resolução adequada para traçar a filogenia entre espécies deste gênero (RUIMY et al. 1994; THOMPSON et al., 2004; 2005; 2007).

Consequentemente, foi necessária a inclusão de outras metodologias como o *Multilocus Sequence Analysis (MLSA)*, que permite o acesso à diversidade genômica de diferentes gêneros e espécies, incluindo o gênero *Vibrio* (CHIMETTO et al., 2015; GABRIEL, et al., 2014; HABIB et al., 2014; KEBEDE et al., 2014; MAIDEN et al., 1998; THOMPSON et al., 2009). O MLSA considera a análise de múltiplos genes conservados, os quais têm as suas sequências concatenadas, aumentando a qualidade da reconstrução filogenética e melhorando a resolução taxonômica, adicionando mais dados informativos, minimizando o

peso dos eventos de recombinação e permitindo a realocação de espécies dentro deste gênero (HALEY et al., 2010; HANAGE et al. 2005; PASCUAL et al., 2010).

A análise dos genes *ftsZ*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *topA* em genomas da família *Vibrionaceae* permitiu uma alta resolução a nível de gênero e espécie, separando os gêneros *Photobacterium*, *Aliivibrio* e *Vibrio* (GABRIEL et al., 2014; GEVERS et al., 2005; PASCUAL et al., 2010; THOMPSON et al., 2009). Os genes *topA*, *pyrH*, *ftsZ* e *mreB* permitiram a identificação de novas espécies do gênero *Vibrio* (THOMPSON et al., 2007). Atualmente, a família *Vibrionaceae* está taxonomicamente constituída por seis gêneros: *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Aliivibrio* e *Vibrio* (GOMEZ-GIL et al., 2014; SAWABE et al., 2013), tendo o gênero *Vibrio* mais de 100 espécies, incluindo quatro subespécies. De todas as espécies de *Vibrio*, três delas (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) são consideradas patógenos humanos de grande importância na saúde pública. *V. cholerae*, agente causador da cólera, é o principal problema de saúde pública em países em desenvolvimento e tem sido relacionado a grandes surtos na Índia, África e Américas (AUSTIN, 2005; ROMALDE et al., 2014; WHO, 2013).

2.2 HISTÓRICO DA CÓLERA

A cólera é uma doença infecciosa aguda do intestino delgado, causada por uma enterotoxina produzida por *V. cholerae* (WHO, 2014; 2016). A cólera está geralmente associada ao consumo de água e alimentos contaminados por fezes ou pela manipulação de alimentos por pessoas infectadas, sejam elas sintomáticas ou não. Peixes, frutos do mar, como ostras e mexilhões, crus ou mal cozidos, representam veículos de transmissão da doença e notificação compulsória às autoridades de saúde (HORNICK et al., 1971; MORRIS, 2011; NELSON et al., 2009).

Relatos de uma doença, similar à cólera, foram descritos antes mesmo dos tempos de Hipócrates (460 a 377 a.C) (BLAKE et al., 1994). No entanto, a história moderna da cólera começou somente em 1817 (Figura 1) (BLAKE et al., 1994; DZIEJMAN et al., 2002), quando um surto epidêmico foi relatado na Índia, que, posteriormente, se espalhou por todo o continente, sendo definido como o primeiro surto pandêmico de cólera no sudeste da Ásia. Durante o século 20, seis pandemias de cólera ocorreram, terminando em 1923 e afetando principalmente os continentes localizados no hemisfério sul, bem como a América do Norte e Europa (BARUA et al., 1991; POLLITZER, 1959). Em 1961, a sétima pandemia começou na

Indonésia, em seguida, se espalhou para o subcontinente indiano e no Oriente Médio, em seguida para a África na década de 1970 e finalmente atingiu a América do Sul no início da década de 1990 (BLAKE et al., 1994; FARUQUE et al., 1998).

V. cholerae foi apontado como agente causador da cólera em 1883 por Robert Koch (HOWARD-JONES et al., 1984; KOCH, 1884; LIPPI et al., 2014). As estirpes relacionadas até a sexta pandemia não puderam ser associadas para verificar a relação entre elas, mas sugerem que estejam relacionadas a *V. cholerae* O1 biotipo "clássico". A sexta pandemia estava associada à variante *V. cholerae* O1 biotipo "clássico", enquanto a sétima pandemia esteve associada ao sorogrupo O1 biotipo "El Tor" (BARUA et al., 1991). Em 1992, um evento de conversão do sorogrupo O1 levou ao surgimento de uma nova variante denominada de *V. cholerae* O139, resultando numa grande epidemia em Bangladesh e na Índia (ALBERT et al., 1993; HARRIS et al., 2012; RAMAMURTHY et al., 1993; SWERDLOW 1993). Desde então, as estirpes O139 são endêmicas nestas áreas, existindo casos relatados em todo o Sudeste Asiático. Esta epidemia tem sido descrita como a oitava pandemia (FARUQUE et al., 1998), no entanto, cepas de O1 "El Tor" também podem ser encontradas nessas áreas.

Figura 1 - Eventos evolutivos da epidemiologia de *Vibrio cholerae*

Fonte: Safa et al., 2009.

Surtos de cólera são anualmente relatados, não somente em países em desenvolvimento, mas também em regiões com condições de saneamento básico precário (FAO, 2003). Depois de 1991, o ano que apresentou o maior número de casos de cólera foi

2011, associado ao terremoto ocorrido no Haiti (Figura 2) (WHO, 2016a). Nesse ano, 58 países relataram um total de 589.854 casos de cólera e 7.816 mortes (WHO, 2014; 2016a). Em 2013, 47 países relataram um total de 129.064 casos de cólera e 2.102 mortes, 47% menos em relação a 2012 e 78% em relação a 2011. O Haiti (58.809) e a República Democrática do Congo (26.944) foram os países com os maiores números de casos de cólera em 2013 (MOORE et al., 2014; WHO, 2014). Já em 2015, 42 países relataram um total de 172.454 casos de cólera (16 países em África, 13 na Ásia, 6 na Europa, 6 nas Américas e 1 na Oceania) e 1.304 mortes (WHO, 2016a). Em 2016, entre as semanas epidemiológicas 1 e 34, foi relatado um total de 27.839 casos de cólera nas Américas: República Dominicana (1.039), Equador (1) e Haiti (26.799) e 260 mortes (WHO, 2016b).

Figura 2 - Casos de cólera relatados pela Organização Mundial da Saúde entre os anos 1989 e 2015.

Fonte: Who, 2016a.

O Brasil conviveu com uma primeira epidemia entre 1852 - 1859 no estado do Pará, a qual atingiu também o estado do Rio de Janeiro. A doença foi veiculada por meio de um navio proveniente de Portugal (BELTRÃO, 2002; PASSOS, 1999). Uma segunda epidemia de cólera chegou ao Brasil entre os anos de 1991 e 2001. A cólera ingressou pela costa do Pacífico, se estabeleceu no Peru e entrou no Brasil pelo rio Amazonas (BRASIL, 2010). Nesse período, a epidemia atingiu todas as regiões do país, totalizando 168.598 casos e 2.035 mortes. Essas ocorrências estavam concentradas principalmente na região nordeste do país, a qual apresentava condições socioeconômicas e de saneamento básico precárias

(GEROLMO et al., 1999; NANDI, 2002). Após esse período, houve uma importante redução no número de casos. Em 2001, foram registrados sete casos confirmados, em 2002 e 2003, não foi detectado nenhum caso e, em 2004 foram registrados 21 casos em São Bento do Una, Pernambuco. Os últimos casos autóctones foram diagnosticados em 2005, também no estado de Pernambuco, sendo quatro casos em São Bento do Una e um em Recife (BRASIL, 2004; 2014a). Os últimos casos importados foram de pessoas que provinham de Angola em 2011 e 2012, no estado de São Paulo (BRASIL, 2014b, 2016).

2.3 ECOLOGIA DE *Vibrio cholerae*

Incluindo as cepas envolvidas em pandemias (sorogrupos O1 e O139), *V. cholerae* tem como habitat natural o ecossistema aquático (COLWELL et al., 1977; 1996; HUQ et al., 1994; ISLAM et al., 1994; NARRACCI et al., 2014), fazendo deles patógenos humanos facultativos. No ambiente marinho, *V. cholerae* encontra-se associado a plantas, algas verdes filamentosas, copépodes (zooplâncton), crustáceos e insetos (BLOKESCH et al., 2012; COLWELL et al., 1996; GARAY et al., 1985; HEIDELBERG et al., 2002; HUQ et al., 1990; ISLAM et al., 1994; NANDINI et al., 2015; SUANTIKA et al., 2001) e pode participar ativamente na ciclagem de nutrientes (SHERR et al., 2000; 2002).

V. cholerae é capaz de formar grandes estruturas multicelulares (biofilmes) em superfícies sólidas, mediado pelo sistema de *quorum-sensing* e proteínas, as quais são de extrema importância no seu ciclo de vida (JUNG et al., 2015; MILLER et al., 2002; NG et al., 2012; SHIKUMA et al., 2010). Os biofilmes fornecem microambientes que favorecem sua sobrevivência e persistência no ambiente aquático durante a restrição de nutrientes ou estresse ambiental (DRAKE et al., 2005; 2007; LIPP et al., 2002; MILTON et al., 2006; WAI et al., 1998), facilitando assim sua viabilidade em períodos interepidêmicos (WATNICK, et al., 1999; 2001; YILDIZ et al., 1999). No entanto, parece existir uma relação entre a capacidade de formação de biofilmes por *V. cholerae* e o surgimento de cepas toxigênicas (WATNICK et al., 2001; ZHU et al., 2002).

A formação de biofilme pelos sorotipos O1 e O139 é dependente da expressão de um exopolissacarídeo (VPS) (WAI et al., 1998; WATNICK et al., 2001; YILDIZ et al., 1999), o qual promove a formação de uma colônia com característica rugosa e resistente ao cloro e a fagos (MORRIS et al., 1996; NESPER et al., 2001; YILDIZ et al., 1999). A produção desse exopolissacarídeo é necessária ao desenvolvimento de um biofilme tridimensional e

qualquer evento que venha levar à produção de um exopolissacarídeo inadequado conduz à colonização ineficiente do epitélio intestinal de ratos utilizados como modelo nos estudos da cólera (WATNICK et al., 2001). Assim, a regulação precisa da síntese desse exopolissacarídeo é um fator importante para a sobrevivência de *V. cholerae* no ambiente aquático e no intestino dos mamíferos (WATNICK et al., 2001).

Além da formação de biofilmes, *V. cholerae* possui uma capacidade notável de mudar em relação à sua viabilidade, ou seja, sair da forma viável para uma forma viável, mas não cultivável (*Viable, but Non-Culturable* - VNC), um estado de resposta à restrição de nutrientes (COLWELL et al., 1985; HUQ et al., 2000; JUBAIR et al., 2012; OLIVER et al., 2010; XU, et al., 1982). Este estado fisiológico foi descrito em várias bactérias patogênicas e não patogênicas (OLIVER et al., 2005). Tal estado de dormência é caracterizado por mudanças ultraestruturais, que incluem uma membrana externa ondulada, uma camada de fibras finas e uma camada de peptideoglicano (KONDO et al., 1994), bem como a redução do tamanho da célula (MISHRA et al., 2012). Sua presença em diversas amostras pode ser confirmada por métodos moleculares (HUQ et al., 2000; MEHRABADI et al., 2012; RIVERA et al., 2003).

A forma VNC está relacionada a uma estratégia de sobrevivência, que pode ser convertida após a recepção de sinais apropriados, como, por exemplo, mudanças extremas de condições ambientais, na transição do sistema aquático para o intestino humano (ASAKURA et al., 2007; COLWELL, 1985; FARUQUE et al., 1998; LI et al., 2014; XIAO et al., 2013). Nesta condição (VNC), várias espécies do gênero *Vibrio* apresentam resistência a diversas condições ambientais, como elevadas concentrações de antibióticos, incremento e diminuição da temperatura, toxicidade de metais pesados, diferentes concentrações de sal, etanol, ácidos e H₂O₂ (NOWAKOWSKA et al., 2013; WONG et al., 2004).

Durante os períodos inter-epidêmicos, cepas epidêmicas de *V. cholerae* têm sido apontadas como persistentes na forma VNC, sendo as condições ambientais envolvidas na conversão das células a uma forma viável e toxigênica ainda desconhecidas (ISLAM et al., 1994). No entanto, a existência do estado VNC é um assunto muito discutido, pois não há nenhuma conclusão sobre os processos moleculares ou fatores genéticos envolvidos (MCDOUGALD; KJELLEBERG, 2006).

Fatores ambientais, como temperatura e salinidade da água, são importantes na ecologia de *V. cholerae*, na dinâmica populacional e na resposta ao estresse fisiológico (HASHIZUME et al., 2008; KASPAR; TAMPLIN., 1993; LUTZ et al., 2013; MCCARTHY, 1996;

RANDA et al., 2004; RINALDO et al., 2012; SOTO et al., 2009), mas mostram ter influência no aparecimento de surtos de cólera. Fenômenos climáticos como El Niño, o qual gera variação na temperatura da superfície das águas do mar, têm aumentado a incidência da doença na Ásia e na América do Sul (HASHIZUME et al. 2013; PASCUAL et al., 2000; RAMÍREZ et al., 2016). Relatos mostraram que a população do gênero *Vibrio* aumenta em relação a outras comunidades microbianas de acordo com o aumento da temperatura da superfície da água (BAKER et al., 2016; VEZZULLI et al., 2012). Também, existe uma correlação de surtos de cólera com a ocorrência sazonal das florações de algas (*algal blooms*) (COLWELL et al., 1996; EPSTEIN et al., 1993; ISLAM et al., 1994; JUTLA et al., 2011). No entanto, não existem evidências diretas de que tais acontecimentos tenham influência no surgimento de estirpes de *V. cholerae* toxigênicas responsáveis por epidemias de cólera. Assim, o monitoramento dos fatores ambientais envolvidos na ecologia de *V. cholerae* é de grande importância e auxilia na precaução e alarme de períodos em que surtos de cólera possam vir a ocorrer.

2.4 PATOGENICIDADE, GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Vibrio cholerae* E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Cerca de 200 sorogrupos O de *V. cholerae* são conhecidos, mas somente os sorogrupos O1 e O139 têm sido associados diretamente a epidemias. Infecções intestinais e/ou extraintestinais com cepas dos sorogrupos não-O1/não-O139 ou O1 não toxigênico, são raramente relatadas (CECCARELLI et al., 2015; DZIEJMAN et al., 2005; HIRK et al., 2016; MORRIS et al., 1990; PUKATZKI et al., 2006; RODRIGUE et al., 1994; SAHA et al., 1996; SHARMA et al., 1998).

A infecção de cólera normalmente se inicia após a ingestão de alimentos ou água contaminada com *V. cholerae*. Em seguida, as bactérias precisam sobreviver à barreira de ácido gástrico do estômago para se aderirem às células do epitélio intestinal (ALMAGRO-MORENO et al., 2015). O período médio de incubação da cólera varia entre 1 e 5 dias (AZMAN et al., 2013) e a dose infecciosa foi determinada como sendo bem elevada e variada, dependendo das condições de inóculo (10^6 a 10^{11} UFC) (BENNISH et al., 1994; NELSON et al., 2011). A dose elevada é provavelmente necessária devido à sensibilidade de *V. cholerae* ao pH ácido do suco gástrico (CASH et al., 1974) e para que as bactérias sobreviventes ao pH baixo possam se aderir e colonizar as células do epitélio intestinal, produzir a toxina colérica e causar os sintomas da cólera (HOLMGREN et al., 1977; SACK et al., 2004).

A diarreia aquosa e a desidratação aguda são os principais sintomas da cólera e podem causar a morte até mesmo 12 horas após a constatação dos primeiros sintomas (BENNISH et al., 1994; WHO, 2010). Além disso, inúmeras bactérias são liberadas do intestino, o que provoca a introdução de novos micro-organismos no ambiente (PROUTY et al., 2006). A infecção de *V. cholerae* e a manifestação da doença possuem mecanismos complexos com vários fatores envolvidos na colonização intestinal, regulação e expressão da toxina colérica. No seu estado natural, as cepas de *V. cholerae* não apresentam a toxina colérica (CT) (COLWELL et al., 1996; NAIR et al., 2006; NESPER et al., 2001; RAYCHOUDHURI et al., 2009), a qual é responsável pelo principal sintoma da cólera (diarreia) (BROECK et al., 2007; FARUQUE et al., 1998; FARUQUE; MEKALANOS, 2003; MEKALANOS, 1985), mas são convertidas em cepas toxigênicas após transdução do fago CTX ϕ . Esse fago contém duas regiões, a região RS2 e a região core (Figura 3). A região RS2 codifica genes envolvidos na integração, replicação e regulação do fago CTX ϕ , enquanto a região core é composta pelo operon CT (*ctxAB*), bem como outros cinco genes *psh*, *cep*, *pIII^{CTX}*, *ace* e *zot* (WALDOR; MEKALANOS, 1996). Acreditava-se que os genes *zot* e *ace* codificavam toxinas adicionais (FASANO et al., 1991; TRUCKSIS et al., 1993), mas são requeridas para morfogênese (WALDOR, 1997). Esse fago se integra ao cromossomo maior de *V. cholerae* em uma região específica, denominada RS1 (PEARSON et al., 1993). E a estrutura deste fago difere entre o biótipo clássico, “El Tor” e a variante Atípica, permitindo associar estas variantes à distribuição geográfica e algumas modificando a expressão da toxina colérica (BHATTACHARYA et al., 2016; GHOSH-BANERJEE et al., 2010; KUMAR et al., 2014; NAHA et al., 2012; NAIR et al., 2006; RAYCHOUDHURI et al., 2009; REIMER et al., 2011; SATITSRI et al., 2016).

Figura 3 - Estrutura do CTX-phi, elementos RS1 e RS2 em diferentes variedades de *Vibrio cholerae* sorotipo O1

Fonte: Safa et al., 2009

Outro fator importante associado à virulência de *V. cholerae* é a Toxina Correguladora do Pilus (TCP), fator essencial na colonização intestinal pela bactéria (BOLAÑOS et al., 2009; CHARLES et al., 2011; TAYLOR et al., 1987). O TCP é uma fimbria do tipo IV requerida para a ligação da bactéria à mucosa do intestino delgado (HERRINGTON et al., 1988; KUMAR et al., 2014; LI et al., 2012; TAYLOR et al., 1987) e também atua como receptor do fago CTXφ (SHAW et al., 1990; WALDOR et al., 1996). Os genes necessários para síntese encontram-se localizados em uma ilha de patogenicidade (VPI - *Vibrio pathogenicity island*) denominada VPI-1, presente no cromossomo (GENNARI et al., 2012; KARAOLIS et al., 1998; KOVACH et al., 1996).

Inúmeros estudos moleculares sobre a patogenicidade de *V. cholerae* revelaram que a expressão dos principais fatores associados à virulência (CT e TCP) é controlada pelo mesmo sistema regulatório. Esse sistema consiste de três diferentes ativadores, dois localizados dentro da VPI (ToxT e TcpP) e um (ToxR), dentro do cromossomo ancestral (maior) (HEIDELBERG et al., 2000; KARAOLIS et al., 1998; KOVACH et al., 1996; MATSON et al., 2007; OSORIO et al., 2000). Alguns moduladores deste sistema regulatório foram identificados (FadR, H-NS), os quais influenciam a virulência de *V. cholerae*, modulando os

níveis de ToxT e a expressão dos genes *ctxAB* e *tcpA* (AYALA et al., 2017; KOVACIKOVA, 2017; LOWDEN et al., 2010).

Vários fatores adicionais envolvidos na virulência de *V. cholerae* têm sido caracterizados. Esses fatores não foram avaliados quanto às suas propriedades na colonização intestinal, mas podem estar envolvidos em outros aspectos da patogênese da cólera. Estes fatores incluem proteínas, como neuraminidases, hemaglutininas, proteases e hemolisinas (KAPER et al., 1994; MITRA et al., 2000). Lin e colaboradores (1999) detectaram um gene (*rtxA*) ligado ao fago CTX ϕ , que codifica uma exotoxina pertencente à família das toxinas RTX (do inglês *Repeat in Toxin*) e uma toxina termoestável, denominada NAG-ST (*st/sto*), tem sido descrita como importante fator associado à virulência em *V. cholerae* não-O1. Esta toxina é relativamente rara entre isolados clínicos (PAL et al., 1992), mas está presente com mais frequência em cepas de origem ambiental (CALDINI et al., 1997; CECCARELLI et al., 2015; LUO et al., 2013; PAL et al., 1992; RIVERA et al., 2001; SINGH et al., 2001).

A virulência de isolados de *V. cholerae* de origem clínica e ambiental tem sido avaliada em culturas celulares, modelo humano, modelo animal vertebrado como coelho, camundongo recém-nascido e modelo animal invertebrado como insetos lepidópteros (COLWELL et al., 1996; NUIDATE et al., 2016; SON et al., 2011). Estudos realizados em voluntários adultos foram de muita importância para o conhecimento da interação hospedeiro patógeno, e da dose requerida para causar a infecção, em humanos saudáveis (CASH et al., 1974; HORNICK et al., 1971). Adicionalmente, isolados em forma viável, mas não cultivável (*Viable, but Non-Culturable* - VNC), foram avaliados em voluntários, onde após 48 horas da ingestão foram recuperadas células cultiváveis em fezes (COLWELL et al., 1996).

O modelo animal foi desenvolvido para o estudo da Cólera, mesmo que a infecção de forma natural não aconteça (RAMARAO et al., 2012). No entanto, vários destes modelos têm sido bastante informativos quanto à habilidade dos isolados para colonizar o trato intestinal (CHAAND et al., 2015; KLOSE, 2000; MILLET, et al 2014; RITCHIE et al., 2009; 2010). Alguns alvos que utilizam este tipo de modelo são a avaliação da dose requerida para causar a infecção, a influência de fagos na infectividade dos isolados e os genes associados à virulência que participam no desenvolvimento da doença (COLWELL et al., 1985; KIRN et al., 2005; SON et al., 2011; ZAHID et al., 2008).

Em coelho, por exemplo, foi avaliada a perda e recuperação da culturabilidade de isolados de *V. cholerae* em estágio VNC. Isto, por meio da avaliação do acúmulo dos fluidos gástricos nas alças ileais após o inóculo, e a recuperação completa da culturabilidade e virulência dos isolados (COLWELL et al., 1985). Em camundongo, têm sido realizados estudos do mesmo tipo, avaliando o acúmulo de fluido em alças ileais e o fluido produzido, acompanhado de sangue e muco. Efeitos causados em resposta à expressão do gene *hlyA* da hemolisina e do gene *ctx* que codifica a toxina colérica, respectivamente (ICHINOSE et al., 1987; ZITZER et al., 1993). Diferentes estudos que utilizaram os dois modelos também avaliaram o papel de outros genes, tais como *tcpA*, de genes que constituem os sistemas estruturais (*VopM-W*, *GbpA*) e a interação de fagos, com a virulência de *V. cholerae*, visando aprofundar o conhecimento da doença e o desenvolvimento de vacinas (CHAAND et al., 2015; KIRN et al., 2005; LEE et al., 1999; VISHWAKARMA et al., 2015; WANG et al., 2015; ZAMPINI et al., 2005; ZHOU et al., 2014).

Os modelos de avaliação de virulência em mamíferos apresentam custos elevados e questionamentos éticos (DESBOIS et al., 2011; RAMARAO et al., 2012). O modelo não mamífero, como o do inseto lepidóptero *Galleria mellonella*, representa uma alternativa que oferece vantagens quanto à logística, custos de manutenção e não requer nenhuma consideração ética (DESBOIS et al., 2011; PELEG et al. 2006). Além disso, a lagarta pode ser mantida a uma temperatura de 37 °C, útil no estudo de patógenos em humanos e o inóculo bacteriano pode ser administrado com precisão por injeção direta (CHAMPION et al., 2009; MYLONAKIS et al., 2005). Este modelo também permite uma avaliação da resposta do hospedeiro devida à resposta imune humoral mediada por peptídeos antimicrobianos, bem como de uma resposta imune celular mediada por células fagocitárias, denominadas hemócitos (GRIESCH et al., 2000). Além disso, têm sido observadas semelhanças entre as células do intestino médio de *G. mellonella* e as células intestinais do sistema digestivo de mamíferos, assim como da virulência apresentada nos dois modelos (CHAMPION et al., 2009; JANDER et al., 2000; MUKHERJEE et al., 2010; MYLONAKIS et al., 2005; PELEG et al., 2006; RAMARAO et al., 2012).

Este modelo de infecção em *G. mellonella* foi utilizado em estudos de interação hospedeiro-patógeno em micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *V. cholerae* e em fungos patogênicos como *Candida albicans* (COTTER et al.,

2000; DESBOIS et al., 2011; JANDER et al., 2000; MIYATA et al., 2003; MYLONAKIS et al., 2005; NUIDATE et al., 2016; REEVES et al., 2004; SCHELL et al., 2008; SEED et al., 2008), corroborando cada um destes experimentos a efetividade na avaliação da virulência no modelo animal invertebrado.

Embora a virulência dos isolados de *V. cholerae* seja decisiva na patogênese da cólera, a resistência aos antibióticos é um problema para a saúde pública, dificultando o tratamento em casos com desidratação moderada a severa da cólera (HEYMANN, 2008; KITAOKA et al., 2011; LEIBOVICI-WEISSMAN et al., 2014; PIERCE et al., 1968). O fenômeno da resistência é favorecido pelo uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento na área clínica, de profilaxia na aquicultura, e adicionalmente a liberação de esgoto industrial e doméstico em ambientes aquáticos (CABELLO et al., 2013; SERRANO, 2005; SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003; YOU et al., 2016).

A presença no genoma de *V. cholerae* de Elementos Genéticos Móveis Integrativos (IMGEs), Elementos Integrativos Conjugativos, incluindo plasmídeos, transposons e integrons e super integrons, é a maior fonte de resistência a antibióticos em *V. cholerae* (DALSGAARD et al., 2000; 2001; ISMAIL et al., 2008; MAZEL, 2006; MWANSA et al., 2007; OPINTAN et al., 2008; PUGLIESE et al., 2009; THOMPSON et al., 2011; WALDOR et al., 1997). Assim, por exemplo, o elemento móvel SXT em *V. cholerae* induz a resistência a sulfametoxazol e trimetropim (WALDOR et al., 1996). Do mesmo modo, os integrons em isolados de origem clínica e ambiental conferem resistência a eritromicina, gentamicina, trimetoprim e estreptomicina (CANTO et al., 2010; OPINTAN et al., 2008). Isto tem gerado mudanças nos padrões de resistência aos antibióticos, que é uma característica na epidemiologia dos isolados de *V. cholerae* (FARUQUE et al., 1998).

Entretanto, a resistência apresentada por *V. cholerae* é um problema que tem aumentado, principalmente em países em desenvolvimento. Enquanto há relatos de resistência a um único antibiótico em vários países endêmicos da cólera (EIBACH et al., 2016; VILA et al., 2010), também há casos de cólera originados por isolados com resistência a vários antibióticos (cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, tetraciclina e trimetopim-sulfametoxazole), que foram relatados no Iran, Paquistão, Bangladesh, Índia, Nepal, Nigéria, Moçambique, Camarões e Malásia (AKOACHERE et al., 2013; AWASTHI et al., 2015; GUPTA et al., 2016; MANDAL et al., 2011; MANDOMANDO et al., 2007; MARIN et al., 2013; MATERU

et al., 1997; ODEYEMI et al., 2016; OLUMIDE et al., 2017; SEDAGHAT et al., 2012; SHRESTHA., 2015).

Portanto, é importante a vigilância e monitoramento da resistência aos antimicrobianos de isolados de *V. cholerae* (SEDAGHAT et al., 2012), visto que os antibióticos de seleção no tratamento em casos de cólera são a eritromicina e zinco (10 mg) em crianças menores de 5 anos e, em adultos, tetraciclina ou doxiciclina (12,5 mg/kg), ampicilina e sulfametoxazol (BRASIL, 2010; HEYMANN, 2008; PIERCE et al., 1968; WHO, 2013). A tetraciclina e quinolonas são de uso restrito para pacientes com desidratação severa pelo surgimento de isolados que apresentavam resistência (GARG et al., 2003).

2.5 MONITORAMENTO E DETECÇÃO DE *Vibrio cholerae*

A cólera é um sério problema de saúde pública, responsável por cerca de 3,5 milhões de casos e 120.000 mortes até hoje. Até 80% dos casos de cólera podem ser tratados com sucesso usando reidratação oral, mas medidas de controle eficazes dependem da prevenção, preparação e resposta aos casos, bem como do fornecimento de água potável e saneamento básico (WHO, 2014b). Ao nível mundial, o monitoramento e vigilância de potenciais reservatórios ambientais, assim como em locais vigia em diferentes pontos geográficos, são necessários para conhecer e avaliar o risco da presença de *V. cholerae*. Além disso, esta ação permite o desenvolvimento de normativas adequadas para controle e prevenção da cólera (ALAM et al., 2014). Para atingir este objetivo, diversos estudos de monitoramento foram realizados, na Nova Zelândia, onde foi avaliada a presença de *V. cholerae* O1 e O139 em água de lastro, porém as metodologias utilizadas não apresentaram a sensibilidade requerida para detectar o limite estabelecido na normativa para este tipo de amostra de 1 UFC.mL⁻¹ (MOUNFORT et al., 2012).

Entretanto, em Bangladesh, uma área endêmica da cólera, foi realizado um monitoramento em uma cidade do interior, coletando amostras de água de rio e em canais de irrigação durante o período inter-epidêmico. Foi evidenciada a presença de ambos os sorogrupos de *V. cholerae*, o que sugere que este micro-organismo está presente tanto em períodos epidêmicos como inter-epidêmicos nessa região (RIGHETTO et al., 2015). Igualmente, no Haiti, após a epidemia de cólera no ano 2010, foram monitorados dois pontos geográficos num período de 11 meses (Abril 2012 – Março 2013), confirmando a presença de isolados de *V. cholerae* O1 El Tor e *V. cholerae* não O1 em amostras de água.

Neste estudo foi corroborado o estabelecimento de reservatórios ambientais deste micro-organismo no litoral do Haiti (ALAM et al., 2014). Já na Argentina, foi realizado um monitoramento das populações microbianas no rio Reconquista por um período de três anos, identificando uma espécie do gênero *Vibrio* que pode ser um potencial patógeno (KUCZYNSKI et al., 2016).

No Brasil, particularmente no Estado de São Paulo, em estudos de monitoramento ambiental, foi verificada a presença de isolados de *V. cholerae* em amostras de esgoto em Santos (1978 e 1983) e em São Sebastião (1980) (IVERSSON et al., 1993). Estes isolados coletados em um período pré-epidêmico foram negativos para as toxinas CTX e ZOT (RIVERA et al., 1995; 2001). Assim mesmo, na Região Metropolitana de Belém (PA), foram avaliados quatro pontos de águas superficiais e efluentes de esgoto, durante um período de sete anos (1999 - 2006), isolando *V. cholerae* não-O1 e não-O139 (DE SÁ et al., 2007).

Enquanto isso, no estado de Pernambuco, o monitoramento realizado entre 2001 e 2005 permitiu identificar oito isolados de *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa circulantes na região e seis isolados de *V. cholerae* não-O1 e não-O139 (LEAL et al., 2008). Entretanto, Rivera e colaboradores (2013) avaliaram amostras de água de mar e plâncton em água de lastro, portos do Brasil, e três locais do litoral de São Paulo, e verificaram a presença de *V. cholerae* O1 toxigênico em água de lastro e *V. cholerae* O1 em portos. Em 2015, o Distrito Federal DF notificou a detecção de um isolado de *V. cholerae* sorogrupo O1, sorotipo Ogawa, em amostra de uma estação de tratamento de esgoto, o qual foi confirmado pelo Laboratório de Referência Nacional em Diagnóstico de Enteroinfecções Bacterianas da FIOCRUZ/RJ (BRASIL, 2015).

A presença de *V. cholerae* com fatores de virulência e resistência a alguns antimicrobianos no meio ambiente e na água de lastro sugere que o ambiente natural pode servir como um reservatório de genes durante períodos inativos da cólera (CHOMVARIN et al., 2014; EIBACH et al., 2016, KRUSE; SORUM, 1994), o que estimula a continuidade do programa de monitoramento e de medidas preventivas para a cólera (LEAL et al., 2008; RIVERA et al., 2013). Adicionalmente, é importante a implementação das orientações técnicas estabelecidas pelos sistemas de monitoramento e vigilância, assim como o desenvolvimento de metodologias que contribuam para a detecção oportuna e controle deste micro-organismo (ADEWALE et al., 2017; BRASIL, 2015; MOUNFORT et al., 2012).

Por outro lado, quando existe uma suspeita de cólera em uma determinada área, o Regulamento Sanitário Internacional exige que o diagnóstico seja confirmado por exames laboratoriais o mais rápido possível. Uma vez confirmado, não existe a necessidade de que todos os casos subsequentes também sejam confirmados, nem mesmo que o caso esteja relacionado à presença de *V. cholerae* O1. No entanto, o monitoramento deve prosseguir de forma contínua com informações mínimas (idade, localização geográfica, endereço, situação de hospitalização) dos indivíduos para facilitar o intercâmbio local, nacional e internacional das informações (WHO, 1992). A análise laboratorial é de extrema importância para confirmação da presença de cólera em uma determinada área, assim como a caracterização do organismo e determinação da sua sensibilidade aos antibióticos. Essas informações também são fundamentais nos estudos epidemiológicos para definir as fontes e rotas de transmissão da infecção e para acompanhar o desenvolvimento da epidemia (WHO, 1992; 1999). Para que isso seja possível, é necessário fazer uso de um laboratório com estrutura adequada e de metodologias que possibilitem a rápida detecção de *V. cholerae* em casos de suspeita.

A definição dos casos de cólera leva em consideração duas categorias: Clínica e Laboratorial. Um caso clínico pode ser definido quando um indivíduo com idade superior ou igual a cinco anos apresenta diarreia aguda, aquosa e característica da infecção. Já a confirmação laboratorial é realizada por uma sequência de metodologias clássicas, que envolvem o enriquecimento da amostra em Água Peptonada Alcalina (APA) (opcional), isolamento em Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Bile e Sacarose) e verificação do sorogrupo O1. Adicionalmente, os testes da Alça (*String Test*), oxidase, bem como verificação de sorogrupo O139 e resistência a antibióticos podem ser realizados (CETESB, 1992; WHO, 1999).

Várias metodologias para distinguir espécies do gênero *Vibrio* e identificar *V. cholerae* foram aplicadas nas últimas décadas, tais como, testes presuntivos de caracterização (WHO, 1999), testes bioquímicos rápidos como o API 20E (Biomérieux Industries, France), meios cromogênicos de isolamento (NAKASHIMA, et al., 2007; NIGRO et al 2015; SU et al., 2005), hibridização DNA-DNA (REICHEL et al., 1976), ribotipagem, RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) (SOUZA, 2001), PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*) (SMITH et al., 2015), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (JIANG et al., 2000).

A obtenção de marcadores moleculares usando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta utilizada há décadas e, por mais que exija tempo para sua execução, ainda representa uma metodologia fácil e sensível (ALISHAHI et al., 2013; MALORNY et al., 2003). Além disso, inúmeros estudos têm sido publicados descrevendo genes que poderiam ser utilizados na detecção do gênero *Vibrio*, *V. cholerae*, sorogrupos e genes de virulência. Chun, et al. (1999), por exemplo, amplificaram uma região intergênica (16S-23S rRNA) de *V. cholerae*, que utilizaram para a diferenciação entre *V. cholerae* e *V. mimicus*. Neogi e colaboradores (2011) avaliaram a abundância de bactérias do gênero *Vibrio* em diferentes profundidades, utilizando um fragmento de 800 pb do gene 16s rRNA. Brasher, et al. (1998) e Alishahi, et al. (2013) verificaram a presença dos genes de virulência *ctxA*, *toxR* e *ompU* em *V. cholerae* por *multiplex* PCR e estudos para identificação dos sorogrupos O1 e O139 de *V. cholerae* e seus principais fatores associados à virulência (*ctxA* e *tcpA*) foram realizados por Rivera, et al. (2003).

Devido aos constantes avanços na tecnologia, o PCR em tempo Real ganhou espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR tradicional, que fornece somente resultados qualitativos (BLACKSTONE et al., 2007; FISHER et al., 2002; GUBALA, 2006; LYON, 2001).

A metodologia de PCR em Tempo Real foi aplicada em estudos para identificação de diversos micro-organismos de origem clínica e ambiental, fornecendo resultados altamente sensíveis e específicos (ALANIO et al., 2011; ELFVING et al., 2014; HASSANSHAHIAN et al., 2014; HUGGETT et al., 2007; JOYNER et al., 2013). Também foi utilizada na detecção de espécies do gênero *Vibrio* como *V. tapetis* (BIDAULT et al., 2015), *V. aestuarianus* (MCCLEARY et al., 2015), *V. splendidus* e *V. parahaemolyticus* (LIU., 2016), agentes causais de doenças em bivalves, moluscos, ostras e como patógeno em humanos.

Esta metodologia foi avaliada para detecção de *V. cholerae* proveniente de diversas origens, utilizando vários genes alvo como o gene *rpoB* para caracterizar amostras clínicas de um surto na Nigéria (DUPKE et al., 2016), a partir de água de lastro, utilizando para detecção o gene *tcp* (FYKSE et al., 2012), e nos frutos do mar e sedimento (GDOURA et al., 2016; ROBERT-PILLOT et al., 2014; TAMINIAU et al., 2014). Huang, et al. (2009) aplicaram essa metodologia na quantificação dos genes da toxina colérica, hemolisina e genes específicos

para diferenciação dos sorogrupos O1 e O139 e não-O1 e não-O139, e a sensibilidade para a detecção foi de 2 UFC.mL⁻¹.

Le Roux, et al. (2011) usaram PCR em Tempo Real para os genes *ompW* e *ctxAB* no monitoramento de *V. cholerae* em amostras de água e detectaram isolados toxigênicos e não toxigênicos. Eles concluíram que essa técnica pode ser sensível, prática e aplicada no uso rotineiro de laboratórios. Outros genes, como *toxR*, *groEL*, *hlyA*, *tcpA*, foram usados por Fyske, et al. (2007) para detectar até 50 UFC.mL⁻¹ de células viáveis e em estágio VNC, a partir de água. Ferdous, et al. (2016) e Tirapattanun et al., (2015) utilizaram para detecção o gene *ctx*, apresentando um limite de detecção de 3.2×10^4 UFC.mL⁻¹ e 10^2 UFC.mL⁻¹.

A implementação de outras metodologias como o Número Mais Provável ao PCR em Tempo Real foi realizada para aprimorar a detecção de espécies deste gênero (ESTEVES et al., 2015). Assim mesmo, testes rápidos baseados no diagnóstico de antígenos de lipopolissacarídeo foram utilizados para a detecção de *V. cholerae* O1 e O139 em ambiente aquático, apresentando um limite de detecção de 10 UFC.mL⁻¹ (CHAKRABORTY et al., 2006; RASHID et al., 2016). Outros equipamentos como os biosensores estão sendo utilizados, oferecendo vantagens sobre as metodologias tradicionais de detecção, devidas à sua rapidez, facilidade de uso em coletas de campo e pelo fato de não necessitarem de pessoal capacitado. O limite de detecção foi de 10 UFC.mL⁻¹ (DEBES et al., 2014; DICK et al., 2012; LOW et al., 2017).

REFERÊNCIAS*

- ACHENBACH, A.; YANG, W. The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis. **Gene**, v. 185, p. 201–207. 1997.
- ADEWALE, S.; ADENIRAN, G.; OLOPADE, I.; AJAO, S.; MOHAMMED, I. Mathematical and sensitivity analysis of the dynamical spread of cholera. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 19, n. 1, p. 46-54, 2017.
- AKOACHERE, J.; MASALLA, T.; NJOM, H. Multi-drug resistant toxigenic *Vibrio cholerae* O1 is persistent in water sources in New Bell-Douala, Cameroon. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 366, 2013.
- ALAM, M.; WEPPELMANN, T.; WEBER, C.; JOHNSON, J.; RASHID, M.; BIRCH, C.; BRUMBACK, B.; MADSEN, V.; MORRIS, G.; ALI, A. Monitoring Water Sources for Environmental Reservoirs of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1, Haiti. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, 2014.
- ALANIO, A.; DESOUBEAUX, G.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; BERGERON, A.; AZOULAY, E.; MOLINA, J.; DEROUIN, F.; MENOTTI, J. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1531–1537, 2011.
- ALBERT, B.; SIDDINQUE, K.; ISLAM, M.; FARUQUWE, A.; ANZARZZAMAN, M.; FARUQUE, S.; SACK, R. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. **Lancet**, v. 341, p. 704. 1993.
- ALISHAHI, A.; FOOLADI, I.; MEHRABADI, F.; MAHMOODZADEH, H. Facile and Rapid Detection of *Vibrio cholerae* by Multiplex PCR Based on *ompU*, *ctxA*, and *toxR* Genes. Jundishapur **Journal of Microbiology**, v. 6, n. 10, 2013.
- ALMAGRO-MORENO, S.; PRUSS, K.; TAYLOR, K. Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 5. doi:10.1371/journal.ppat.1004787, 2015.
- ALMEIDA, B.C. **Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no canal de São Sebastião**. 198 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALVARADO, D. **Detecção de sequencias geneticas associadas a virulencia em cepas de *Vibrio cholerae* nao-O1 e nao-O139 isolados de ambientes marinhos do Estado de Sao Paulo**. 1997. 95 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- ARIAS, C.; GARAY, E.; AZNAR, R. Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3476–3478, 1995.
- ASAKURA, H.; ISHIWA, A.; ARAKAWA, E.; MAKINO, S.; OKADA, Y.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state.

* De acordo com:

Applied and Environmental Microbiology, v. 9, n. 4, p. 869-879. DOI 10.1111/j.1462-2920.2006.01206.x, 2007.

AUSTIN, B. Bacteria pathogens of marine fish. In: BELKIN, S; COLWELL, R. R. O. (eds.) *Oceans and Health: pathogens in the marine environment*. Dordrecht: Kluwer, 2005. p. 391-413

AWASTHI, T.; PANT, N.; DAHAL, P. Prevalence of Multidrug Resistant Bacteria in Causing Community Acquired Urinary Tract Infection Among the Patients Attending Outpatient Department of Seti Zonal Hospital, Dhangadi, Nepal. **Nepal Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 55–9, 2015.

AYALA, J.; SILVA, A.; BENITEZ, J. H-NS: an overarching regulator of the *Vibrio cholerae* life cycle. **Research in Microbiology**, v. 168, p. 16-25, 2017.

AZMAN, A.; RUDOLPH, K.; CUMMINGS, D.; LESSLER, J. The incubation period of cholera: A systematic review. **Journal of Infection**, v. 66, n. 11, p. 432-438, 2013.

BAKER-AUSTIN, C.; TRINANES, J.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; MARTINEZ-URTAZA, J. Non-Cholera *Vibrios*: The Microbial Barometer of Climate Change. **Trends in Microbiology**, p. 1-9, 2016.

BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANETTI, A.; BAFFONE, W.; FABBRI, A.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KUHN, I.; MOLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; DONELLI, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2748–2753, 1999.

BARUA, D. History of cholera. In: BARUA, D; GREENOUGH I, W.B. (eds.) **Cholera**. Plenum, 1991. p. 1-35.

BAUMANN, P.; FURNISS, A.; LEE, J. Genus I: *Vibrio* (Pacini, 1854), p. 518–538. In: KRIEG, N. R; HOLT, J. G. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. 1984.

BELLÉS-GARULERA. Variability of planktonic and epiphytic vibrios in a coastal environment affected by *Ostreopsis* blooms. **Scientia Marina**, v. 80, n. S1, p. 97-106, ISSN1886-8134, 2016.

BELTRÃO, J. **Cólera: o flagelo da Belém do Grão Pará**. Editora Universitaria UFPA, Goeldi editoração. 2002. 354 p.

BENNISH, M. Cholera: pathophysiology, clinical features, and treatment. In: WACHSMUTH, I.; BLAKE, P.; OLSVIK, A. (eds.) ***Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives**. ASM Press, Washington, D.C. 1994. p. 229–255.

BENTIVOGLIO, M.; PACINI, P. Filippo Pacini: A Determined Observer. **Brain Research Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 161-165, 1995.

BHATTACHARYA, D.; DEY, S.; PAZHANI, G.; RAMAMURTHY, T.; PARANDE, M.; KHOLKUTE, S.; ROY, S. *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant and emergence of Haitian *ctxB* variant in the strains isolated from South India. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, p. 195–200, DOI 10.1007/s00430-015-0433-y, 2016.

BIDAULT, A.; RICHARD, G.; BRIS, C.; PAILLARD, C. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. **PeerJ**, v. 3, N. :e1484, DOI 10.7717/peerj.1484, 2015.

BJELLAND, A.; FAUSKE, A.; NGUYEN, A.; ORLIEN, E.; ØSTGAARD, I.; SØRUM, H. Expression of *Vibrio salmonicida* virulence genes and immune response parameters in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). doi: **Frontiers in Microbiology**, v. 4, DOI: 10.3389/fmicb.2013.00401.401, p.78-89, 2013.

BLACKSTONE, G.; NORDSTRUM, L.; BOWEN, D.; MEYER, F.; IMBRO, P.; DEPAOLA, A. Use of a real time PCR assay for detection of the ctxA gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 2, p. 254–259, 2007.

BLAKE, P. Historical perspectives on pandemic cholera, p. 293–296. 1994. In: WACHSMUTH, K.: BLAKE, P.; OLSVIK, O (eds.) ***Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives**. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1994.

BLOKESCH, M. Chitin colonization, chitin degradation and chitin-induced natural competence of *Vibrio cholerae* are subject to catabolite repression. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 1898-912, 2012.

BLUFORD, J.; GAUTHIER, D.; COLASANTO, M.; RHODES, M.; VOGELBEIN, W.; HAINES, A. Identification of virulence genes in *Vibrio* spp. isolates from the 2009 Bermuda reef fish mortality event. **Journal Fish Disease**, doi:10.1111/jfd.12532, 2016.

BOLAÑOS, C.; CALZADA, N.; GONZÁLEZ, R.; DÍAZ, B.; GÓMEZ, G. Relación entre la expresión de TCP y autoaglutinación en cepas patogénicas de *Vibrio cholerae*. **Revista CENIC**, v. 40, n. 1, p. 45-48, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal Saúde. Monitoramento ambiental do *Vibrio cholerae*. <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/19567-monitoramento-ambiental-do-vibrio-cholerae>>. Acesso em: Fevereiro de 2017, 2015.

BRASIL. Maria Bernadete de Paula Eduardo e Elizabeth Marie Katsuya, da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, **Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE/SES-SP** SP, abril de 2014. BE CVE/ 3 Vol. 04 /No. 01/ 2014a.

BRASIL. **SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. INFORME TÉCNICO** N.º 01/(2014) C. Assunto: Ações de prevenção e controle da Cólera. 2014b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de Vigilância Epidemiológica da Cólera** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010. 170 p. : il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) A 1ª edição intitulou-se: Manual Integrado de Prevenção e Controle da Cólera. ISBN 978-85-334-1743-4. 2010.

BRASHER, W.; DE PAOLA, A.; JONES, D.; BEJ, K. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. **Current Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 101-107, 1998.

BROECK, V.; HORVATH, D.; DEWOLF, C. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1771–1775, 2007.

CABELLO, C.; GODFREY, P.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DOLZ, H.; MILLANAO, A. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 1917-1942, 2013.

CALDINI, G.; NERI, A.; CRESTI, S.; BODDI, V.; ROSSOLINI, M.; LANCIOTTI, E. High prevalence of *Vibrio cholerae* non-O1 carrying heat-stable-enterotoxin-climate river basin of central Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2934–2939, 1997.

CANTO, L.; SÁ, A.; FONSECA, E.; PELLEGRINI, M.; FREITAS, F.; LOUREIRO, C.; VICENTE, C. Occurrence and composition of class 1 and class 2 integrons in clinical and environmental O1 and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains from the Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 229–232, 2010.

CASH, A.; MUSIC, I.; LIBONATI, P.; SNYDER, J.; WENZEL, P.; HORNICK, B. Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. Clinical, serological, and bacteriologic responses to known inoculum. **Journal of Infectious Diseases**, v. 129, p. 45–52, 1974.

CECCARELLI, D.; CHEN, A.; HASAN, A.; RASHED, M.; HUQ, A.; COLWELL, R. Non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* carrying multiple virulence factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 1909 – 1918. doi:10.1128/AEM.03540-14, 2015.

CHAAND, M.; MILLER, KA.; SOFIA, MK.; SCHLESENER, C.; WEAVER, JWA.; SOOD, V.; DZIEJMAN, M. Type three secretion system island-encoded proteins required for colonization by non-O1/non-O139 serogroup *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, p. 2862–2869. doi:10.1128/IAI.03020-14, 2015.

CHAKRABORTY, S. S.; MUKHOPADHYAY, A. K.; ASAKURA, M.; YAMASAKI, S.; BHATTACHARYA, S. K.; NAIR, G. B.; RAMAMURTHY, T. Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR target to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *toxR* gene. **Journal of Medical Microbiology**, p. 805–808, 2006.

CHAMPION, OL.; COOPER, M.; JAMES, L. *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. **Microbiology**, v. 155, p. 1516–22, 2009.

CHARLES, R.; RYAN, A. Cholera in the 21st century. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, p. 472–477, 2011.

CHEN, L.; ZHENG, D.; LIU, B.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 44, doi: 10.1093/nar/gkv1239, 2015.

CHIMETTO, T.; SILVA, B.; MOREIRA, A.; VALLE, C.; ALVES, N.; CAVALCANTI, G.; GARCIA, G.; LOPES, R.; FRANCINI-FILHO, R.; DE MOURA, R.; THOMPSON, C.; THOMPSON, F. Diversity and ecological structure of vibrios in benthic and pelagic habitats along a latitudinal gradient in the Southwest Atlantic Ocean. **PeerJ**, v. 3, DOI 10.7717/peerj.741, 2015.

CHOMVARIN, C.; JUMROENJIT, W.; TANGKANAKUL, W.; HASAN, N.A.; CHAICUMPAR, K.; FAKSRI, K.; HUQ, A. Genotype and drug resistance of clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 in northeastern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 45, p. 1354–1364, 2014.

COLQUHOUN, D., SØRUM, H. Cloning, characterisation and phylogenetic analysis of the *fur* gene in *Vibrio salmonicida* and *Vibrio logei*. **Gene**, v. 296, p. 213–20, 2002.

COLWELL, R. Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. **Science**, v. 274, p. 2025–2031, 1996.

COLWELL, R.; BRAYTON, P.; GRIMES, D.; ROSZAK, D.; HUQ, S.; PALMER, L. Viable, but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms. **Bio/Technology**, v. 3, p. 817-820, 1985.

COLWELL, R.R.; KAPER, J.; JOSEPH, S.W. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. **Science**, v. 198, n. 4315, p. 394-396, 1977.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Isolamento e identificação de *Vibrio cholerae* em água e esgoto**: Norma Técnica Cetesb – L5.507, p. 55, 1992.

COTTER, G., DOYLE, K., KAVANAGH. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, p. 163–169, 2000.

COTTRELL, M.; KIRCHMAN, L. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. **Journal Limnology and Oceanography: Methods**, v. 48, p. 168–178, 2003.

COTTRELL, M.; KIRCHMAN, D. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1692–1697, 2000a.

COTTRELL, M.; WOOD, D.; YU, D.; KIRCHMAN, D. Selected chitinase genes in cultured and uncultured marine bacteria in the alpha and gamma-subclasses of the proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1195–1201, 2000b.

CHUN, J.; RIVERA, I.N.G.; COLWELL, R.R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2202-2208, 1999.

DALSGAARD, A.; FORSLUND, A.; SANDVANG, D.; ARNTZEN, L.; KEDDY K. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the aadA2 gene located on class 1 integrons. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 827–838. PMID: 11733467. 2001.

DALSGAARD, A.; FORSLUND, A.; PETERSEN, A.; BROWN, J.; DIAS, F.; MONTEIRO, S. Class 1 integron-borne, multiple - antibiotic resistance encoded by a 150-kilobase conjugative plasmid in epidemic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Guinea-Bissau. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3774–3779. PMID: 11015401. 2000.

DE SÁ, L.; RODRIGUES, E.; DE OLIVEIRA, E.; DE JESUS, I.; MENDONÇA, N.; THEOPHILO, G.; DA SILVA, F.; HOFER, E.; LOUREIRO, E. Vigilância ambiental para cólera na região metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 a 2006. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p. 449 - 466, 2007.

DEBES, A.; CHAKRABORTY, S.; ALI, M.; SACK, D. Manual for Detecting *Vibrio cholerae* O1 and O139 from Fecal Samples and from Environmental Water Using a Dipstick Assay. **From the DOVE Project**, p. 1-13. 2014.

DENNER, E.; VYBIRAL, D.; FISCHER, U.; VELIMIROV, B.; BUSSE, H. *Vibrio calviensis* sp. nov., a halophilic, facultatively oligotrophic 0.2 micron-filterable marine bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 549– 553, 2002.

DESBOIS, A.; COOTE, P. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1785–1790, doi:10.1093/jac/dkr198, 2011.

DICK, M.; GUILLERM, M.; MOUSSY, F.; CHAIGNAT, C. Review of Two decades of cholera diagnostics – how far have we really come?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, N. 10, p. 1–8, 2012.

DORSCH, M.; LANE, D.; STACKEBRANDT, E. Towards a Phylogeny of the Genus *Vibrio* Based on 16s rRNA Sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, vol. 42, n. 1, p. 58-63, 1992.

DRAKE, L.; DOBLIN, A.; ANDDOBBS, C. Potential microbial bioinvasions via ship's ballast water, sediment and biofilm. **Marine Pollution Bulletin**, v. 55, p. 333–341. 2007.

DRAKE, L. A.; MEYER, A. E.; FORSBERG, R. L.; BAIER, R. E.; DOBLIN, M. A.; HEINEMANN, S. Potential invasion of microorganisms and pathogens via “interior hull fouling”: biofilms in side ballast water tanks. **Biological Invasions**, v. 7 p. , 969–982, 2005.

DREWS, G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 225–249, 2000.

DUPKE, S.; AKINSINDE, A.; GRUNOW, R.; IWALOKUN, A.; OLUKOYA, K.; OLUWADUN, A.; VELAVAN, P.; JACOB, D. Characterization of *Vibrio cholerae* strains isolated from the Nigerian cholera outbreak in 2010. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 2618 –2621, doi:10.1128/JCM.01467-16, 2016.

DZIEJMAN, M.; SERRUTO, D.; TAM, V.; STURTEVANT, D.; DIRAPHAT, P.; FARUQUE, S. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 9, p. 3465–3470, 2005.

DZIEJMAN, M.; BALON, E.; BOYD, D.; FRASER, C.; HEIDELBERG, K.; MEKALANOS, J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 1556–1561, 2002.

EIBACH, D.; HERRERA-LEÓN, S.; GIL H.; HOGAN, B.; EHLKES, L.; ADJABENG, M.; BENNO, K.; NAGEL, M.; OPARE, D.; FOBIL, J.; MAY, J. Molecular Epidemiology and Antibiotic Susceptibility of *Vibrio cholerae* Associated with a Large Cholera Outbreak in Ghana in 2014. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004751. doi:10.1371/journal.pntd.0004751, 2016.

ELFVING, C.; ANDERSSON, M.; MSELLEM, M.; WELINDER-OLSSON, C.; PETZOLDD, M.; BJÖRKMANE, A.; TROLLFORS, B.; MÅRTENSSONE, A.; LINDHA, M. Real-time PCR threshold cycle (Ct) cut-offs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar **Journal of Clinical Microbiology**, doi:10.1128/JCM.02697-13 2014.

EPSTEIN, P.R. Algal blooms in the spread and persistence of cholera. **BioSystems.**, v. 31, p. 209-221, 1993.

ESTEVEZ, K.; HERVIO-HEATH, D.; MOSSER, T.; RODIER, C.; TOURNOUD, G.; JUMAS- BILAK, E.; COLWELL, R.; MONFORT, P. Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in French Mediterranean coastal lagoons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 7600 –7609. doi:10.1128/AEM.01848-15, 2015.

FARUQUE, S. M.; NAIR, G. B. Epidemiology. P. 385-398. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. **The Biology of Vibrios**. Washington, D. C.: ASM Press, 2006.

FARUQUE, M.; MEKALANOS, J. Pathogenicity islands and phages in *V. cholerae* evolution. **Trends Microbiology**, v. 1, p. 505-510, 2003.

FARUQUE, S. M. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3752-3757, 1998.

FASANO, A.; BAUDRY, B.; PUMPLIN, W.; WASSERMAN, S.; TALL, D.; KETLEY, M.; KAPER, B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 5242-5246, 1991.

FERDOUS, J.; HOSSAIN, Z.; TULSIANI, S.; RASHID, R.; JENSEN, P.; BEGUM, A. Optimization and Validation of Real Time PCR Assays for Absolute Quantification of toxigenic *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **Tropical Biomedicine**, v. 33, N. 4, p. 641–651, 2016.

FISHER, G.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, v.138, p. 1462–1470, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines**. (Microbiological risk assessment series. Roma: FAO, n.3, p. 61. 2003.

FYKSE, E.; NILSEN, T.; DESSEN, A.; TRYLAND, I.; DELACROIX, S.; BLATNY, J. Real-time PCR and NASBA for rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* in ballast water. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64 p. 200–206, 2012.

FYKSE, E.M.; SKOGAN, G.; DAVIES, W.; OLSEN, J.S.; BLATNY, M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1457–1466, 2007.

GABRIEL, M.; MATSUI, G.; FRIEDMAN, R.; LOVELL, C. Optimization of multilocus sequence analysis for identification of species in the genus *Vibrio*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, p. 5359–5365, 2014.

GARG, P.; AYDANIAN, A.; SMITH, D.; MORRIS, G.; NAIR, B.; STINE, C. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 7, p. 810, 2003.

GARAY, E.; ARNAU, A.; AMARO, C. Incidence of *Vibrio cholerae* and related Vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 426-430, 1985.

GDOURA, M.; SELLAMI, H.; NASFI, H.; TRABELSI, R.; MANSOUR, S.; ATTIA, T.; NSAIBIA, S.; VALLAEYS, T.; GDOURA, R.; SIALA, M. Molecular Detection of the Three Major Pathogenic *Vibrio* Species from Seafood Products and Sediments in Tunisia Using Real-Time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 12, p. 2086–2094, doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-205, 2016.

GENNARI, M.; GHIDINI, V.; LLEO, M. Virulence genes and pathogenicity islands in environmental *Vibrio* strains non-pathogenic to humans. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, p. 563–573, 2012.

GEROLOMO, M.; FERNANDES, M. Os Primeiros Cinco Anos da Sétima Pandemia de Cólera no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS 1999**, v. 8, N. 3, p. 49-58, 1999.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; DEPEER, Y. V.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.

GHOSH-BANERJEE, J.; SENOH, M.; TAKAHASHI, T.; HAMABATA, T.; BARMAN, S.; KOLEY, H.; MUKHOPADHYAY, AK.; RAMAMURTHY, T.; CHATTERJEE, S.; ASAKURA, M.; YAMASAKI, S.; NAIR, GB.; TAKEDA, Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4283-4286, 2010.

GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, C.; MATSUMURA, Y.; SAWABE, T.; IIDA, T.; CHRISTEN, R.; THOMPSON, F.; SAWABE, T. The Family *Vibrionaceae*. In: ROSENBERG, E.; DELONG, F.; THOMPSON, F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E. (eds.) **The Prokaryotes**, 4th ed, New York: Springer, 2014. p. 659-747.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.; TRON-MAYEN, L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 163, p. 1-9, 1998.

GRIESCH, J.; WEDDE, M.; VILCINSKAS, A. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 461-72, 2000.

GRISEZ, L.; REYNIERS, J.; VERDONCK, L.; SWINGS, J.; OLLEVIER, F. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae from two hatcheries, during larval development. **Aquaculture**, v. 155, p. 387-399, 1997.

GUBALA, A. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 2, p. 278-293, 2006.

GUPTA, P.; PANT, N.; BHANDARI, R.; SHRESTHA, P. Cholera outbreak caused by drug resistant *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotype El Tor serotype Ogawa in Nepal; a cross-sectional study. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 5, n. 23 DOI 10.1186/s13756-016-0122-7, 2016.

HABIB, C.; HOUEL, A.; LUNAZZI, A.; BERNARDET, J.; OLSEN, A.; NILSEN, H.; TORANZO, A.; CASTRO, N.; NICOLAS, P.; DUCHAUD, E. Multilocus Sequence Analysis of the Marine Bacterial Genus *Tenacibaculum* Suggests Parallel Evolution of Fish Pathogenicity and Endemic Colonization of Aquaculture Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5503-5514, 2014.

HALEY, B.; GRIM, C.; HASAN, N.; CHOI, S.; CHUN, J.; BRETTIN, T.; BRUCE, D.; CHALLACOMBE, J.; DETTER, C.; HAN, C.; HUQ, A.; COLWELL, R. Comparative genomic analysis reveals evidence of two novel *Vibrio* species closely related to *V. cholerae*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 154 doi: 10.1186/1471-2180-10-154, 2010.

HANAGE, P.; FRASER, C.; SPRATT, G. Fuzzy species in recombinogenic bacteria. **BMC Biology**, v. 6, doi:10.1186/, p. 3-6, 2005.

HANDA, S. Cholera. 2007. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/med/TOPI351.HTM>>. Acesso em: maio 15 de 2013.

HARRIS, J.; LAROCQUE, R.; QADRI, F.; RYAN, E.; CALDERWOOD, S. Cholera. **Lancet**, n. 379, p. 2466-2476, 2012.

HASHIZUME, M.; CHAVES, LF.; FARUNQUE, G.; YUNUS, MD.; STREATFIELD, K.; KAZUHIKO, A. differential effect of Indian Ocean Dipole and El Nino on cholera dynamics in Bangladesh. **PLoS ONE**, v.8, n. 3, 2013.

HASHIZUME, M.; ARMSTRONG, B.; HAJAT, S.; WAGATSUMA, Y.; FARUQUE, AS.; HAYASHI, T. The effect of rainfall on the incidence of cholera in Bangladesh. **Epidemiology**, v. 19, p. 103–110, 2008.

HASSANSHAHIAN, M.; YAKIMOV, M.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; CAPPELLO, S. Using Real-time PCR to assess changes in the crude oil degrading microbial community in contaminated seawater mesocosms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 93, p. 241-248, 2014.

HEDLUND, B.; STALEY, J. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 61–66, 2001.

HEIDELBERG, J. F.; HEIDELBERG, B.; COLWELL, R. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5488–5497, 2002.

HEIDELBERG, J. F.; EISEN, J.; NELSON, W.; CLAYTON, R.; GWINN, M.; DODSON, R.; HAFT, D.; HICKEY, E.; PETERSON, J.; UMayAM, L.; GILL, S.; NELSON, K.; READ, T.; TETTELIN, H.; RICHARDSON, D.; ERMOLAEVA, M.; VAMATHEVAN, J.; BASS, S.; QIN, H.; DRAGOI, I.; SELLERS, P.; MCDONALD, L.; UTTERBACK, T.; FLEISHMANN, R.; NIERMAN, W.; WHITE, O.; SALZBERG, S.; SMITH, H.; COLWELL, R.; MEKALANOS, J.; VENTER, J. C.; FRASER, C. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, v. 406, p. 477–484, 2000.

HERRINGTON, A.; HALL, H.; LOSONSKY, G.; MEKALANOS, J.; TAYLOR, K.; LEVINE, M. Toxin, toxin-coregulated pili and the *toxR* regulation are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, p. 1487-1492, 1988.

HEYMANN, D. *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139. In: Control of communicable diseases manual. 19th ed. Washington, DC: **American Public Health Association**, 120–128, 2008.

HIRK, S.; HUHULESCU, S.; ALLERBERGER, F.; LEPUSCHITZ, S.; REHAK, S.; WEIL, S.; GSCHWANDTNER, E.; HERMANN, M.; NEUHOLD, S.; ZOUFALY, A.; INDRA, A. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 after exposure to Austrian bathing sites. **Wien Klin Wochenschr**, v. 128, p. 141–145. 2016.

HOLMGREN, J.; SVENNERHOLM, M. Mechanisms of disease and immunity in cholera: a review. **Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 105-112, 1977.

HORNICK, R.; MUSIC, S.; WENZEL, R.; CASH, R.; LIBONATI, J.; SNYDER, M. The broad street pump revisited: response of volunteers to ingested cholera vibrios. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v.47, p.1181-1191. 1971.

HOWARD-JONES, N. Robert Koch and the cholera vibrio: a centenary. **British Medical Journal**, v. 288, p. 379-380, 1984.

HUANG, J.; ZHU, Y.; WEN, H.; ZHANG, S.; NIU, J.; LI, Q. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6981-6985, 2009.

HUGGETT, F.; TAYLOR, M.; KOCJAN, G.; EVANS, H.; MORRIS-JONES, S.; GANT, V.; NOVAK, T.; COSTELLO, A.; ZUMLA, A.; MILLER, R. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients **Thorax**, v. 63, p. 154–159, doi:10.1136/thx.2007.081687, 2008.

HUQ, A.; RIVERA, I.; COLWELL, R. Epidemiological significance of viable but non culturable microorganisms, In: COLWELL, R.; GRIMES, D. (eds.) **Nonculturable Microorganisms in the Environment**, Washington, D C: American Society for Microbiology, p. 301–323. 2000.

HUQ, A.; COLWELL, R.R. Vibrios in the marine and estuarine environments. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 3, p. 60-63. 1994.

HUQ, A.; COLWELL, R.; RAHMANN, R.; ALI, A.; CHOWDHURY, M.; PARVEEN, S.; SACK, D.; RUSSEK-CHOHEN, R. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 56, p. 2370-2373, 1990.

HUYS, L.; DHERT, P.; ROBLES, R.; OLLEVIER, F.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. **Aquaculture**, v. 193, p.25–372, 2001.

ICHINOSE, Y.; YAMAMOTO, N.; NAKASONE, J.; TANABE, T.; TAKEDA, T.; IWANAGA, M. Enterotoxigenicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 55, p. 1090-1093, 1987.

ISLAM, M.; DRASAR, B.; SACK, R. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: a review. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 87-96, 1994.

ISMAIL, H.; SMITH, M.; SOOKA, A.; KEDDY, H. Genetic characterization of multidrug-resistant, extended spectrum beta-lactamase-producing *Vibrio cholerae* O1 outbreak strains, Mpumalanga, South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2976–2979. doi: 10.1128/JCM.00293-11 PMID: 21653763. 2008.

ITOI, S.; KANOMATA, Y.; KOYAMA, Y.; KADOKURA, K.; UCHIDA, S.; NISHIO, T.; OKU, T.; SUGITA, H. Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1774, p. 1099–1107, 2007.

IVERSSON, L.; DA ROCHA, J.; ALVES, E.; PERRENOUD, J.; ARAÚJO, J.; MATTÉ, G.; ESCRIVÃO, A. Cólera no Brasil. **Saúde e Sociedade São Paulo**, v. 2, n. 1, p. 3-7, 1993.

JANDER, G.; RAHME, G.; AUSUBEL, M. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 3843–5, 2000.

JIANG, C.; MATTE, M.; MATTE, G.; HUQ, A.; COLWELL, R. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 148–153, 2000.

JOGLER, L.; MEYERDIERKS, A.; KUBE, M.; KATZMANN, E.; FLIES, C.; PAN, Y.; AMANN, R.; REINHARDT, R.; SCHÜLER, D. Toward cloning of the magnetotactic metagenome: identification of magnetosome island gene clusters in uncultivated magnetotactic bacteria from different aquatic sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 3972–9, 2009.

JOYNER, J.; WANLESS, D.; SINIGALLIANO, C.; LIPP, E. Use of Quantitative Real-Time PCR for Direct Detection of *Serratia marcescens* in Marine and Other Aquatic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1679–1683, 2014.

JUBAIR, M.; MORRIS, G.; ALI A., Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel “persister” phenotype, **PLoS ONE**, v. 7, n. 9. DOI 10.1371/journal.pone.0045187, 2012.

JUNG, A.; CHAPMAN, A.; NG, L. Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 4. doi: PMCID: PMC4398556, 2015.

JUTLA, A.; AKANDA, A.; GRIFFITHS, J.; COLWELL, R.; ISLAM, S. Warming oceans, phytoplankton, and river discharge: implications for cholera outbreaks, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n.2, p. 303–308, 2011.

KAPER, J.B.; FASANO, A.; TRUCKSIS, M. Toxins of *Vibrio cholerae*. In: *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives (WACHSMUTH, K.I., BLAKE, P.A. AND OLSVIK, O., Eds.), p. 145-176. **American Society for Microbiology**, Washington, DC. 1994.

KARAOLIS, K.; JOHNSON, A.; BAILEY, C.; BOEDEKER, C.; KAPER, B.; REEVES, R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3134-3139, 1998.

KASPAR, C.; TAMPLIN. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2425-2429, 1993.

KEBEDE, M.; TIMILSINA, S.; AYALEW, A.; ADMASSU, B.; POTNIS, N.; MINSAVAGE, G.; GOSS, M.; HONG, J.; STRAYER, A.; PARET, M.; JONES, J.; GARY, E. Vallad Molecular characterization of *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot of tomato in **Ethiopia Europena Journal Plant Pathology**, DOI 10.1007/s10658-014-0497-3, 2014.

KIRN, J.; JUDE, A.; TAYLOR, RK. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. **Nature**, v. 438, p. 863–866, 2005.

KITAOKA, M.; MIYATA, T.; UNTERWEGER, D.; PUKATZKI, S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. **Journal Medical Microbiology**, v. 60, p. 397–407, 2011.

KLEIN, S.; NAKATSU, C. The hot oyster: levels of virulent *Vibrio parahaemolyticus* strains in individual oysters. **FEMS Microbiology Ecology**, v.93, n.2, 2016.

KLOSE, KE. The suckling mouse model of cholera. **Trends Microbiology**, v. 8, p. 189–191, 2000.

KOCH, R. An address on cholera and its bacillus. **British Medical Journal**, v. 2, p. 403-407, 1884.

KONDO, K.; TAKADE, A.; AMAKO, K. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, p. 179–184, 1994.

KOVACH, E.; SHAFFER, D.; PETERSON, M. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. **Microbiology**, v. 142, p. 2165-2174, 1996.

KOVACIKOVA, G.; LIN, W.; TAYLOR, R.; SKORUPSK, I. The fatty acid regulator FadR influences the expression of the virulence cascade in the El Tor biotype of *Vibrio cholerae* by modulating the levels of ToxT via two different mechanisms. **Journal of Bacteriology**, Accepted Manuscript Posted Online 23 January 2017J doi:10.1128/JB.00762-16, 2017.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4015–4021. 1994.

KUCZYNSKI, D. Occurrence of pathogenic bacteria in surface water of an urban river in Argentina. **International Journal of Aquatic Science**, v. 7, n. 1, p. 30–38, ISSN: 2008-8019, 2016.

KUMAR, P.; MISHRA, K.; DESHMUKH, G.; JAIN, M.; ZADE, M.; INGOLE, KV.; YADAVA, P. Haitian variant *ctxB* producing *Vibrio cholerae* O1 with reduced susceptibility to ciprofloxacin is persistent in Yavatmal, Maharashtra, India, after causing a cholera outbreak. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. O292–O293, 2014.

KUMAR, P.; THULASEDHARAN, A.; CHOWDHURY, G.; RAMAMURTHY, T.; THOMAS, S. Characterization of novel alleles of toxin co-regulated pilus A gene (*tcpA*) from environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Current microbiology**, v. 62, p. 758–763, 2014.

LAVEZZO, L. C. **Caracterização das espécies de vibrios isoladas em amostras de água do mar, plâncton e bivalves da zona litorânea do estado de São Paulo**. 2015. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

LE ROUX, J.; VAN BLERK, N. Use of a high resolution melt real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for the environmental monitoring of *Vibrio cholerae*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 21, p. 3520–3526, 2011.

LE ROUX, F.; GAY, M.; LAMBERT, C.; NICOLAS, L.; GOUY, M.; BERTHE F. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. **Disease of aquatic organisms**, v. 58, p. 143–150. <http://dx.doi.org/10.3354/dao058143>, 2004.

LEAL, N.; TORRES DE ARAÚJO, C.; CAVALCANTI, V.; DA SILVA, S.; LEAL-BALBINO, T.; PAIVA DE ALMEIDA, A.; HOFER, E. Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from the aquatic basins of the State of Pernambuco, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p. 272–276, 2008.

LEE, S.; HAVA, D.; WALDOR, M.; CAMILLI, A. Regulation and Temporal Expression Patterns of *Vibrio cholerae* Virulence Genes during Infection. **Cell**, v. 99, p. 625–634, 1999.

LEIBOVICI-WEISSMAN, Y.; NEUBERGER, A.; BITTERMAN, R.; SINCLAIR, D.; SALAM, A.; PAUL, M. Antimicrobial drugs for treating cholera. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.6, N. CD008625. doi: 10.1002/14651858.CD008625.pub2, 2014.

LI, J.; AZAM, F.; ZHANG, S. Outer membrane vesicles containing signalling molecules and active hydrolytic enzymes released by a coral pathogen *Vibrio shilonii* AK1. **Environmental Microbiology**, v. 18, p. 3850–3866. doi:10.1111/1462-2920.13344, 2016.

LI, L.; MENDIS, N.; TRIGUI, H.; OLIVER, D.; FAUCHER, P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v.5, 2014.

- LI, J.; EGELMAN, E.; CRAIG, L. Structure of the *Vibrio cholerae* type IVb pilus and stability comparison with the *Neisseria gonorrhoeae* type IVa pilus. **Journal of Molecular Biology**, v. 418, n. 1, p. 47-64, 2012.
- LIN, W.; FULLNER, K. J.; CLAYTON, R.; SEXTON, A.; ROGERS, B.; CALIA, E.; MEKALANOS, J. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 3, p. 1071-1076, 1999.
- LIPPI, D.; GOTUZZO, E. The greatest steps towards the discovery of *Vibrio cholerae*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 191–1952, 2014.
- LIPP, K.; HUQ, A.; COLWELL, R. "Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p. 757-770, 2002.
- LIU, R.; QIU, L.; ZHAO, X.; ZHANG, H.; WANG, L.; HOU, Z.; GAO, D.; SONG. Variation analysis of pathogenic *Vibrio* spp. and *Pseudomonas* spp. in Changhai mollusc farming waters using real-time PCR assay during 2011–2014, **Marine Biology Research**, v. 12, p. 146-157, DOI: 10.1080/17451000.2015.1099679, 2016.
- LONG, A.; AZAM, F. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4975–4983, 2001.
- LOW, K.; ZAIN, M.; YEAN, C. A signal-amplified electrochemical DNA biosensor incorporated with a colorimetric internal control for *Vibrio cholerae* detection using shelf- ready reagents. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 256–263, 2017.
- LOWDEN, J.; SKORUPSKI, K.; PELLEGRINI, M.; CHIORAZZO, G.; TAYLOR, K.; KULL, J. Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 2860-2865, 2010.
- LUO, Y.; YE, J.; JIN, D.; DING, G.; ZHANG, Z.; MEI, L. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. **BMC Microbiology**, v. 13, N.52. doi: 10.1186/1471- 2180-13-52 PMID: 23497008, 2013.
- LUO, P.; HU, C. *Vibrio alginolyticus gyrB* sequence analysis and *gyrB*-targeted PCR identification in environmental isolates. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 82, p. 209–216, doi: 10.3354/dao01984, 2008.
- LUTZ, C.; ERKEN, M.; NOORIAN, P. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. **Frontiers in Microbiology**, doi:10.3389/fmicb.2013.00375, 2013.
- LYON W. J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4685–4693, 2001.
- MACHADO, H.; GRAM, L. The *fur* gene as a new phylogenetic marker for *Vibrionaceae* species identification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 2745–2752, 2015.
- MAIDEN, C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MAIN, C.; SALVITTI, R.; WHEREAT, B.; COYNE, J. Community-level and species-specific associations between phytoplankton and particle-associated *Vibrio* species in Delaware's inland bays. **Applied Environmental Microbiology**, v. 81, p. 5703–5713. doi:10.1128/AEM.00580-15, 2015.

MALORNY, B.; TASSIOS, T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39–48, 2003.

MANDAL, S.; MANDAL, D.; KUMAR, K. Cholera: a great global concern. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 573–80, 2011.

MANDOMANDO, I.; ESPASA M.; VALLÈS, X.; SACARLAL, J.; SIGAÚQUE, B.; RUIZ, J. Antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa isolated in Manhica District Hospital, southern Mozambique. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 662–664, 2007.

MARIN, A.; THOMPSON, C.; FREITAS, F.; FONSECA, E.; ABODERIN, O.; SAMBO, B.; ZAILANI, N.; KWARLEY, E.; QUARTEY, N.; OKEKE, A.; VICENTE, A. Cholera Outbreaks in Nigeria Are Associated with Multidrug Resistant Atypical El Tor and Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. e2049. doi:10.1371/journal.pntd.0002049, 2013.

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**. 192f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MARTINS, M.T., **Ecologia de *Vibrio cholerae* no ecossistema aquático**. Tese Livre docência ICB-USP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 1988.

MATERU, F.; LEMA, E.; MUKUNZA, M.; ADHIAMBO, G.; CARTER, Y. Antibiotic resistance pattern of *Vibrio cholerae* and *Shigella* causing diarrhoea outbreaks in the eastern Africa region: 1994–1996. **East African Medical Journal**, v. 74, p. 193–197, 1997.

MATSON, S.; WITHEY, H.; DIRITA, J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 5542–5549, 2007.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 608– 620. 2006.

MCCARTHY, S. Effects of temperature and salinity on survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in seawater. **Microbial Ecology**, v. 31, p. 167–175, 1996.

MCCLEARY, S., HENSHILWOOD, K. Novel quantitative TaqMan® MGB real-time PCR for sensitive detection of *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas*. **Inter-Research Diseases of Aquatic Organisms**, v. 114: p. 239–248.

MCDUGALD, D.; KJELLEBERG, S. Adaptive responses of *Vibrios*. In: THOMPSON, F.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. eds. **The biology of *Vibrios***. Washington D.C: American Society for Microbiology, p. 133–155, 2006.

MEHRABADI, F., MORSALI, P., NEJAD, R., IMANI, A. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR. **Journal of Infection and Public Health**, v. 5, n. 3, p. 263–267. 2012.

MEKALANOS, J.J. Cholera toxin: genetic analysis, regulation, and role in pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.118, p. 97-118, 1985.

MILLER, B.; SKORUPSKI, K.; LENZ, H.; TAYLOR, K.; BASSLER, L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. **Cell**, v. 110, n. 3, p. 303–14. PMID: 12176318, 2002.

MILLET, YA.; ALVAREZ, D.; RINGGAARD, S.; VON ANDRIAN, UH.; DAVIS, BM.; WALDOR, MK. Insights into *Vibrio cholerae* intestinal colonization from monitoring fluorescently labeled bacteria. **PLOS Pathogens**, v.10, n. e1004405, 2014.

MIYATA, M.; CASEY, W.; FRANK, F.; AUSUBEL, M.; DRENKARD, E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2404–2413, 2003.

MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL KHOURY, J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S.; AUSUBEL, F.; DIENER, A. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3842–3850, 2005.

MILTON, D. L. Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 61–71. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Orientações técnicas para o monitoramento ambiental do *Vibrio cholerae*** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 23 p. : il

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Orientações Técnicas para o Monitoramento ambiental do *Vibrio cholerae***. Brasília. p.20, 2014a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim eletrônico epidemiológico. Investigação de surto de diarreia aguda com isolamento de *V. cholerae* O1 OGAWA toxigênico no município de São Bento do Una-PE.** – Brasília. ANO 04, N° 08 p. 1-6. 30/11/2004.

MISHRA, A.; TANEJA, N.; SHARMA, M. Environmental and epidemiological surveillance of *Vibrio cholerae* in a cholera-endemic region in India with freshwater environs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 225–237, 2012.

MITRA, R.; FIGUEROA, P.; MUKHOPADHYAY, K. Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1928–1933, 2000.

MOORE, S.; SHANNON, L.; ZELAYA, E.; AZMAN, S.; LESSLER, J. Epidemic risk from cholera introductions into Mexico. **PLOS Currents Outbreaks**, Edition 1. DOI:10.1371/currents.outbreaks.c04478c7fbd9854ef6ba923cc81eb799. 2014.

MORRIS, J. Cholerae modern pandemic disease of ancient lineage. **Journal Emerging Infectious Diseases**, v. 104, n. 17, p. 2099, 2011.

MORRIS, J.; SZTEIN, B.; RICE, W.; NATARO, P.; LOSONSKY, A.; PANIGRAHI, P.; TACKET, O.; JOHNSON, J. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. **Journal Emerging Infectious Diseases**, v. 174, p. 1364-1368, 1996.

MORRIS, J.; GLENN, J. Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. **Epidemiologic Reviews**, v. 12, p. 179-191, 1990.

MOUNTFORT, D.; SMITH, K.; KIRS, M.; KUHAJEK, J.; ADAMSON, J.; WOOD, S. Development of single and multispecies detection methods for the surveillance and monitoring of marine pests in New Zealand. **Aquatic Invasions**, v. 7, n. 1, p. 125-128, 2012.

MUKHERJEE, K.; ALTINCICEK, B.; HAIN, T. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria pathogenesis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 310-7, 2010.

MWANSA, C.; MWABA, J.; LUKWESA, C.; BHUIYAN, A.; ANSARUZZAMAN, M.; RAMAMURTHY, T. Multiply antibiotic-resistant *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains emerge during cholera outbreaks in Zambia. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p. 847-853. PMID: 17121691, 2007.

NAHA, A.; PAZHANI, P.; GANGULY, M.; GHOSH, S.; RAMAMURTHY, T.; NANDY, K.; NAIR, B.; TAKEDA, Y.; MUKHOPADHYAY, K. Development and evaluation of a PCR Assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 1733-1736, 2012.

NAIR, B.; QADRI, F.; HOLMGREN, J.; SVENNERHOLM, M.; SAFA, A.; BHUIYAN, A.; AHMAD, S.; FARUQUE, SM.; FARUQUE, AS.; TAKEDA, Y.; SACK, A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p.4211-4213, 2006.

NAKASHIMA, Y.; OHO, M.; KUSABA, K.; NAGASAWA, Z.; KOMATSU, O.; MANOME, I.; NAKASHIMA, A. Chromogenic substrate culture plate for early identification of *Vibrio vulnificus* and isolation of other marine Vibrios. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 37, n. 4, p. 330-334, 2007.

NANDINI, S.; RAMIREZ, P.; SARMA, S. Water quality in Lake Xochimilco, Mexico: zooplankton indicators and *Vibrio cholerae*. **Journal of Limnology**, v. 75, n. 1, ISSN 1723-8633. Available at: <<http://jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2015.1213>>. Date accessed: 28 Jan. 2017. doi: <<http://dx.doi.org/10.4081/jlimnol.2015.1213>>, 2015.

NANDI, B. **A cólera no Brasil de 1991 a 2000: Perfil epidemiológico**. 2002. 192f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Programa em Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

NARRACCI, M.; ACQUAVIVA, I.; CAVALLO, A. Mar Piccolo of Taranto: *Vibrio* biodiversity in ecotoxicology approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v.21, p. 2378-2385. doi:10.1007/s11356-013-2049-3. 2014.

NELSON, E.; NELSON, D.; SALAM, M.; SACK, S. Antibiotics for both moderate and severe cholera, **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 1, p. 5-7, 2011.

NELSON, E.; HARRIS, J.; MORRIS, J.; CALDERWOOD, S.; CAMILLI, A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p. 693-702, 2009.

NEOGI, B.; KOCH, P.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; POHL, C.; KATTNER, G.; YAMASAKI, S.; LARA, J. Biogeochemical controls on the bacterial populations in the eastern Atlantic Ocean. **Biogeosciences**, v. 8, p. 3747-3759, 2011.

NESPER, J.; LAURIANO, M.; KLOSE, E.; KAPFHAMMER, D.; KRAIM, A.; REIDL, J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide, colonization and biofilm-formation. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 435-445, 2001.

NG, L., PEREZ, L., CONG, J., SEMMELHACK, F., BASSLER, L. Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in *vibrios*. **PLOS Pathogens**, v. 8 n. 6, doi: 10.1371/journal.ppat.1002767, 2012.

NIGRO, O.; STEWARD, G. Differential specificity of selective culture media for enumeration of pathogenic vibrios: Advantages and limitations of multi-plating methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 24-30, 2015.

NUIDATE, T., TANSILA, N., SAENGKERDSUB, S., KONGREUNG, J., BAKKIYARAJ, J., VUDDHAKUL, V. Role of Indole Production on Virulence of *Vibrio cholerae* Using *Galleria mellonella* Larvae Model. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 56, N. 3, p. 368-374. DOI 10.1007/s12088-016-0592-6, 2016.

ODEYEMI, O.; STRATEV, D. Occurrence of antimicrobial resistant or pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood, **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 93-98, 2016.

OLIVER, J. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 415-425, 2010.

OLIVER, J. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 93-100, 2005.

OLUMIDE, A.; ODEYEMI, A. Population dynamics, antibiotics resistance and biofilm formation of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from aquatic sources in Northern Malaysia. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 178-185, 2017.

OPINTAN, A.; NEWMAN, J.; NSIAH-POODOH, A.; OKEKE, N. *Vibrio cholerae* O1 from Accra, Ghana carrying a class 2 integron and the SXT element. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 929-933. 2008.

ORTIGOSA, M.; GARAY, E.; PUJALTE, J. Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, p. 216-225, 1994.

ORTIGOSA, M.; ESTEVE, M.; PUJALTE, J. *Vibrio* species in seawater and mussels: abundance and numerical taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 12, p. 316-325, 1989.

OSORIO, R.; KLOSE, E. A region of the transmembrane regulatory protein toxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. **Journal Bacteriology**, v. 182, p. 526-528, 2000.

PAL, A.; RAMAMURTHY, T.; BHADRA, K.; TAKEDA, T.; SHIMADA, T.; TAKEDA, Y.; NAIR, B.; PAL, C.; CHAKRABARTY, S. Reassessment of the prevalence of heat-stable enterotoxin (NAG-ST) among environmental *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from Calcutta, India, by using a NAG-ST DNA probe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2485-2489, 1992.

PASCUAL, J.; MACIÁN, C. M.; ARAHAL, D. R.; GARAY, E.; PUJALTE, J. Multilocus Sequence Analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB*, and *toxR* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 154-165, 2010.

PASCUAL, M.; RODO, X.; ELLNER, P.; COLWELL, R.; BOUMA, J. Cholera dynamics and El Nino-Southern oscillation. **Science**, v. 289, p. 1766–1769, 2000.

PASSOS A. Epidemia de Cólera no Sul do Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v.15,n.2, p.79-88, 1999. Em: BRASIL. **Informe sobre as Espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil**. Ministerio do meio ambiente. Rubens M. Lopes / IO-USP...[et al.], Editor. - Brasília:MMA/SBF, p. 440; il. color. (Série Biodiversidade, 33) ISBN 978-85-7738-120-3. 2009.

PEARSON, D.; CHIANG, A.; MEKALANOS, J. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3750-3754, 1993.

PELEG, Y.; MONGA, D.; PILLAI, S. Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 532–6, 2006.

PETTA, A., VICENTE, E., CAMPOS, T., NASCIMENTO, P. Identificação dos fatores de risco e concentração da Cólera na região de Maputo (Moçambique) e avaliação da sua distribuição espacial. **Revista de Geologia**, v. 24, n. 1, p. 37- 53, 2011.

PIERCE, N. F.; BANWELL, J. G.; MITRA, C.; CARANASOS, J.; KEIMOWITZ, I.; THOMAS, J.; MONDAL, A. Controlled comparison of tetracycline and furazolidone in cholera. **British Medical Journal**, v. 3, p. 277–280, 1968.

POLLITZER, R. **Cholera**, Geneva. World Health Organization (Monograph Series n. 43), 1959.

PROUTY, G.; KLOSE, E.; THOMPSON, L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. *Vibrio cholerae*: the genetics of pathogenesis and environmental persistence. In: **The biology of vibrios**, ASM. p. 311-339, 2006.

PUGLIESE, N.; MAIMONE, F.; SCRASCIA, M.; MATERU, F.; PAZZANI, C. SXT-related integrating conjugative element and IncC plasmids in *Vibrio cholerae* O1 strains in Eastern Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 438–442. doi: 10.1093/jac/dkn542 PMID: 19155226. 2009.

PUKATZKI, S.; MA, M.; STURTEVANT, D.; KRASINS, B.; SARRACINO, D.; NELSON, W. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 1528–1533, 2006.

RAMAMURTHY, T.; GRAG, S.; SHARMA, R. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. **Lancet**, n. 341, p. 703-704, 1993.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 70, N. e4392, doi:10.3791/4392, 2012.

RAMÍREZ, I.; GRADY, S. El Niño, Climate, and Cholera Associations in Piura, Peru, 1991–2001: A Wavelet Analysis. **EcoHealth**, v. 13, p. 83–99, DOI: 10.1007/s10393-015-1095-3, 2016.

RANDA, A.; POLZ, F.; LIM, E. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5469-5476, 2004.

RASHID, M.; RAHMAN, Z.; BURROWES, V.; PERIN, J.; MUSTAFIZ, M.; MONIRA, S.; SAIF-UR-RAHMAN, M.; BHUYIAN, S.; MAHMUD, T.; SACK, B.; SACK, D.; ALAM, M.; GEORGE, C. Rapid dipstick detection of *Vibrio cholerae* in household stored and municipal water in Dhaka, Bangladesh: CHoBI7 trial. **Tropical Medicine and International Health**, doi:10.1111/tmi.12797Tropical, 2016.

RAYCHOUDHURI, A.; PATRA, T.; GHOSH, K.; RAMAMURTHY, T.; NANDY, RK.; TAKEDA, Y.; BALAKRISHNAIR, G.; MUKHOPADHYAY, K. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 131–132, 2009.

REHNSTAM, A. S., BACKMAN, AZAM, F, HAGSTROM, A. Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 102, p. 161–166, 1993.

REICHEL, J.; BAUMAN, P.; BAUMAN, L. Study of genetic relationships among marine species of genera *Beneckea* and *Photobacterium* by means of in vitro DNA/DNA hybridization. **Archives of Microbiology**, v. 110, p. 101-120, 1976.

REIMER, R.; VAN DOMSELAAR, G.; STROIKA, S.; WALKER, M.; KENT, H.; TARR, C.; TALKINGTON, D.; ROWE, L.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; FRACE, M.; SAMMONS, S.; DAHOUROU, A.; BONCY, J.; SMITH, M.; MABON, P.; PETKAU, A.; GRAHAM, M.; GILMOUR, MW.; GERNER-SMIDT, P. *V. cholerae* Outbreak Genomics Task Force Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 2113–2121, 2011.

REEVES, P.; MESSINA, C.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**, v.158, p. 73–79. 2004.

RIGHETTO, L.; ZAMAN, R.; MAHMUD, Z.; BERTUZZO, E.; MARI, L.; CASAGRANDE, R.; GATTO, M.; ISLAM, S.; RINALDO, A. Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in environmental waters of rural Bangladesh: a flow-cytometry-based field trial. **Epidemiology and Infection**, v. 143, p. 2330–2342, doi:10.1017/S0950268814003252, 2015.

RINALDO, A.; BERTUZZO, E.; MARI, L.; RIGHETTO, L.; BLOKESCH, M.; GATTO, M. Reassessment of the 2010-2011 Haiti cholera outbreak and rainfall-driven multi season projections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 6602–6607. doi:10.1073/pnas.1203333109, 2012.

RITCHIE, J.M.; RUI, H.; BRONSON, R.T.; WALDOR, M.K. **MBio**, v. 1, n. e00047-10, 2010.

RITCHIE, J.M.; WALDOR, M.K. *Vibrio cholerae* interactions with the gastrointestinal tract: lessons from animal studies. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 337, p. 37–59, 2009.

RIVERA, I.; SOUZA, K.; SOUZA, P.; LOPES, R. Free-living and plankton-associated vibrios: assessment in ballast water, harbor areas, and coastal ecosystems in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, N. 443, p.1- 8, 2013.

RIVERA, I.N.G.; LIPP, E. K.; GIL, A.; CHOOPUN, N.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 599-606, 2003.

RIVERA, I. N. G.; CHUN, J.; HUQ, A.; SACK, R. B.; COLWELL, R. R. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2421-2429, 2001.

RIVERA, I. G.; CHOWDHURY, A.; HUQ, A.; JACOBS, D.; MARTINS, T.; COLWELL, R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2898-2904, 1995.

ROBERT-PILLOT, A.; COPIN, A.; HIMBER, C.; GAY, M.; QUILICI, M. Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 75–81, 2014.

RODRIGUE, C.; POPOVIC, T.; WACHSMUTH, K. Non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 infection in the United States, p. 69–76. In: WACHSMUTH, I.; BLAKE, P.; OLSVIK, R. (eds.) ***Vibrio cholerae* and cholera—molecular to global perspective**. American Society for Microbiology, Washington. D.C. 1994.

ROMALDE, J.; DIÉGUEZ, A.; LASA, A.; BALBOA, S. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1 - 11, doi: 10.3389/fmicb.2013.00413, 2014.

ROSENBERG, E.; BEN-HAIM, Y. Microbial diseases of corals and global warming. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 318–326, 2002.

RUBIO-PORTILLO, E.; YARZA, P.; PEÑALVER, P.; RAMOS-ESPLÁ, A.; ANTÓN, J. New insights into *Oculina patagonica* coral diseases and their associated *Vibrio* spp. communities. **The ISME Journal**, v. 8, p. 1794–1807; doi:10.1038/ismej.2014.33, 2014.

RUIMY, R.; BREITTMAYER, V.; ELBAXE, P.; LAFAY, B.; BOUSSEMAR, T. O.; GAUTHIER, M. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 416–426, 1994.

SACK, D.; SACK, R.; NAIR, G.; SIDDIQUE, A. Cholera, **Lancet**, v. 363, N. 9404, p. 223–233, 2004.

SAFA, A.; NAIR, G.; KONG, A. Revolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. **Cell: Trends in Microbiology**, v. 18, p. 46-54, 2009.

SAHA, K.; KOLEY, H.; NAIR, B. Purification and characterization of an extracellular secretogenic non-membranedamaging cytotoxin produced by clinical strains of *Vibrio cholerae* Non-O1. **Infection and Immunity**, v. 64, p.3101–3108, 1996.

SATITSRI, S.; PONGKORPSAKOL, P.; SRIMANOTE, P.; CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Pathophysiological mechanisms of diarrhea caused by the *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant: an in vivo study in mice. **Virulence**, v. 7, n. 7, p. 789–805, 2016.

SAWABE, T.; OGURA, Y.; MATSUMURA, Y.; FENG, G.; AMIN, A. R.; MINO, S.; NAKAGAWA, S.; SAWABE, T.; KUMAR, R. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. 414, 2013.

SAWABE, T.; KITA-TSUKAMOTO, K.; THOMPSON, F. Inferring the Evolutionary History of *Vibrios* by Means of Multilocus Sequence Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, No. 21, p. 7932–7936, 2007.

SAWABE, T.; SETOGUSHI, N.; INOUE, S.; TANAKA, R.; OOTSUBO, M.; YOSHIMIZU, M.; EZURA, Y. Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone *V. haliotocoli* association. **Aquaculture**, v. 219, p. 671–679, 2003.

SHELL, M.; LIPSCOMB, L.; DESHAZER, D. Comparative genomics and an insect model rapidly identify novel virulence genes of *Burkholderia mallei*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2306–2313, 2008.

SEED, D.; DENNIS, J. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 1267–1275, 2008.

SEDAGHAT, M.; RAHIMI, F.; TALEBI, M.; POURSHAFIE M. Serotyping Antibiotic Susceptibility Pattern and Detection of *hlyA* Gene Among Cholera Patients in Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 20–3. doi: 10.5812/jjm.4709, 2012.

SERRANO, P. H. **Responsible use of antibiotics in aquaculture**. FAO fisheries technical paper. n. 469, p. 97. Rome: FAO, 2005.

SHAW, K.; JACOBS, J.; CRUMP, B. Impact of Hurricane Irene on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* concentrations in surface water, sediment, and cultured oysters in the Chesapeake Bay, MD, USA. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 180–189, 2014.

SHARMA, C.; THUNGAPATHRA, M.; GHOSH, A.; MUKHOPADHYAY, A.; BASU, A.; MITRA, A.; BASU, I.; BHATTACHARYA, K.; TAKEDA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, S.; NAIR, G. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 756–763, 1998.

SHAW, E.; TAYLOR, K. *Vibrio cholerae* O395 *tcpA* pilin gene sequence and comparison of predicted protein structural features to those of type 4 pilins. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 3042–3049, 2014.

SHAW, E.; TAYLOR, K. *Vibrio cholerae* O395 *tcpA* pilin gene sequence and comparison of predicted protein structural features to those of type 4 pilins. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 3042–3049, 1990.

SHERR, E.; SHERR, F. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. **Antonie Leeuwenhoek**, n. 81, p. 293–308. 2002.

SHERR, E.; SHERR, B. Marine microbes: an overview, p. 13–46. In KIRCHMAN D. L. (eds.), **Microbial ecology of the oceans**. Wiley-Liss, London, United Kingdom, 2000.

SHIKUMA, J.; HADFIELD, G. Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **Biofouling**, v. 26, p. 39–46. doi:10.1080/08927010903282814, 2010.

SHRESTHA, T.; ADHIKARI, N.; MAHARJAN, R.; BANJARA, M.; RIJAL, K.; BASNYAT, S.; AGRAWAL, P. Multidrug resistant *Vibrio cholerae* O1 from clinical and environmental samples in Kathmandu city. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 104, 2015.

SINGH, D.; MATTE, M.; MATTE, R.; JIANG, S.; SABEENA, F.; SHUKLA, N.; SANYAL, C.; HUQ, A.; COLWELL, R. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal

Relationships between Clinical and Environmental Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 910–921, 2001.

SMITH, A.; NJANPOP-LAFOURCADE, B.; MENGEL, M.; GESSNER, B.; SAUVAGEOT, D.; BIDJADA, B.; MIWANDA, B.; SALIOU, D.; N'DOUBA, A.; LANGA, J.; ISMAIL, H.; TAU, N.; SOOKA, A.; KEDDY, K. Comparative Characterization of *Vibrio cholerae* O1 from Five Sub-Saharan African Countries Using Various Phenotypic and Genotypic Techniques. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142989. doi:10.1371/journal.pone.0142989. 2015.

SON, M.; MEGLI, C.; KOVACIKOVA, G.; QADRI, F.; TAYLOR, R. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype Variant Clinical Isolates from Bangladesh and Haiti, Including a Molecular Genetic Analysis of Virulence Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, N. 112011, p. 3739–3749, 2011.

SOTO, W.; GUTIERREZ, J.; REMMENG, M.; NISHIGUCHI, N. Salinity and Temperature Effects on Physiological Responses of *Vibrio fischeri* from Diverse Ecological Niches. **Microbial Ecology**, v. 57, p.140–150, 2009.

SOTOMAYOR, A., BALCÁZAR, L. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. **Revista Aquatic**, v. 19, p. 9-15, 2003.

SOUZA, K. **Caracterizacao clonal de cepas de Vibrio cholerae isoladas nos estados de Sao Pulo e Paraíba através da técnica de ribotipagem**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SUANTIKA, G.; DHERT, P.; ROMBAUT, G.; VANDENBERGHE, J.; DE WOLF, T.; SORGELOOS, P. The use of ozone in a high density recirculation system for rotifers. **Aquaculture**, v. 201, p. 35–49, 2001.

SU, Y.; DUAN, J.; WU, W. Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 7, p. 1454-1456, 2005.

SWERDLOW, D.; RIES, A. *Vibrio cholerae* Non-O1 the 8th pandemic? **Lancet**, n 342, p. 382-83, 1993.
TALL, A.; HERVIO-HEATH, D.; TEILLON, A.; BOISSET-HELBERT, C.; DELESMONT, R.; BODILIS, J.; TOURON-BODILIS, A. Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyrH sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1713--1724, 2013.

TAMINIAU, B.; KORSACK, N.; LEMAIRE, C.; DELCENSERIE, V.; DAUBE, G. Validation of real-time PCR for detection of six major pathogens in seafood products Food. **Control**, v. 44, p. 130-137, 2014.

TAYLOR, R. K.; MILLER V.L.; FURLONG, J.J.; MEKALANOS, B. The use of *phoA* gene fusion to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 84 p. 2833-37, 1987.

TIRAPATTANUN, A.; CHOMVARIN, C.; WONGBOOT, W.; KANOKTIPPORNCHAI, B. Application of SYBR Green Real-Time PCR for Detection of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic Environment Chiang Mai **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 3, p. 588-598, 2015.

THOMPSON, C.; FREITAS, S.; MARIN, A.; FONSECA, L.; OKEKE, N.; VICENTE, C. *Vibrio cholerae* O1 lineages driving cholera outbreaks during seventh cholera pandemic in Ghana. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1951–1956. doi: 10.1016/j.meegid.2011.08.020 PMID: 21896336. 2011.

THOMPSON, C.; VICENTE, A.; SOUZA2, R.; VASCONCELOS, A.; VESTH, T.; ALVES, N.; USSERY, D.; IIDA, T.; THOMPSON, F. Genomic taxonomy of vibrios. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 1 - 16, 2009.

THOMPSON, C.; THOMPSON, L.; VICENTE, P. Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). **International Journal System Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 617-621, 2008.

THOMPSON, F.; GOMEZ-GIL, B.; VASCONCELOS, A.; SAWABE, T. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. **Applies Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4279-4285, 2007.

THOMPSON, L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5107–5115, 2005.

THOMPSON, C.; THOMPSON, F.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. **International Journal of Systematic Evolution of Microbiology**, v. 54, p. 919–924. 2004.

THOMPSON, F.; THOMPSON, C.; VICENTE, A.; THEOPHILO, D.; HOFER, E.; SWINGS, J. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by FAFLP analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1946–1950, 2003.

TRUCKSIS, M.; GALEN, E.; MICHALSKI, J.; FASANO, A.; KAPER, B. Accesory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of *Vibrio cholerae* virulence cassette. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 5267-5271, 1993.

TURNER, W.; MALAYIL, L.; GUADAGNOLI, D.; COLE, D.; LIPP, K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 1019–1028. doi:10.1111/1462-2920.12246, 2014.

URAKAWA, H.; YOSHIDA, T.; NISHIMURA, M.; OHWADA, K. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. **Environmental Microbiology**, v.2, p. 542–554, 2000.

VANDENBERGHE, J.; THOMPSON, F.; GOMEZ-GIL, B.; SWINGS, J. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 219, p. 9–20, 2003.

VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES-ARZARENA, L.; RIVERA, G.; BOLLAND, A.; BALLADARES, M.; GOMEZ-GIL, B.; CALDERON, J.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2592–2597, 1999.

VANDENBERGHE, J.; LI, Y.; VERDONCK, L.; LI, J.; SORGELOOS, P.; XU, S.; SWINGS, J. *Vibrios* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. **Aquaculture**, v. 169, p.121–132, 1998.

VERDONCK, L.; GRISEZ, L.; SWEETMAN, E.; MINKOFF, G.; SORGELOOS, P.; OLLEVIER, F.; SWINGS, J. *Vibrios* associated with routine productions of *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture**, v. 149, p. 203–214, 1997.

VERDONCK, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; DEHASQUE, M.; SORGELOOS, P.; LEGER, P. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionis plicatilis* and Artemia production systems. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 25, p. 55–59, 1994.

VEZZULLI, L.; BRETTAR, I.; PEZZATI, E.; REID, C.; COLWELL, R.; HÖFLE, G.; PRUZZO, C. Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the *Vibrios*. **The ISME journal**, v. 6, n. 1, p. 21-30, 2012.

VILA, J.; PAL, T. Update on antibacterial resistance in low-income countries factors favoring the emergence of resistance. **Open Infectious Diseases Journal**, v. 4, p. 38–54, 2010.

VISHWAKARMA, V.; SAHOO, S.; DAS, S.; RAYA, S.; HARDTB, W.; SUARA, M. Cholera toxin-B (ctxB) antigen expressing *Salmonella Typhimurium* polyvalent vaccine exerts protective immune response against *Vibrio cholerae* infection. **Vaccine**, v. 33, p. 1880–1889, 2015.

WAI, N.; MIZUNOE, Y.; TAKADE, A.; KAWABATA, S.; YOSHIDA, S. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3648-3655, 1998.

WALDOR, M.; RUBIN, J.; PEARSON, D.; KIMSEY, H.; Mekalanos, J. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX are encoded by region RS2. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 917–926, 1997.

WALDOR, W.; MEKALANOS, J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, v.272, p. 1910-1914, 1996.

WANG, Q.; MILLET, YA.; CHAO, MC.; SASABE, J.; DAVIS, BM.; WALDOR, MK. A genome-wide screen reveals that the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system modulates virulence gene expression. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 3381–3395, doi:10.1128/IAI.00411-15, 2015.

WATNICK, P. I.; LAURIANO, C. M.; KLOSE, K. E.; CROAL, L.; KOLTER, R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae*O139. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 223–235, 2001.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. **Molecular Microbiology**, v. 34, p. 586-595, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record, **Suiza**. NO 38, p. 433-440. 2016a

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epidemiological Update: Cholera. 12 September, Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2016b

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record **Suiza**. v. 89, n. 31, p. 345-356, 2014a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cholera. Fact sheet N°107. **Suiza**. 2014b. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>>. Acesso em: 02 dez 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention and control of cholera outbreaks: WHO policy and recommendations. p. 1 - 9. 2013.

<http://www.who.int/cholera/prevention_control/recommendations/en/index4.html>. Acesso em: 02 Fevereiro 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Update: outbreak of cholera —Haiti, MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. v. 59, N. 48, p. 1586–1590, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia. p. 46-47, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO guidance on formulation of national policy on the control of cholera. In: **WHO guidance on formulation of national policy on the control of cholera.. Suiza, p. 14, 1992.**

WONG, C.; WANG, P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 359-366, 2004.

XIAO, XL.; TIAN, C.; YU, YG.; WU, H. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and qPCR. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, p. 157-163, 2013.

XU, S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, L.; ATWELL, W.; GRIMES, J.; COLWELL, R. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology**, v. 8, p. 313-323, 1982.

YILDIZ, H.; SCHOOLNIK, G. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 4028-4033, 1999.

YOU, K.; BONG, C.; LEE, C. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio* spp. in tropical waters of Peninsular Malaysia. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 171 DOI 10.1007/s10661-016-5163-0, 2016.

YUMOTO, I.; IWATA, H.; SAWABE, T.; UENO, K.; ICHISE, N.; MATSUYAMA, H.; OKUYAMA, H.; KAWASAKI, K. Characterization of a facultatively psychrophilic bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that exhibits high catalase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 67–72. 1999.

ZAHID, M.; UDDEN, S.; FARUQUE, A.; CALDERWOOD, S.; MEKALANOS, J.; FARUQUE, S. Effect of Phage on the Infectivity of *Vibrio cholerae* and Emergence of Genetic Variants. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 5266–5273, doi:10.1128/IAI.00578-08, 2008.

ZAMPINI, M.; PRUZZO, C.; BONDRE, P.; TARSI, R.; COSMO, M.; BACCIAGLIA, A.; CHHABRA, A.; SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, S. *Vibrio cholerae* persistence in aquatic environments and colonization of intestinal cells: involvement of a common adhesion mechanism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 267–273, 2005.

ZHU, J.; MILLER, B.; VANCE, E.; DZIEJMAN, M.; BASSLER, L.; MEKALANOS, J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 3129–3134, 2002.

ZITZER, O.; NAKISBEKOV, O.; LI, V.; SEMIOTROCHEV, L.; KISELIOV, L.; MURATKHODJAEV, N.; KRASILNIKOV, V.; EZECHUK, V. Entero-cytolysin (EC) from *Vibrio cholerae* non-O1 (some properties and pore-forming activity). **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, v. 279, p. 494-504, 1993.

ZHOU, X.; MASSOL, H.; NAKAMURA, F.; CHEN, X.; GEWURZ, E.; DAVIS, M.; LENCER, I.; WALDOR, MK. Remodeling of the intestinal brush border underlies adhesion and virulence of an enteric pathogen. **mBio**, v. 5, n. 4e01639-14, 2014.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma metodologia para detecção e quantificação de *Vibrio cholerae* em amostras de água utilizando PCR em Tempo Real, bem como avaliar genes associados à virulência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os isolados de *víbrios* pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, utilizando métodos tradicionais e por meio da Análise de Sequência Multilocus (MLSA);
- Padronizar a detecção dos genes associados à virulência em isolados de *V. cholerae* utilizando PCR tradicional;
- Avaliar a virulência de isolados selecionados de *V. cholerae* em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*;
- Avaliar a susceptibilidade dos diferentes isolados a agentes antimicrobianos;
- Utilizar PCR em Tempo Real para detectar e quantificar *V. cholerae* e avaliar os genes de virulência;
- Avaliar a metodologia padronizada em amostras ambientais.

4 CAPÍTULO 1 - UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS CLÁSSICAS E MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DA FAMÍLIA *Vibrionaceae* DE AMBIENTES AQUÁTICOS NO BRASIL.

4.1.1 Introdução

No ecossistema marinho, os micro-organismos são os organismos mais numerosos, possuindo a maior diversidade genética, apesar da maior parte das espécies ainda permanecer desconhecida. O gênero *Vibrio* é autóctone desse ecossistema e pode estar em associação com outros organismos como crustáceos, peixes, ou plantas (BELLÉS-GARULERA et al., 2016; BJELLAND et al., 2013; HEIDELBERG et al., 2002). Além disso, existem indícios de que o gênero *Vibrio* exerça um papel essencial no ciclo de nutrientes nos ambientes aquáticos, degradando a matéria orgânica e disponibilizando-a para outros organismos (SHERR et al., 2000; 2002). Igualmente, participam da reciclagem de quitina, degradando a carapaça de copépodes (COTTRELL et al., 2000 a, b; COTTRELL et al., 2003; ITOI et al., 2007). Este gênero tem sofrido diversas modificações taxonômicas devido à sua complexidade genética. Deste modo, múltiplos genes constitutivos foram propostos como marcadores moleculares para uma adequada classificação das espécies (DORSCH et al., 1992; LE ROUX et al., 2004; SAWABE et al., 2007; THOMPSON et al., 2003).

Algumas espécies deste gênero podem ser patogênicas e apresentar perigo para a saúde humana e animal. Uma das principais espécies é *V. cholerae*, que pode causar a cólera, um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e algumas cepas, tais como *V. cholerae* O1 e O139 toxigênicas, têm sido associadas a epidemias e surtos pandêmicos. Os sorotipos “Não O1/Não O139” estão associados às gastroenterites esporádicas e os demais sorogrupos podem causar pequenos surtos de diarreia, além de outras doenças extraintestinais, como septicemia, cistite e celulite (AUSTIN, 2005; ROMALDE et al., 2014; WHO, 2013).

Os principais fatores responsáveis pela virulência e indução da diarreia e desidratação são as toxinas colérica (CT) e correguladora do pilus (TCP) (BROECK et al., 2007; KUMAR et al., 2014). No entanto, existem outros fatores de virulência que podem contribuir para a patogenicidade do micro-organismo (CECCARELLI et al., 2015). A virulência destes isolados tem sido avaliada em modelos humano e animal, verificando assim seu potencial patogênico (COLWELL et al., 1996; NUIDATE et al., 2016; SON et al., 2011). Finalmente, o uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento e profilaxia, assim como a intervenção antropogênica têm influenciado o aumento de cepas desta espécie com múltipla resistência a agentes antimicrobianos, caracterizando um problema para a saúde pública e dificultando

o tratamento em casos com desidratação moderada a severa da cólera (HEYMANN, 2008; KITAOKA et al., 2011; LEBOVICI-WEISSMAN et al., 2014; PIERCE et al., 1968).

4.1.2 Materiais e métodos

A estratégia proposta no trabalho foi dividida em duas etapas. A primeira etapa consistiu em realizar uma triagem de isolados da Família *Vibrionaceae* por métodos tradicionais para selecionar os prováveis *V. cholerae* e a segunda etapa consistiu na caracterização molecular dos genótipos presentes nesta população. As metodologias utilizadas foram primeiramente padronizadas utilizando isolados tipo de *V. cholerae*, assim como outras espécies do gênero *Vibrio*. As cepas controle foram uma doação do Laboratório de Micro-organismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ no Rio de Janeiro e pelo Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz - IAL, em São Paulo.

4.1.2.1 Cultivo e identificação presuntiva utilizando métodos tradicionais

Foram selecionados para o presente estudo 807 linhagens da família *Vibrionaceae* isoladas de diferentes fontes (água salgada, água doce, sedimento, plâncton e ostras), pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, coordenado pela Profa. Dra. Irma Rivera (Tabela 1; Apêndice A). Esses isolados haviam sido anteriormente caracterizados como pertencentes à família *Vibrionaceae*, por meio de provas bioquímicas e moleculares (ALMEIDA, 2009; ALVARADO, 1997; MARKMAN, 2008; MARTINS, 1988; SOUZA, 2001) e armazenados sob quatro diferentes formas: Agar Água Peptonada Alcalina - APA e Agar Simidu (SIMIDU; TSUKAMOTO, 1985) a temperatura ambiente (10 - 15 °C) e Glicerol 20% (-20 e -80 °C).

Para ativação, os isolados foram inoculados em tubos contendo Água Peptonada Alcalina (APA) e incubados a 28 °C por 24 horas (FDA, 2004). Após a incubação, as culturas bacterianas foram semeadas em placas contendo Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sais Biliares e Sacarose) (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), pelo método de esgotamento em placa e incubadas a 28 °C por 24 horas. As colônias características de *V. cholerae* (coloração amarela) foram preservadas em Agar APA e Tiosulfato a temperatura ambiente (10 - 15°C) e Glicerol 20% (-20 e -80 °C) (BURBANO, 2009) e posteriormente a identificação foi confirmada por métodos tradicionais e moleculares.

Tabela 1 - Relação dos isolados incluídos no estudo.

Origem	Ano de Coleta	Nº Total de Isolados
Água salgada	1981-1983	235
	2005-2007	
	2001-2002	247
Água doce	2004	19
	2010	42
	2014	52
Sedimento	1981-1983	26
Plâncton	2001-2002	113
Ostras (Moluscos Bivalves)	2001-2002	73
Total		807

Os isolados foram submetidos à confirmação de identidade como presuntivos *V. cholerae* utilizando três metodologias: 1) Coloração de Gram; 2) Teste de Oxidase; 3) Teste da Alça (String Test). A coloração de Gram foi realizada segundo BARTHOLOMEW, et al. (1954). O teste de Oxidase e o teste de alça foram realizados segundo as metodologias descritas por KOVACS (1956) e KEAST, et al. (1997), respectivamente.

4.1.2.2 Confirmação de *V. cholerae* por métodos moleculares

A confirmação dos isolados como pertencentes à espécie *V. cholerae* por métodos moleculares foi realizada por meio da Análise de Sequência Multilocus (MLSA), utilizando sete fragmentos de *housekeeping genes* (Adenilato quinase - *adk*; Subunidade B da DNA girase - *gyrB*; Metionina sintase - *metE*; Fosforibosil-formilglicinamida ciclo-ligase - *purM*; Dihidroorotase - *pyrC*; Malato desidrogenase - *mdh*; Piridina nucleotideo transidrogenase - *pntA*), descritos por Esteves, et al. (2015); Octavia, et al. (2013); Salim, et al. (2005) (Apêndice B).

A extração do DNA genômico dos micro-organismos foi realizada utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando as seguintes condições: 5 µL de solução tampão 10 X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 5,0 µL de solução mix de dNTPs a 2 mM (Invitrogen), 1,25 µL de cada solução dos iniciadores a 20 µM (Invitrogen), 0,5 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 34,5 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL), em um volume final de 50 µL.

As condições de amplificação dos genes foram: 94 °C por 2 minutos / 35 ciclos (94 °C por 15 segundos/ 50 °C por 30 segundos / 72 °C por 1 minuto e 30 segundos) / 72 °C por 5 minutos. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler*

ep *Gradient S* (Eppendorf, Nova York, NY, Estados Unidos) e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) (SAMBROOK et al., 1989).

Os produtos das reações de PCR amplificados para MLSA foram purificados utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao sequenciamento utilizando os iniciadores reverse descritos por Esteves, et al. (2015); Octavia, et al. (2013); Salim, et al. (2005); (Apêndice B). O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador *ABI 3730 DNA Analyser* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e por *373 0xl DNA analyzer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) de acordo com o protocolo utilizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo e pela empresa Macrogen.

4.1.2.3 Detecção de genes associados à virulência em *V. cholerae* por meio de PCR

A detecção por PCR de genes associados à virulência em *V. cholerae* foi realizada utilizando fragmentos dos principais genes associados a esta característica, relatados na literatura: *wbe* O1 que participa na biossíntese do antígeno O (específico para o sorogrupo O1), *wbe* O139 que está associado à biossíntese de lipopolissacarídeos (específico para o sorogrupo O139), a Subunidade A da Toxina Colérica (*ctxA*), o Fator de colonização co-regulado com a toxina colérica ("*toxin-coregulated pilus*" *tcpA*), e a enterotoxina termoestável de *V. cholerae* Não-O1 ("*heat-stable enterotoxin*" - NAG-ST (*st/sto*). Os fragmentos corresponderam a 647 pb (*wbe*), 741 pb (*wbe* O139), 564 pb (*ctxA*), 451 pb El Tor/620 pb clássico (*tcp*) e 172 pb (NAG-ST ou *st/sto*) (FIELDS et al., 1992; RIVERA et al., 2001; 2003; STROEHER; MANNING, 1997; YAMASAKI et al., 1999) (Apêndice C).

As reações de PCR para a detecção por PCR de genes associados à virulência em *V. cholerae* foram realizadas em um volume de 25 µL utilizando as condições a seguir: solução tampão com MgCl₂ a 1 X (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), solução mix de dNTPs a 0,2 mM (Promega), iniciadores a 0,8 µM (Sigma-Genosys, St. Louis, MO, EUA) (Apêndice C), 0,025 U da enzima GoTaq™ Polimerase (Promega) e DNA a 100 ng/µL. *V. cholerae* O139 (RC46) e *V. cholerae* O1 ATCC 14035 e *E. coli* ATCC 25922 foram incluídos como controles

positivo e negativo, respectivamente. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf, Nova York, NY, EUA). O produto das PCRs foi visualizado como descrito no Item 4.1.2.2.

4.1.2.3.1 Avaliação da virulência de isolados selecionados de V. cholerae em modelo invertebrado de Galleria mellonella.

Neste trabalho, lagartas de *G. mellonella* foram usadas para avaliar a virulência do isolado ATCC 14035 de *V. cholerae* de origem clínica e de quatro isolados de origem ambiental (Tabela 2).

4.1.2.3.1.1 Criação de *G. mellonella*

Larvas de *G. mellonella* foram obtidas e mantidas de acordo com Ramarao, et al. (2012). As mariposas foram conservadas em um recipiente plástico com cartolina preta ou papel filtro para a ovoposição e incubadas a 30 °C. Posteriormente, os ovos foram depositados em outro recipiente plástico contendo 5 g de pólen e 20 g de cera e incubados a 30 °C. Um acompanhamento semanal para monitorar o crescimento das lagartas foi realizado aproximadamente por 20 dias. Após este período foi realizada a limpeza das lagartas, retirando as teias e os casulos, assim como a distribuição em diferentes recipientes com alimento, segundo o tamanho das lagartas. Para este estudo, foram selecionadas lagartas com peso aproximado entre 250 - 300 mg e um tamanho de 2.0 - 2,5 cm de comprimento.

O ciclo completo deste organismo desde a mariposa adulta, passando pela obtenção dos ovos e a geração do estágio final da fase larval foi aproximadamente de sete semanas.

4.1.2.3.1.2 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *V. cholerae*

A concentração de células microbianas utilizada no experimento foi padronizada com o isolado ATCC 14035 de *V. cholerae*. Para o preparo do inóculo, o micro-organismo foi inoculado em tubos contendo caldo LB e incubados a 37 °C, com agitação a 150 rpm por 24 horas. Após a incubação, a cultura microbiana foi semeada em placa contendo Agar LB pelo método de esgotamento em placa e incubação a 37 °C por 24 horas. Uma colônia foi selecionada do ágar LB e foi inoculada em caldo LB e incubada a 37 °C, com agitação a 150 rpm por 24 horas. O crescimento foi suspenso em 5 mL de Solução Fisiológica Tampão Fosfato (PBS), pH 7.0 e centrifugado a 7700 x g por um minuto, o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido três vezes e o sedimento ressuspenso em 5 mL

de PBS. A contagem do número de células da suspensão microbiana foi realizada por meio do espectrofotômetro com um comprimento de onda de 600 nm a uma D.O de 1.0, o que corresponde aproximadamente a $1,0 \times 10^8$ UFC. A partir desta suspensão, diluições sucessivas foram realizadas para obter suspensões microbianas a uma concentração de 10^6 , 10^5 e 10^1 . A concentração dos micro-organismos foi confirmada por contagem em placa.

As lagartas de *G. mellonella* foram injetadas com um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada do isolado ATCC 14035 de *V. cholerae* na última prolegue esquerda, utilizando a seringa Hamilton de 10 µL (Hamilton Inc., EUA) (Figura 4). No grupo controle, foram injetados 10 µL de PBS estéril. Após as inoculações, as lagartas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C. O monitoramento das lagartas foi realizado a cada 24 horas após a inoculação dos micro-organismos, por um período de cinco dias. As lagartas foram consideradas como mortas quando não apresentavam nenhum movimento ao toque. Todos os experimentos foram repetidos 2 vezes, cada um utilizando 12 lagartas.

Figura 4 - Instrumento e metodologia de infecção de *Galleria mellonella* com isolados de *Vibrio cholerae*.

Legenda - [A]: Seringa de precisão (Hamilton Inc., EUA); [B]: Inóculo bacteriano injetado na hemolinfa da lagarta por meio da última prolegue esquerda, utilizando seringa Hamilton de 10 µL.

4.1.2.3.1.3 Susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção experimental por cinco isolados de *V. cholerae* caracterizados por métodos moleculares com a presença/ausência de fragmentos de genes associados à virulência (Curva de sobrevivência).

Cinco isolados de *V. cholerae* caracterizados por métodos moleculares com a presença/ausência de fragmentos de genes associados à virulência (*wbe* O1, *wbe* O139, *ctxA*, *tcpA* e *st/sto*) foram selecionados para este experimento (Tabela 2). As suspensões de cada micro-organismo foram preparadas como descrito no item 4.1.2.3.1.2 e selecionada a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC. Larvas de *G. mellonella* foram injetadas como descrito no

item 4.1.2.3.1.2. Após as inoculações, as lagartas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C. O monitoramento das lagartas foi realizado primeiramente 12 horas após a inoculação dos micro-organismos e posteriormente como descrito no item 4.1.2.3.1.2.

Tabela 2 - Isolados de *Vibrio cholerae* selecionados para avaliar a susceptibilidade à infecção experimental em *Galleria mellonella*.

Identificação	Sorogrupo pandêmico	Origem	Ano de Coleta	Presença/ausência (ctx/tcp/nag)
ATCC 14035	O1	Clínica	1964	+/-/-
NC 06	O1	Água doce	2010 -2014	-/-/-
NC 88	Não O1/O139	Água salgada		+/-/+
NC 89	Não O1/O139	Água salgada	1978 - 1994	-/+/+
NC 97	O1	Água salgada		+/-/-

Legenda - [+]: Presença; [-]: Ausência de fragmentos de genes associados à virulência em isolados de *V. cholerae* caracterizados por métodos moleculares.

4.1.2.3.1.4 Influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* em *G. mellonella*.

Foram selecionados para este experimento os isolados de *V. cholerae* NC 88, caracterizado pela presença dos fragmentos de genes associados à virulência avaliados (*ctxA*, *tcpA* e *st/sto*) e o isolado NC 06 com a presença unicamente do gene *wbe* O1 (Tabela 2). As suspensões de cada micro-organismo foram preparadas como descrito no item 4.1.2.3.1.2 e selecionadas as concentrações de $1,0 \times 10^6$, 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC. Larvas de *G. mellonella* foram inoculadas como descrito no item 4.2.3.1.2. Após as inoculações, as lagartas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 28 °C ou 37 °C. O monitoramento das lagartas foi realizado primeiramente 12 horas após a inoculação dos micro-organismos e posteriormente a cada 24 horas, como descrito no item 4.1.2.3.1.2.

Para avaliar a virulência, foi selecionado o isolado de *V. cholerae* NC 88, caracterizado com a presença dos três fragmentos de genes associados à virulência avaliados (*ctxA*, *tcpA* e *st/sto*) (Tabela 2). As suspensões foram preparadas como descrito no item 4.1.2.3.1.2 e selecionadas as concentrações de $1,0 \times 10^2$, 10^1 e 10^0 UFC. Larvas de *G. mellonella* foram injetadas como descrito no item 4.1.2.3.1.2. Após as inoculações, as lagartas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 28°C ou 37°C. O monitoramento das lagartas foi realizado primeiramente 12 horas após a inoculação dos micro-organismos e posteriormente a cada 24 horas, como descrito no item 4.1.2.3.1.2.

4.1.2.3.2 Teste de susceptibilidade aos antibióticos

Os isolados foram semeados em caldo APA e ágar TCBS, como descrito no item 4.1.2.1. A partir do ágar TCBS, cinco colônias microbianas foram inoculadas em caldo Luria-Bertani (LB) a 28 °C por 24 horas. A seguir, o inóculo foi semeado pelo método de esgotamento em placas de ágar LB e incubação a 28 °C por 24 horas. Cinco colônias foram selecionadas do ágar LB e inoculadas em caldo Mueller Hinton para padronização da absorbância a uma D.O de 1,0. Em seguida, a cultura microbiana foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) para determinação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos, de acordo com o teste de disco-difusão (BENSON, 1998) especificado pelo “*Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI*” para *V. cholerae*. Os seguintes antimicrobianos (Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico - CECOM, SP, BR) foram utilizados: ácido nalidíxico 30 µg (NAL), ampicilina 10 µg (AMP), ciprofloxacina 5 µg (CIP), cloranfenicol 30 µg (CLO), tetraciclina 30 µg (TET) e trimetoprima 5 µg (TRI) (CLSI, 2009).

4.1.2.4 Análise dos Resultados

4.1.2.4.1 Análise das sequências dos genes conservados (housekeeping)

Os cromatogramas foram avaliados e editados no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* BIOEDIT 7.2.5 e confirmados pelo programa MEGA7 (HALL, 1999; THOMPSON et al., 1994). Após a edição, as sequências foram comparadas com as sequências disponibilizadas no banco de dados *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI) e na base de dados do MLST de *V. cholerae* (<http://pubmlst.org/vcholerae/>) (Apêndice D). Árvores filogenéticas foram construídas individualmente para cada gene estudado, com a inserção de sequências de cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), utilizando o programa MEGA 7 e o método de *Neighbor-joining* com *bootstrap* de 1000 repetições. A similaridade (*Pairwise similarity*) entre os isolados e as sequências referências foi calculada pelo programa MEGA 7.

4.1.2.4.2 Análises da avaliação da virulência de isolados selecionados de *V. cholerae* em modelo invertebrado de *G. mellonella*.

Os dados coletados da sobrevivência e mortalidade de *G. mellonella* após o inóculo com *V. cholerae* foram analisados com o programa Prisma 5.0.0. utilizando o algoritmo Kaplan-Meier.

4.1.3 Resultados

4.1.3.1 Cultivo e identificação presuntiva utilizando métodos tradicionais

Das 807 linhagens da família *Vibrionaceae* selecionadas, 342 (42,38%) apresentaram colônias características de *V. cholerae*, das quais 26,40% (213) procediam de água salgada, 9,41% (76) de água doce, 3,22% (26) de sedimento, 2,11% (17) de plâncton 1,23% e (10) de ostras. Dos 57,62% (465) isolados restantes, 32,83% (265) cresceram em caldo APA, mas não cresceram em meio TCBS e 24,78% (200) cresceram em meio TCBS apresentando colônias verdes e azuis, indicando que eram micro-organismos não fermentadores de sacarose.

Dos 342 isolados que apresentaram colônias típicas de *V. cholerae*, 279 foram identificados como Gram negativos, mas somente 193 deram positivo para Oxidase e teste da Alça (String Test) e, portanto, foram selecionados para as avaliações subsequentes.

4.1.3.2 Confirmação de *V. cholerae* utilizando métodos moleculares

Os 193 isolados selecionados foram avaliados por meio da PCR para os *housekeeping* genes *adk*, *gyrB*, *metE*, *purM*, *pyrC*, *mdh*, *pntA*, sendo que apenas 70 apresentaram bandas para todos os genes avaliados, permitindo assim a sua caracterização pela técnica de *Multilocus sequence analysis* (MLSA) (Apêndice E).

As sequências dos genes individualmente foram comparadas com as sequências disponibilizadas no GenBank do NCBI e com as sequências da base de dados do MLST específicas para *V. cholerae*. Estes dados confirmaram que os isolados pertencem à espécie *V. cholerae*. No entanto, foi observado a partir da matriz de similaridade do programa *Mega 7* e da construção da árvore filogenética, que, com seis dos genes, a maior parte dos isolados apresentou similaridade superior de 99% com *V. cholerae*. Contudo, além de apresentar alta similaridade com as sequências de referência, foi característico que os isolados apresentaram um agrupamento entre eles mesmos com os genes *mdh*, *pntA*, *purM* e *pyrC*. Já com o gene *metE*, as porcentagens de similaridade dos isolados foram mais baixas, com um valor entre 83 e 91% com as referências das bases de dados, e entre os mesmos isolados apresentaram similaridades em torno de 99% (Tabela 3; Apêndice F - L).

Tabela 3 - Porcentagem de similaridade das sequências dos *Housekeeping genes* avaliados com as sequências disponibilizadas das bases de dados do GenBank e do MLST.

Gene	Tamanho da sequência (nt)	Similaridade (%) com Bases de dados de referência	Árvore filogenética
<i>adk</i>	550	99	Anexo F
<i>gyr B</i>	700	99	Anexo G
<i>mdh</i>	700	99	Anexo H
<i>met E</i>	750	entre 83 - 91	Anexo I
<i>pnt A</i>	550	99	Anexo J
<i>pur M</i>	550	99	Anexo K
<i>pyr C</i>	550	99	Anexo L

Legenda - [nt]: Nucleotídeos.

A árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *adk*, *gyrB*, *metE*, *purM*, *pyrC*, *mdh* e *pntA* dos isolados do estudo (aproximadamente 3.000 nucleotídeos), demonstrou a similaridade entre 86 e 99% entre eles (Apêndice M). Já na análise destas sequências comparadas com as disponibilizadas no GenBank do NCBI e na base de dados do MLST para *V. cholerae*, apresentaram similaridades entre 72,1 e 92,7%, e observou-se que os isolados do estudo estão mais relacionados entre eles mesmos do que com as sequências referência (Figura 5, Apêndice N). Portanto, foi realizada uma análise detalhada das sequências de cada um dos genes e observou-se uma variação na parte final das sequências dos genes *metE* (81 nucleotídeos), *purM* (76 nucleotídeos), *mdh* (81 nucleotídeos) e *pntA* (134 nucleotídeos), quando comparadas às sequências de referência.

Figura 5 - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos genes *adk*, *gyrB*, *metE*, *purM*, *pyrC*, *mdh*, *pntA* dos isolados de *Vibrio cholerae* de origem ambiental com as sequências disponíveis no NCBI e na base de dados do MLST de *V. cholerae*.

Legenda - Bootstrap < 50 foram removidos da figura. [AD]: água doce; [AS]: água salgada; [ASS]: sedimento. Árvore resumida tirando os isolados NC que apresentaram uma porcentagem de similaridade maior a > 99%.

4.1.3.3 Detecção por PCR de genes associados à virulência em *V. cholerae*

A detecção dos genes associados à virulência por métodos moleculares foi padronizada como descrito no item 4.1.2.3 das cepas confirmadas como *V. cholerae* no item 4.1.2.2. A distribuição dos fragmentos destes genes nos isolados incluídos no estudo encontra-se apresentada na tabela 4.

Foi observada a presença do fragmento do gene *wbe* O1 (específico para o sorogrupo O1) em 15 dos isolados, dos quais 13 foram isolados de água doce e 2 de água salgada. Nenhum dos 70 isolados apresentou o fragmento do *wbe* O139 (específico para o sorogrupo O139). O fragmento do gene que codifica a Subunidade A da Toxina Colérica (*ctxA*), esteve presente em 4 dos isolados de água salgada. O fragmento do gene que codifica o fator de colonização coregulado com a toxina colérica ("*toxin-coregulated pilus*" *tcpA*) evidenciou-se em 31 dos isolados, dos quais 4 foram isolados de água doce, 14 de água salgada e 13 de sedimento. Finalmente, o fragmento do gene que codifica a enterotoxina termoestável NAG-ST (*st/sto*) foi encontrado em 47 dos isolados, sendo que 2 foram isolados de água doce, 27 de água salgada e 18 de sedimento (Apêndice O).

Tabela 4 - Distribuição dos fragmentos dos genes associados à virulência em isolados de *Vibrio cholerae*.

Gene	Nº de isolados Positivos (%)			Total (n= 70)
	Água doce (n= 13)	Água Salgada (n= 36)	Sedimento (n= 21)	
<i>wbe</i> O1	13 (100)	2 (5,5)	0	15 (21,4)
<i>wbe</i> O139	0	0	0	0
<i>ctxA</i>	0	4 (11,1)	0	4 (5,7)
<i>tcpA</i>	4 (30,7)	14 (38,8)	13 (61,9)	31 (44,2)
NAG-ST (<i>st/sto</i>)	2 (15,3)	27 (75)	18 (85,7)	47 (67,14)

Legenda - [*wbe* O1]: gene que participa na biossíntese do antígeno O (específico para o sorogrupo O1); [*wbe* O139]: está associado à biossíntese de lipopolissacarídeos (específico para o sorogrupo O139); [*ctxA*]: Subunidade A da Toxina Colérica; [*tcpA*]: fator de colonização coregulado com a toxina colérica; [NAG-ST (*st/sto*)]: enterotoxina termoestável.

Nove perfis de genótipos dos genes associados à virulência foram obtidos (Tabela 5). Verifica-se que, dos setenta isolados selecionados, 31 (44,28%) apresentaram um único gene associado à virulência. Nove (29,03%) dos isolados de água doce apresentaram o fragmento do gene *wbe* O1, 1 (3,22%) isolado de água salgada o fragmento do gene *tcpA*, 16 (51,61%)

dos isolados de água salgada e 5 (16,14%) de sedimento apresentaram o fragmento do gene *st/st*. Finalmente, nove (12,85%) dos isolados de água salgada e sedimento não evidenciaram a presença de nenhum dos cinco fragmentos dos genes associados à virulência avaliados no estudo (Tabela 5).

Tabela 5 - Genótipos de virulência representativos em isolados de *Vibrio cholerae*.

Genótipo	Nº de isolados	Origem
<i>wbe</i> O1	9	AD
<i>tcp</i> A	1	AS
<i>st/sto</i>	21	AS/ASS
<i>wbe</i> O1 <i>tcp</i> A	2	AD
<i>tcp</i> A <i>st/sto</i>	22	AS/ASS
<i>wbe</i> O1 <i>tcp</i> A <i>st/sto</i>	2	AD
<i>wbe</i> O1 <i>ctx</i> A <i>tcp</i> A	2	AS
<i>ctx</i> A <i>tcp</i> A <i>st/sto</i>	2	AS
Ausência de Favs	9	AS/ASS

Legenda - [*wbe* O1]: gene que participa na biossíntese do antígeno O (específico para o sorogrupo O1); [*tcp*A]: fator de colonização corregulado com a toxina colérica; [*ctx*A]: Subunidade A da Toxina Colérica; [*st/sto*]: enterotoxina termoestável; [FAVs]: Fatores associados a virulência; [AD]: água doce; [AS]: água salgada; [ASS]: sedimento.

4.1.3.3.1 Avaliação da virulência de isolados selecionados de *V. cholerae* em modelo invertebrado de *G. mellonella*.

4.1.3.3.1.1 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *V. cholerae*

A verificação da susceptibilidade à infecção experimental de *G. mellonella* com o isolado de *V. cholerae* ATCC 14035 foi realizada como descrito no item 4.1.2.3.1.2. A concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC resultou em uma mortalidade de 100% das lagartas em um período de três dias, enquanto as concentrações entre 10^6 e 10^5 UFC resultaram em 50% (6) e 75% (9) de sobrevivência das lagartas ao quinto dia do estudo. Nenhuma larva morreu quando a suspensão inoculada tinha 10^1 UFC. Enquanto isso, com *Burkholderia* spp, Verificou-se uma sobrevivência de 20% (3) das lagartas até o quinto dia e o PBS estéril manteve a sobrevivência de 100% (12) das lagartas (Figura 6). Devido aos resultados obtidos neste experimento e ao relatado na literatura, foi selecionada a concentração de 1×10^6 UFC.

Figura 6 - Análise de sobrevivência de *Galleria mellonella* infectada com *Vibrio cholerae* em diferentes concentrações a 37 °C de temperatura.

Legenda - [PBS]: Solução Fisiológica Tampão Fosfato utilizada como controle; [*Burkholderia*]: Controle *Burkholderia* spp; [ATCC 14035 10⁸]: suspensão com uma concentração de células microbianas de *V. cholerae* de $1,0 \times 10^8$ UFC; [ATCC 14035 10⁶]: suspensão com uma concentração de células microbianas de *V. cholerae* de $1,0 \times 10^6$ UFC; [ATCC 14035 10⁵]: suspensão com uma concentração de células microbianas de *V. cholerae* de $1,0 \times 10^5$ UFC; [ATCC 14035 10¹]: suspensão com uma concentração de células microbianas de *V. cholerae* de $1,0 \times 10^1$ UFC. $P < 0.0001$.

4.1.3.3.1.2 Susceptibilidade à infecção experimental de *G. mellonella* por cinco isolados de *V. cholerae* caracterizados por métodos moleculares com a presença/ausência de fragmentos de genes associados à virulência (Curva de sobrevivência).

A verificação da susceptibilidade à infecção experimental de *G. mellonella* por cinco isolados de *V. cholerae* selecionados (Tabela 2), foi realizada como descrito no item 4.1.2.3.1.3. Observou-se como resultado que a utilização de uma suspensão microbiana equivalente a $1,0 \times 10^6$ UFC gerou a mortalidade de 100 % (12) das lagartas com os isolados NC 06 e NC 88 às 24 horas do estudo. O isolado NC 89 gerou a morte de 100 % (12) das lagartas no terceiro dia. Por último, ao quinto dia os isolados ATCC 14035 e NC 97 apresentaram uma porcentagem de sobrevivência das lagartas de 50 % (6) e 16,6 % (2), respectivamente (Figura 7). Os resultados mostraram que *G. mellonella* apresentou susceptibilidade tanto aos isolados que apresentavam um gene associado à virulência (NC 06) quanto aos que apresentavam três dos genes avaliados (NC 88) com 100 % de mortes das lagartas. Já a presença de dois ou três genes associados à virulência mostrou uma variação na resposta da susceptibilidade à infecção experimental, não evidenciando uma

relação clara entre a presença destes genes e a virulência dos isolados em *G. mellonella*, indicando que a temperatura de incubação, a concentração do inóculo, ou a presença de outros genes possam estar influenciando a infecção experimental.

Figura 7 - Análise de sobrevivência de *Galleria mellonella* infectada com cinco isolados de *Vibrio cholerae* a 37 °C de temperatura.

Legenda - [PBS]: Solução Fisiológica Tampão Fosfato utilizada como controle; [ATCC 14035]: Isolado de *V. cholerae* ATCC com o genótipo dos fatores associados a virulência *wbe* O1 +/+/-; [NC 06]: isolado caracterizado como *V. cholerae* com o genótipo dos fatores associados a virulência *wbe* O1 -/-/-; [NC 97]: isolado caracterizado como *V. cholerae* com o genótipo dos fatores associados a virulência *wbe* O1 +/+/-; [NC 89]: isolado caracterizado como *V. cholerae* com o genótipo dos fatores associados a virulência -/+/+; [NC 88]: isolado caracterizado como *V. cholerae* com o genótipo dos fatores associados a virulência +/+/+; A suspensão foi padronizada a uma concentração de células de *V. cholerae* de $1,0 \times 10^6$ UFC. $P < 0.0001$.

4.1.3.3.1.3 Influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* em *G. mellonella*.

Observou-se como resultado que, a uma temperatura de 28 °C, o isolado NC 06 com as suspensões microbianas mais concentradas (10^6 e 10^5 UFC), gerou mortalidade em 100 % das lagartas 24 horas após inoculadas. As suspensões menos concentradas (10^4 e 10^3 UFC) geraram a mortalidade de todas as lagartas às 48 horas do estudo. Porém, a 37 °C, os inóculos 10^6 , 10^5 e 10^4 geraram a mortalidade em 100 % das lagartas às 24 horas (Figura 8).

Com o isolado NC 88, foi observado que, a uma temperatura de 28 °C, e com suspensões mais concentradas (10^6 e 10^5 UFC), houve mortalidade de 58,3% (7) e 50 % (6) das lagartas às 24 horas do estudo. A 37 °C, as suspensões 10^6 , 10^5 e 10^4 geraram a mortalidade em 100% das lagartas às 24 horas, indicando uma maior virulência dos dois isolados testados a 37 °C com os inóculos de maior concentração (Figura 8).

Figura 8 - Influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *Vibrio cholerae* isolados NC06 e NC88 em *Galleria mellonella*.

Legenda - [A]: Avaliação a 28 °C da influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* NC06 em *G. mellonella*; [B]: Avaliação a 37 °C da influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* NC06 em *G. mellonella*; [C]: Avaliação a 28 °C da influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* NC88 em *G. mellonella*; [D]: Avaliação a 37 °C da influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* NC88 em *G. mellonella*. [PBS]: Solução Fisiológica Tampão Fosfato utilizada como controle negativo; Concentrações dos inóculos microbianos avaliados de $1,0 \times 10^6$ UFC, $1,0 \times 10^5$ UFC, $1,0 \times 10^4$ UFC e $1,0 \times 10^3$ UFC.

Com o isolado NC88, que apresentava três dos genes associados à virulência avaliados, observou-se que, a uma temperatura de 28 °C, e com concentrações da suspensão bacteriana equivalentes a $1,0 \times 10^2$, 10^1 e 10^0 , resultou a mortalidade em 25% (3), 8,3% (1) e em nenhuma das lagartas, respectivamente, às 24 horas do estudo. Já a 37 °C, avaliando as mesmas concentrações, foi gerada mortalidade em 50% (6), 41% (5) e em nenhuma das lagartas às 24 horas do estudo. Estes resultados evidenciam uma maior virulência da infecção a 37 °C, mesmo com os inóculos menos concentrados (Figura 9).

Finalmente, os experimentos para avaliar a susceptibilidade à infecção experimental de *G. mellonella* por isolados de *V. cholerae* com diversos genótipos dos genes associados à virulência mostraram uma relação entre a virulência dos isolados e a uma maior temperatura de incubação. No entanto, não ficou evidenciada uma relação clara entre a

presença destes genes e a susceptibilidade em *G. mellonella*, indicando que outros genes possam estar envolvidos na infecção experimental.

Figura 9 - Influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *Vibrio cholerae* isolado NC88 em *Galleria mellonella*.

Legenda - [A]: Avaliação a 28 °C da influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* NC88 em *G. mellonella*; [B]: Avaliação a 37 °C da influência da temperatura e concentração na patogenicidade de *V. cholerae* NC88 em *G. mellonella*; [PBS]: Solução Fisiológica Tampão Fosfato utilizada como controle negativo; Concentrações dos inóculos microbianos avaliados de $1,0 \times 10^2$ UFC, $1,0 \times 10^1$ UFC e $1,0 \times 10^0$ UFC.

4.1.3.3.2 Teste de Susceptibilidade aos antibióticos

O teste de susceptibilidade aos antibióticos foi realizado pelo método de disco-difusão, como descrito no item 4.1.2.3.2, nas cepas confirmadas como *V. cholerae* no item 4.1.2.2, utilizando seis antibióticos.

De modo geral, todos os isolados de *V. cholerae* foram sensíveis a ciprofloxacina (CIP) e tetraciclina (TET). Porém, dos 70 isolados caracterizados, 3 (4,28%) apresentaram exclusivamente resistência a ampicilina (AMP) e 1 (1,4 %) isolado (NC 33 - AS) apresentou resistência a ampicilina (AMP), a trimetropim (TRI) e apresentou um perfil intermediário para cloranfenicol (CLO).

Nos treze isolados caracterizados como *V. cholerae* de água doce, observou-se um perfil intermediário em 1 (7,69%) isolado para ampicilina (AMP) e em outro isolado para ácido nalidíxico (NAL). Todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO) e trimetropim (TRI) e nenhum apresentou resistência a nenhum dos antimicrobianos avaliados (Figuras 10 A; Apêndice P).

Entretanto, dos trinta e cinco isolados caracterizados como *V. cholerae* de água salgada, 2 (5,71%) isolados apresentaram resistência a ampicilina (AMP) e o total de isolados foram sensíveis a ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO) e trimetropim (TRI). Nenhum dos isolados apresentou perfil intermediário para nenhum dos antimicrobianos avaliados (Figuras 10 B; Apêndice P).

Por último, dos vinte e um isolados caracterizados como *V. cholerae* de sedimento, 1 (4,76%) isolado foi resistente a ampicilina (AMP) e todos foram sensíveis a ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO) e trimetropim (TRI). Nenhum dos isolados apresentou perfil intermediário para nenhum dos antimicrobianos avaliados (Figuras 10 C; Apêndice P).

Figura 10 - Perfil de susceptibilidade aos antibióticos (em porcentagem) dos isolados selecionados de *Vibrio cholerae*.

A.

Antibióticos	Resistente	Intermediário	Sensível
AMP	0,0	7,69	92,31
NAL	0,0	7,69	92,31
CIP	0,0	0,0	100
TET	0,0	0,0	100
CLO	0,0	0,0	100
TRI	0,0	0,0	100

B.

Antibióticos	Resistente	Intermediário	Sensível
AMP	5,71	0,0	94,28
NAL	0,0	0,0	100
CIP	0,0	0,0	100
TET	0,0	0,0	100
CLO	0,0	0,00	100
TRI	0,00	0,0	100

C.

Antibióticos	Resistente	Intermediário	Sensível
AMP	4,76	0,0	95,24
NAL	0,0	0,0	100
CIP	0,0	0,0	100
TET	0,0	0,0	100
CLO	0,0	0,0	100
TRI	0,0	0,0	100

Legenda - [AMP]: ampicilina; [NAL]: ácido nalidíxico; [CIP]: ciprofloxacina; [TET]: tetraciclina; [CLO]: cloranfenicol; [TRI]: trimetoprima; [A]: água doce; [B]: água salgada; [C]: água salgada - sedimento. Foi excluído deste gráfico o isolado que apresentou resistência a mais de um antimicrobiano.

4.1.4 Discussão

4.1.4.1 Cultivo e identificação presuntiva

Para isolar, identificar e estocar *V. cholerae* de amostras clínicas e ambientais, várias metodologias laboratoriais são utilizadas. A seleção apropriada destas metodologias vai depender de diversos fatores, como a origem da amostra, condições estruturais e econômicas do laboratório e os objetivos específicos das pesquisas (SANCHEZ, 1993). Levando em conta esses fatores, as metodologias utilizadas neste estudo para a identificação presuntiva de *V. cholerae* foram selecionadas segundo recomendado pelos órgãos de referência a nível nacional e internacional, que indicam o enriquecimento inicial da bactéria por meio de cultivo em caldo APA e posterior semeadura em placas com meio TCBS (BRASIL, 2010; CDC, 1999; FAO, 2004).

Os nossos resultados evidenciaram a utilidade do enriquecimento em caldo APA, sendo que a totalidade dos isolados (807) cresceu neste meio. O pH e as concentrações de sal que este meio oferece são essenciais para o desenvolvimento e viabilidade da maioria das espécies do gênero *Vibrio* e, ao mesmo tempo, inibem possíveis micro-organismos contaminantes (CECCHINI et al., 2016; FAO, 2004; FARMER et al., 2003; HUQ et al 2012). Além disso, as concentrações de peptona utilizadas no preparo do meio favorecem o crescimento de espécies de *Vibrio* de origem marinha (GOMEZ-GIL et al., 2003).

Por outro lado, o meio TCBS utilizado permitiu diferenciar isolados que apresentaram colônias características de *V. cholerae* (amarelas) de outras espécies como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, que formam colônias puntiformes esverdeadas idênticas, e não fermentam sacarose (GOMEZ-GIL; ROQUE, 2006; MORRIS et al., 1979; SU; LIU, 2007). No entanto, outras espécies do gênero *Vibrio*, como *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* e *V. mimicus*, formam colônias amarelas por serem sacarose positivos (KOBAYASHI et al., 1963; NAKANISHI, 1963). Também têm sido relatados *V. cholerae* fermentadores tardios de sacarose (RAMOS et al., 1997), o que geraria equívocos nas análises microbiológicas iniciais. Além disso, este meio permite o crescimento de micro-organismos do gênero *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp., e *Shewanella* sp., apresentando algumas características parecidas com as esperadas para *V. cholerae* (HUQ et al., 2012). Consequentemente, é recomendável associar as características do isolamento neste meio com outros testes adicionais para a identificação de *V. cholerae*.

Igualmente, o teste da alça e a prova da oxidase são utilizados de rotina em triagens de isolados suspeitos de serem *V. cholerae* de origem fecal. O primeiro é particularmente usado para diferenciar *Vibrio* spp. de *Aeromonas* spp. (WHO, 1999). Contudo, Keast, et al. (1997) avaliaram a sensibilidade e especificidade desta técnica na diferenciação entre espécies do gênero *Vibrio* e algumas enterobactérias e verificaram não ser específica. Portanto, neste estudo estas metodologias de triagem inicial foram de utilidade no sentido de direcionarem a seleção dos isolados pelas características metabólicas e fisiológicas com a finalidade de identificar *V. cholerae*. No entanto, para a confirmação dos isolados suspeitos, foi necessário adicionar outros tipos de metodologias.

Neste estudo, também foi observado que, do total de isolados de *V. cholerae*, menos da metade puderam ser recuperados, devido à dificuldade de se obter colônias em meio de cultura sólido. Entretanto, este resultado negativo em meio sólido não indica a ausência de micro-organismos, pois os mesmos podem entrar no estado denominado viável mas não cultivável (VNC do inglês *viable but not culturable*), caracterizado pela não formação de colônias em meio sólido, subestimando sua densidade populacional (RAMAMURTY et al., 1993; ROSZAK; COLWELL, 1987; XU et al., 1982).

4.1.4.2 Confirmação de *V. cholerae* utilizando métodos moleculares

Os genes conhecidos como *housekeeping genes* caracterizam-se por que divergem lentamente na escala evolutiva e exibem uma limitada variação da sua sequência (DANIN-POLEG et al., 2007). Esta é a razão pela qual as sequências destes genes têm sido utilizadas para determinar a relação filogenética entre micro-organismos (MOHAPATRA et al., 2009). Na família *Vibrionaceae*, os genes 16SrRNA, *gapA*, *gyrB*, *ftsZ*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* e *topA* permitiram a identificação de oito novos clados e de duas novas espécies no gênero *Vibrio* (AL-SAARI et al., 2015; GABRIEL et al., 2014; SAWABE et al., 2013).

Do mesmo modo, Thompson et al. (2008) analisaram as sequências dos genes *pyrH*, *recA* e *rpoA* em isolados da família *Vibrionaceae* e sugeriram que a metodologia MLSA é útil para uma rápida detecção de isolados do gênero *Vibrio* patogênicos do ambiente, e com o uso dos mesmos genes, foi possível diferenciar *V. cholerae* de *V. mimicus*. Já os genes *mdh*, *dnaE* e *recA* foram reportados como úteis para evidenciar a relação filogenética entre isolados de *V. cholerae* da sexta e sétima pandemias, assim como isolados de origem ambiental.

Novos gêneros como *Aliivibrio* foram identificados por MLSA, os isolados caracterizaram-se por formar grupos monofiléticos, que agrupavam tanto isolados pertencentes ao mesmo gênero quanto isolados pertencentes à mesma espécie (URBANCZYK et al., 2007). Do mesmo modo, isolados de *V. cholerae* associados à sétima pandemia também foram agrupados em grupos monofiléticos (CHUN et al., 2009). Isto foi evidenciado em nossos resultados: a partir da análise individual e concatenada dos *housekeeping genes*, foi confirmado que pertenciam à espécie *V. cholerae*.

Da mesma forma, os isolados do estudo e os da base de dados do MLSA ficaram em um grupo filogenético, diferenciando-se dos isolados da base de dados do NCBI. O mesmo, também foi relatado por Pretzer, et al. (2017), que avaliaram os *housekeeping genes* *RecA*, *ToxR*, *gyrB* e *pyrH* em isolados de *V. cholerae* de origem clínica e ambiental sorogrupo não O1/não O139, agrupando especificamente isolados ambientais diferenciados das referências internacionais. Estas últimas ficaram na parte final das árvores filogenéticas, sugerindo uma única diversidade endêmica dos isolados deste ecossistema.

No entanto, observou-se que, com a análise individual e concatenada dos genes, a população avaliada foi homogênea, agrupando-se preferencialmente entre elas mesmas do que com as sequências da base de dados do MLST. De acordo com Zo, et al. (2008) e Keymer, et al. (2009), a variabilidade genética em *V. cholerae* está associada ao polimorfismo fenotípico e aos diferentes nichos ecológicos que ocupa, como superfícies biológicas aquáticas, plantas e cianobactérias filamentosas (FROELICH et al., 2012; ISLAM et al., 1990; 2002; LYONS et al., 2007; MIZANUR et al., 2002; 2006; OBERBECKMANN et al., 2012).

Adicionalmente, parâmetros ambientais como salinidade, pH, temperatura da água, presença de outros organismos e disponibilidade de nutrientes, podem influenciar a micro diversidade em isolados do gênero *Vibrio* (KASPAR; TAMPLIN, 1993; KIRSCHNER et al., 2008; MAGNY et al., 2014; MOTES et al., 1998; PUJALTE et al., 1999; TAKEMURA et al., 2014). Dessa forma, as variações observadas sugerem que a evolução de um único locus genético gerou modificações entre os isolados (MOHAPATRA et al., 2009). Assim, o agrupamento apresentado indica que, entre os genes avaliados, alguns possam ter conferido um maior peso na diferenciação gerada na análise, o que foi particularmente observado com o gene *metE*.

De acordo com a literatura, estudos em que foram avaliados oito genes apresentaram uma similaridade de 98 % para definir isolados de uma espécie (SAWABE et al., 2013). Pela análise das sequências dos genes *rpoA*, *recA*, e *pyrH*, foram diferenciados isolados como pertencentes à espécie *V. campbellii* de *V. rotiferanus*, apresentando similaridades na sequência do gene de 97,7%, 91% e 95%, respectivamente (GOMEZ-GIL et al., 2003). Contudo, Glaeser, et al. (2015) sugerem que a análise de MLSA realizada em isolados da mesma espécie pode gerar uma interpretação sobre estimada da diferenciação filogenética, particularmente em estudos de MLSA baseados em estudos de MLST, devido a substituições sinônimas que poderiam refletir variações de sequência específicas do isolado.

Os nossos resultados mostram que o uso da técnica *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) foi apropriado para caracterizar os setenta isolados como pertencentes à espécie *V. cholerae*, observando-se que a população estudada foi homogênea. Além disso, vários autores relatam a existência de outros genes que poderiam contribuir na caracterização e resolução entre isolados da mesma espécie, como *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *dnaE*, os quais podem ser adicionados em análises futuras (MOHAPATRA et al., 2009; THOMPSON et al., 2008).

4.1.4.3 Detecção de genes associados à virulência em *V. cholerae* utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nossa análise apresentou isolados de *V. cholerae* O1 e não-O1/ não-O139 que carregavam os genes *tcpA* e NAG-ST (*st/sto*). O primeiro sugere que estes isolados poderiam adquirir o elemento CTX e auxiliar o micro-organismo na colonização do intestino, originando isolados toxigênicos (KIRN et al., 2000; WALDOR et al., 1996). O segundo gene indica que este isolado tem o potencial de gerar doenças diarreicas e tem sido relatado em diversos estudos como específico de isolados de origem ambiental (CECCARELLI et al., 2015; MORRIS et al., 1990; SHARMA et al., 1998). A presença destes genes associados a fatores de virulência indica a potencial origem de isolados epidêmicos (BAKHSHI, 2012; FARUQUE et al., 1998; OTTAVIANI et al., 2009; RODRIGUE et al., 1994; SINGH et al., 2001).

Por conseguinte, a caracterização a nível molecular destes isolados pela amplificação de vários dos genes envolvidos na patogênese (*tcpA*, *ctx*, *st/sto*, *wbe* O1 e *wbe* O139) foi uma ferramenta útil, devido a que a cólera é um processo que envolve múltiplos fatores e vários genes que codificam proteínas e toxinas que potencializam a colonização do intestino (SACK et al., 2004). É possível assim monitorar os genótipos mais frequentes dos isolados de *V. cholerae* presentes no meio ambiente.

Considerando a importância da obtenção de conhecimento da ecologia deste micro-organismo no ecossistema aquático brasileiro, assim como ao nível mundial, uma série de pesquisas foram realizadas para avaliar a prevalência de alguns genes associados à virulência. Foram realizadas pesquisas na Baía de Chesapeake nos Estados Unidos da América, e em sistemas aquáticos da China (CECCARELLI et al., 2015; LI et al., 2014), assim como, no litoral Paulista nos períodos pre e epidêmico (IVERSSON et al., 1993; RIVERA et al., 1995; 2001) e no Rio de Janeiro, onde foram isolados *V. cholerae* não O1/não O139 negativos para os genes associados à virulência de águas portuárias (SANTANA et al., 2016). Deste modo, foi verificada uma alta variabilidade dos genótipos presentes nos isolados de *V. cholerae* O1, *V. cholerae* não-O1 e não-O139 coletados no meio ambiente (ALVARADO, 1997; CECCARELLI et al., 2015; RIVERA et al., 2001). Assim mesmo, foi evidenciada a relevância do monitoramento ambiental deste micro-organismo no contexto de saúde pública (ALMAGRO-MORENO et al., 2009; HALEY et al., 2012; RIVERA et al., 2001).

Analisando os resultados do presente estudo e os relatados na literatura, constata-se que *V. cholerae* varia o conteúdo dos fatores determinantes de patogenicidade entre os diferentes isolados ambientais. Isto indica que estão presentes no ambiente aquático isolados com diversos genótipos que podem ser potencialmente patogênicos. Portanto, este tipo de estudo evidencia que o monitoramento de micro-organismos no ambiente aquático contribui na avaliação de riscos potenciais para a saúde humana, assim como na vigilância e prevenção de doenças (CECCARELLI et al., 2015; CHEN et al., 2015; ISLAM et al., 2013).

4.1.4.3.1 Avaliação da virulência de isolados selecionados de *V. cholerae* em modelo invertebrado de *G. mellonella*.

O modelo invertebrado de *G. mellonella* tem permitido realizar triagens com um maior número experimental, o qual não seria ética e financeiramente possível utilizando mamíferos (TSAI et al., 2016). Além disso, o sistema imune deste inseto apresenta mecanismos de resposta e células com funções análogas às dos mamíferos (BERGIN et al., 2005; BOMAN et al., 1987; BROWNE et al., 2013; KEMP; MASSEY, 2007; MUKHERJEE et al., 2010; TANG, 2009; TOJO et al., 2000). Também, a lagarta sobrevive a 37 °C, permitindo assim a avaliar a virulência dos isolados dependentes de temperatura e alguns dos resultados podem ser comparáveis com o modelo animal (KONKEL et al., 2000; SMOOT et al., 2001; VIEGAS et al., 2013).

O uso do modelo invertebrado de *G. mellonella* é de grande utilidade para o estudo de diversos patógenos humanos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli* (CHIBEBE et al., 2013; COTTER et al., 2000; LOH et al., 2013; SLATER et al., 2011; THOMAZ et al., 2013; WILLIAMSON et al., 2014). A susceptibilidade da lagarta a cada um destes micro-organismos tem permitido distinguir a virulência apresentada pelos diversos isolados avaliados (BORGHI et al., 2014; COTTER et al., 2000). De fato, isolados de *Serratia* spp. apresentaram uma significativa capacidade de adesão aos hemócitos da lagarta (CHADWICK et al., 1990). Também para *Helicobacter pylori*, quando foram avaliados os isolados e os mutantes específicos de fatores associados à virulência, evidenciando a susceptibilidade da lagarta à infecção e a variação da letalidade segundo o isolado (GIANNOULI et al., 2014).

Por meio dos resultados obtidos, observou-se que os isolados com presença de maior número de fragmentos dos genes associados à virulência avaliados, foram altamente virulentos. Resposta semelhante quanto os isolados com menor número de fragmentos avaliados, contrariamente ao relatado para isolados de *E. coli*, onde foi observada uma letalidade maior em *G. mellonella* segundo o número de genes de virulência presentes no isolado (WILLIAMSON et al., 2014). No entanto, tem sido relatada a presença de aproximadamente dezenove genes associados à virulência em *V. cholerae*, envolvidos na produção de toxinas, sistemas de secreção, mobilidade e produção de enzimas (CHEN et al., 2015; KAPER et al., 1994; LIN et al., 1999; MITRA et al., 2000). Consequentemente, é provável que alguns destes genes estejam presentes nos isolados e contribuam na infecção de *V. cholerae* em *G. mellonella*. Igualmente, foi relatado o surgimento de novas variantes de *V. cholerae*, entre as que se encontra o *V. cholerae* O1 El Tor, que apresenta uma nova mutação no gene *ctxB*, sendo possível a não detecção deste fragmento ou de outras possíveis variantes, devido aos oligonucleotídeos selecionados neste estudo (BHATTACHARYA et al., 2016).

A sobrevivência das lagartas de *G. mellonella* com os isolados caracterizados de *V. cholerae* evidenciou uma correlação com a dose do inóculo, tendo apresentado alta virulência nas maiores concentrações. Ainda que continuasse gerando susceptibilidade à infecção em *G. mellonella* em menores concentrações, porém, não com a rapidez e letalidade observadas com as suspensões microbianas mais concentradas. Este resultado é

semelhante ao observado com isolados de *P. aeruginosa*, uma vez que injeções em lagartas com doses mínimas de 25 UFC do isolado NCTC13437, apresentaram uma letalidade de 100 % das lagartas às 24 horas após o inóculo (HILL et al., 2014). Entretanto, a susceptibilidade de *G. mellonella* a dois isolados diferentes de *K. pneumoniae* resultou na morte de 100 % das lagartas a uma concentração de 10^6 UFC/larva (INSUA et al., 2013).

A dependência da dose inoculada também foi observada em isolados de *V. cholerae*, tendo sido testados vários inóculos para avaliar a virulência. O inóculo de 1.2×10^6 UFC/Larva causou uma mortalidade de 60% das lagartas após 36 horas da inoculação (NUIDATE et al., 2016). Igualmente, em isolados de *V. anguillarum*, foi observado que a mortalidade das lagartas foi dependente da dose inoculada (McMILLAN et al., 2015).

Por outro lado, a infecção no modelo invertebrado dependente da temperatura foi observada em isolados de *Yersinia entomophaga*, micro-organismo patógeno de insetos, que se apresentou virulento a 25 °C, mas não a 37 °C (HURST et al., 2015). Igualmente, em isolados de *Streptococcus* do grupo A, patógeno de animais e humanos, incubações a 28 °C e a 37 °C mostraram o incremento dos micro-organismos dentro da lagarta e causaram maior letalidade na segunda temperatura avaliada (LOH et al., 2013). A susceptibilidade da infecção com *Acinetobacter baumannii*, frequentemente isolada em humanos, evidenciou-se a uma concentração do inóculo de $3,7 \times 10^5$ UFC/Larva e a uma temperatura de incubação de 37 °C (PELEG et al, 2009).

No presente estudo, foi demonstrada a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção com isolados de *V. cholerae*, sendo este modelo útil na triagem dos isolados de origem ambiental. Evidenciou-se também a correlação entre a concentração do inóculo e a temperatura na patogenicidade em *G. mellonella*, semelhante ao evidenciado em animal e humano. No entanto, a presença dos principais genes associados à virulência não provocou nenhuma diferença quanto à susceptibilidade à infecção, tendo sido verificada mortalidade semelhante com isolados contendo os diversos genótipos. Estes resultados indicam que a presença de outros genes associados à virulência em *V. cholerae* devem estar influenciando este tipo de resposta. Portanto, sugere-se para futuros estudos a avaliação em modelo murino, com o objetivo de comparar os dois modelos e corroborar o potencial patogênico dos isolados de origem ambiental.

4.1.4.3.2 Teste de Susceptibilidade aos antibióticos

Os padrões de resistência aos antibióticos de *V. cholerae* têm mudado nos últimos anos, o que pode influenciar os resultados da terapia antimicrobiana em pacientes com cólera. Relatos de resistência a múltiplos antibióticos vêm aumentando a nível mundial (KITAOKA et al., 2011; URASSA et al., 2000). Assim, por exemplo, na Índia, isolados de *V. cholerae* biotipo El Tor mostraram-se resistentes a ciprofloxacina, ampicilina e sensíveis a tetraciclina. Entretanto, no nosso estudo, verificamos susceptibilidade a ciprofloxacina, uma vez que 100% foram sensíveis a este antibiótico. Por outro lado, observamos resistência a ampicilina e susceptibilidade a tetraciclina, semelhante aos resultados dos isolados caracterizados no surto de 2013 acontecido em Solapur, Maharashtra na Índia (PAL et al., 2010; WAGHMARE et al., 2016). Já a susceptibilidade a ácido nalidíxico foi relatada em isolados clínicos estudados em Mumbai entre 2004 - 2013 (TORANE et al., 2016).

Enquanto outros estudos mostram que isolados de *V. cholerae* biotipo Ogawa isolados no sul da Índia foram sensíveis a cloranfenicol e apresentaram resistência intermediária a ampicilina, os nossos isolados apresentaram resposta intermediária a estes dois antibióticos (RAMALINGAM et al., 2012). Esta evolução da resistência a ampicilina foi relatada em isolados coletados em surtos acontecidos em diferentes períodos de tempo na Índia. Assim, no ano de 2005, isolados coletados apresentavam uma porcentagem de resistência de 61%, e já entre os anos 2011 e 2013, os isolados que foram estudados evidenciaram 100% de resistência a este antibiótico. Resultados similares foram observados em Déli entre os anos 2003 - 2005, em Pune, entre os anos 2010 - 2012, e em Odisha, entre os anos 2009 - 2010 (SHARMA et al., 2012). Em outras espécies do gênero *Vibrio*, como *V. alginolyticus*, e em *Photobacterium damsela* isolados de ambientes marinhos, foi relatada a presença de genes de beta-lactamase (JUN et al., 2010). Também foi observada resistência a ampicilina e estreptomicina em isolados de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (HOGE et al., 1989; SHAW et al., 2014). Ceccarelli et al. (2015) sugerem que mecanismos como as variações na impermeabilidade celular, a presença de genes da β -lactamase, assim como a atividade da bomba de efluxo podem ser responsáveis pela resistência à ampicilina no gênero *Vibrio*.

A resistência aos antibióticos apresentada pelos isolados de *V. cholerae* pode decorrer do fato de que estes são autóctones de águas costeiras e estuarinas, áreas acessíveis e sujeitas à contaminação ambiental por águas residuais e esgoto, além de

múltiplos poluentes, que podem exercer pressão seletiva para o desenvolvimento da resistência (HAN et al., 2007). Estas condições reforçam a relevância e utilidade do monitoramento ambiental deste micro-organismo.

4.1.5 Conclusões

- O uso das metodologias clássicas foi de utilidade como um screening inicial para o isolamento de micro-organismos pertencentes à família *Vibrionaceae*, mas necessita ser complementado com testes moleculares para garantir a identificação das espécies estudadas.
- Os *housekeeping genes* (*adk*, *gyrB*, *mdh*, *metE*, *pntA*, *purM* e *pyrC*) utilizados permitiram caracterizar de forma específica os isolados como pertencentes à espécie *V. cholerae*.
- A população avaliada mostrou-se geneticamente homogênea quando avaliada com os sete *housekeeping genes*, porém heterogênea quanto aos genes associados à virulência e aos perfis de antibiograma.
- Da população avaliada, três isolados apresentaram um perfil de resistência para ampicilina, indicando a aquisição de mecanismos de resistência a antimicrobianos por parte de isolados de origem ambiental.
- Evidenciou-se correlação entre a concentração do inóculo e a temperatura e a patogenicidade em *G. mellonella*. No entanto, não existe relação entre a presença dos genes associados à virulência e a infecção no modelo invertebrado, indicando que a presença de outros genes associados à virulência em *V. cholerae* deve estar influenciando este tipo de resposta.
- Observou-se a presença no ambiente aquático de isolados com potencial patogênico. É, portanto, recomendado o contínuo monitoramento da presença de *V. cholerae* nos ecossistemas aquáticos, como medida de vigilância e controle.

APÊNDICES

A - Origem dos isolados

- Água salgada e sedimentos

Durante o Programa de Vigilância em *V. cholerae* O1, realizado entre 1974 e 1983 no Estado de São Paulo e nas cidades da Baixada Santista, pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), foram realizadas coletas de monitoramento, onde foram estudadas 540 amostras de água de mar, água doce, sedimentos e esgoto dos Municípios de Santos, Guarujá, Bertioga e São Vicente (MARTINS, 1988).

Amostras de água de mar e de plâncton foram coletadas em três locais do litoral brasileiro durante o período entre 2005 e 2007: Canal de São Sebastião (Agosto/2005 a Março/2007), Baixada Santista (Fevereiro a Maio 2006 e Janeiro a Março/2007), os quais apresentavam diferenças nos níveis de impacto antropogênico (SOUZA-SALES, 2009; ALMEIDA, 2009).

- Água de Portos

Foram selecionados sete portos da costa brasileira, no período de 2001 e 2002, cada qual com seis pontos de amostragem, que foram determinados de acordo com o grau de impacto antrópico, como saneamento, presença de pescadores, fábricas, terminais de passageiros, entre outros. Os portos selecionados foram: Belém (PA), Rio Grande (RS), Fortaleza (CE), Sepetiba (RJ), Paranaguá (PR), Recife (PE) e Santos (SP) (MARKMAN, 2008).

- Água de Lastro

Nesta coleta foram selecionados quinze portos em nove estados para a coleta de amostras de água e plâncton do lastro de navios atracados nos portos de Belém (PA), Fortaleza (CE), Recife e Saupe (PE), Aratu e Salvador (BA), Ponta Ubu, Praia Mole, Tubarão e Vitória (ES), Itaguaí e Rio de Janeiro (RJ), Santos (SP), Paranaguá (PR) e Rio Grande (RS) no período de 2001 e 2002. Esta coleta foi realizada em parceria com a Gerência Geral de Portos, Aeroportos, Fronteiras e Recintos Alfandegados (GGPAF) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

- Água doce

Em 2004, no mês de abril, foi notificado o isolamento de *V. cholerae* O1 Ogawa em amostra de fezes de um paciente com diarreia aguda, residente em São Bento do Una. Nesse período foram coletadas amostras de água, esgoto e mananciais utilizando os métodos de coleta direta e mecha de Moore. Esta coleta foi realizada por múltiplas instituições, sendo

monitorada pela Secretaria de Estado da Saúde de Pernambuco (SESPE) e a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS).

Em 2010, como medida de monitoramento ambiental, o Laboratório Central de Saúde Pública de Rondônia - LACEN/RO, realizou coletas de amostras no percurso do Rio Madeira por um período de sete meses, tendo sido confirmados 42 isolados como presuntivos para *V. cholerae*.

Em 2014, no Município de Porto Velho, Rondônia, no mês de março, foi realizada uma coleta na área afetada pela enchente do rio Madeira, onde foram colocadas mechas para a pesquisa de *V. cholerae*. Também foram coletadas amostras de origem clínica, devido à notificação frequente de pessoas com diarreia na zona do evento. Estas amostras foram coletadas e isoladas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Rondônia - LACEN/RO, pessoal do Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental Relacionada à Qualidade da Água para Consumo Humano (VIGIÁGUA) e pela Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera.

B - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para confirmação de espécie.

Gene Housekeeping	Produto	Iniciador 5' - 3'	Tamanho (bp)
<i>adk</i>	Adenilato quinase	F - CATCATTCTTCTCGGTGCTC R - AGTGCCGTCAAACCTCAGGTA	550
<i>gyr B</i>	Subunidade B da DNA girase	F - GTACGTTTCTGGCCTAGTGC R - GGGTCTTTTCTGACAATC	700
<i>met E</i>	Metionina sintase	F - CGGGTGACTTTGCTTGGT R - CAGATCGACTGGGCTGTG	750
<i>mdh</i>	Malato desidrogenase	F - ATGAAAGTCGCTGTTATTGG R - GCCGCTTGGCCCATAGAAAG	600
<i>pnt A</i>	Piridina nucleotideo transidrogenase	F - CTTTGATGGAAAACTCTCA R - GATATTGCCGTCTTTTCTT	500
<i>pur M</i>	Fosforibosil-formilglicinamida ciclo-ligase	F - GGTGTCGATATTGATGCAGG R - GGAATGTTTTCCAGAAGCC	700
<i>pyr C</i>	Dihidroorotase	F - ATCATGCCTAACACGGTTCC R - TTCAAACACTTCGGCATA	550

C - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção de fragmentos dos genes associados à virulência.

Gene	Produto	Iniciador 5' - 3'	Tamanho (bp)	Referência
<i>wbeO1</i>	Fragmento do gene <i>wbeO</i> (Identificação do sorogrupo O1)	VCO1F2 - CAACAGAATAGACTCAAGAA VCO1R2 - TATCTTCTGATACTTTTCTAC	647	STROEHER e MANNING 1997; YAMASAKI et al., 1999; RIVERA et al., 2003.
<i>wbe O139</i>	Fragmento do gene <i>wbeO139</i> (Identificação do sorogrupo O139)	VCO139F2 - TTACCAGTCTACATTGCC VCO139R2 - CGTTTCGGTAGTTTTTCTGG	741	
<i>ctxA</i>	Fragmento do gene CT - subunidade A	94F - CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG 641R - CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	564	Fields et al., 1992
<i>tcpA</i>	Fragmento do gen da Toxina Correguladora do pilus	72F - CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG 477R - CGAAAGCACCTTCTTTCACGTTG 647R - TTACCAAATGCAACGCCGAATG	Clássico: 620 El Tor: 451	RIVERA et al., 2001
NAG -ST	Fragmento do gene da toxina termo estável	stn/sto1F - TCGCATTTAGCCAAACAGTAGAAA stn/sto2R - GCTGGATTGCAACATATTCGC	172	RIVERA et al., 2001

D - Isolados de *Vibrio cholerae* utilizados como referência nas análises do MLSA.

ID	Isolado	Pais de origem	Ano	Fonte	Especie	Sorogruppo
1	M1035	Filipinas	1964	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O5
5	M1052	Filipinas	1972	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O26
7	M1078	Índia	1976	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O57
13	M1105	Índia	1981	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O89
18	M1562	Japão	1992	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O110
20	M1565	Japão	1995	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O113
25	M1575	Índia	1981	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O123
28	M1618	Austrália	1977	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
29	M1619	Austrália	1977	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
38	M2554	Bangladesh	2000	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O49
43	M2560	Bangladesh	2001	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O15
44	M2561	Bangladesh	2001	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O145
47	M2564	Bangladesh	2001	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O24
48	M2565	Bangladesh	2001	Clínica	<i>V. cholerae</i>	O94
49	M535	Tailândia	1992	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O1
52	M548	Alemanha	1993	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O25
53	M549	Alemanha	1993	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O37
54	M550	Alemanha	1993	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O99
57	M555	Argentina	1993	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O97
62	M560	Dinamarca	1994	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O39
63	M561	Korea	1994	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O74
65	M563	Korea	1994	Ambiental	<i>V. cholerae</i>	O81
87	N734	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
95	N11198	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
96	N11199	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
99	N11202	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
110	ZJ419-1	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
117	YL0882811	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
120	09-30	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	ogawa
130	04-6	China	2004	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	ogawa
134	10-18	China	2010	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	ogawa
138	11-3	China	NR	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	ogawa
149	06-6	China	2006	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	inaba
151	07-11	China	NR	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	inaba
159	V025	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	O1
165	V150	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	O1
166	11-2	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	ogawa
168	TC 183	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	O1
171	DT7 (Din-7)	Tailândia	2011	Rio	<i>V. cholerae</i>	O139
178	IPD221/844B	NR	NR	NR	<i>V. cholerae</i>	Não-O1/Não-O139
gi 227811634	M66-2	Makassar	1937	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	O1
NZAKGH01000001.1/ gi 452722814	H1	Haiti	2010	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	O1
NZCP010812.1	10432-62	Filipinas	1962	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	O27
gi 384423362	LMA3894-4	Brasil	2007	Rio	<i>V. cholerae</i>	O1
gi 147673035	O395	Índia	1962	Clínicas	<i>V. cholerae</i>	O1
gi 751581975	MS6	Tailândia	2008	NR	<i>V. cholerae</i>	O1
gi 992334627	ATCC 33654	EUA	NR	Água	<i>V. mimicus</i>	NR
gi 172087630	ES114	NR	NR	Bobtail quid	<i>V. fischeri</i>	NR
gi 992379298	ATCC 43516	Bahamas	NR	Tubarão	<i>V. harveyi</i>	NR
gi 749295119	UCM-V493	Espanha	2002	sedimento	<i>V. parahaemolyticus</i>	O2:K28
gi 970260619	ATCC 17749	China	NR	Fruto do mar	<i>V. alginolyticus</i>	NR
gi 375129161	NCTC 11218	Indonésia	2015	Peixe	<i>V. furnissii</i>	NR
gi 749197027	93U204	Taiwan	2004	Peixe	<i>V. vulnificus</i>	NR

E (I) - Informação dos isolados selecionados no estudo para caracterização pelas análises de MLSA.

Nº	ID - NC	ORIGEM
1	NC 1	Água doce
2	NC 2	Água doce
3	NC 3	Água doce
4	NC 4	Água salgada (Região costeira)
5	NC 5	Água salgada (Região costeira)
6	NC 6	Água doce
7	NC 7	Água salgada (Região costeira)
8	NC 8	Água doce
9	NC 9	Água doce
10	NC 10	Água salgada (Região costeira)
11	NC 11	Água doce
12	NC 12	Água doce
13	NC 13	Água salgada (Região costeira)
14	NC 14	Água salgada (Região costeira)
15	NC 15	Água salgada (Região costeira)
16	NC 16	Água doce
17	NC 17	Água doce
18	NC 19	Água doce
19	NC 20	Água salgada (Região costeira)
20	NC 21	Água doce
21	NC 23	Água salgada (Região costeira)
22	NC 24	Água salgada (Região costeira)
23	NC 25	Água salgada (Região costeira)
24	NC 26	Água salgada (Região costeira)
25	NC 27	Água salgada (Região costeira)
26	NC 28	Água salgada (Região costeira)
27	NC 29	Água salgada (Região costeira)
28	NC 30	Água salgada (Região costeira)
29	NC 31	Água salgada (Região costeira)
30	NC 32	Água salgada (Região costeira)
31	NC 33	Água salgada (Região costeira)
32	NC 34	Água salgada (Região costeira)
33	NC 37	Água salgada (Região costeira)
34	NC 38	Água salgada (Região costeira)
35	NC 39	Água salgada (Região costeira)

E (II) - Informação dos isolados selecionados no estudo para caracterização pelas análises de MLSA.

Nº	ID - NC	ORIGEM
36	NC 40	Água salgada (Região costeira)
37	NC 41	Água salgada (Região costeira)
38	NC 42	Água salgada (Região costeira)
39	NC 43	Água salgada (Região costeira)
40	NC 45	Água salgada (Região costeira)
41	NC 47	Água doce
42	NC 88	Água salgada (Região costeira)I
43	NC 89	Água salgada (Região costeira)I
44	NC 90	Água salgada (Região costeira)I
45	NC 92	Água salgada (Região costeira)I - Sedimento
46	NC 95	Água salgada (Região costeira)I
47	NC 97	Água salgada (Região costeira)I
48	NC 99	Água salgada (Região costeira)I
49	NC 100	Água salgada (Região costeira)I
50	NC 101	Água salgada (Região costeira)I
51	NC 103	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
52	NC 104	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
53	NC 105	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
54	NC 106	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
55	NC 107	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
56	NC 108	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
57	NC 110	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
58	NC 111	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
59	NC 112	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
60	NC 113	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
61	NC 114	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
62	NC 115	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
63	NC 116	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
64	NC 117	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
65	NC 118	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
66	NC 119	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
67	NC 120	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
68	NC 121	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
69	NC 122	Água salgada (Região costeira) - Sedimento
70	NC 123	Água salgada (Região costeira) - Sedimento

F - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *adk*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

G - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *gyrB*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

H - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *mdh*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

I - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *metE*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

J - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pntA*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

K - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *purM*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

L - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene *pyrC*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

M - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos *housekeeping genes* *adk*, *gyrB*, *metE*, *purM*, *pyrC*, *mdh*, *pntA* de isolados de origem ambiental com as sequências disponíveis no NCBI e na base de dados do mlst de *Vibrio cholerae*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

N - Árvore filogenética baseada na comparação das sequências concatenadas dos *housekeeping genes* *adk*, *gyrB*, *metE*, *purM*, *pyrC*, *mdh*, *pntA*, em isolados de origem ambiental com duas das sequências disponíveis no NCBI de *V. cholerae*.

Legenda - Bootstrap <50 foram removidos da figura.

O - Distribuição dos genes associados à virulência em isolados de *Vibrio cholerae* detectados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

ID - NC	ORIGEM	GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA					ID - NC	ORIGEM	GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA				
		<i>wbe</i> O1	<i>wbe</i> O139	<i>ctx</i> A	<i>tcp</i> A	NAG-ST (<i>st/sto</i>)			<i>wbe</i> O1	<i>wbe</i> O139	<i>ctx</i> A	<i>tcp</i> A	NAG-ST (<i>st/sto</i>)
NC 1	AD	+	-	-	-	-	NC 40	AS	-	-	-	-	+
NC 2	AD	+	-	-	+	+	NC 41	AS	-	-	-	-	+
NC 3	AD	+	-	-	-	-	NC 42	AS	-	-	-	-	+
NC 4	AS	-	-	-	-	+	NC 43	AS	-	-	-	-	-
NC 5	AS	-	-	-	-	+	NC 45	AS	-	-	-	-	-
NC 6	AD	+	-	-	-	-	NC 47	AD	+	-	-	-	-
NC 7	AS	-	-	-	-	+	NC 88	AS	-	-	+	+	+
NC 8	AD	+	-	-	-	-	NC 89	AS	-	-	-	+	+
NC 9	AD	+	-	-	+	-	NC 90	AS	-	-	-	-	+
NC 10	AS	-	-	-	-	-	NC 92	ASS	-	-	-	+	+
NC 11	AD	+	-	-	+	+	NC 95	AS	+	-	+	+	-
NC 12	AD	+	-	-	+	-	NC 97	AS	+	-	+	+	-
NC 13	AS	-	-	-	-	-	NC 99	AS	-	-	-	+	+
NC 14	AS	-	-	-	+	+	NC 100	AS	-	-	-	+	-
NC 15	AS	-	-	-	+	+	NC 101	AS	-	-	+	+	+
NC 16	AD	+	-	-	-	-	NC 103	ASS	-	-	-	+	+
NC 17	AD	+	-	-	-	-	NC 104	ASS	-	-	-	+	+
NC 19	AD	+	-	-	-	-	NC 105	ASS	-	-	-	+	+
NC 20	AS	-	-	-	-	+	NC 106	ASS	-	-	-	+	+
NC 21	AD	+	-	-	-	-	NC 107	ASS	-	-	-	+	+
NC 23	AS	-	-	-	+	+	NC 108	ASS	-	-	-	-	+
NC 24	AS	-	-	-	-	+	NC 110	ASS	-	-	-	+	+
NC 25	AS	-	-	-	+	+	NC 111	ASS	-	-	-	-	-
NC 26	AS	-	-	-	+	+	NC 112	ASS	-	-	-	+	+
NC 27	AS	-	-	-	-	-	NC 113	ASS	-	-	-	+	+
NC 28	AS	-	-	-	+	+	NC 114	ASS	-	-	-	-	+
NC 29	AS	-	-	-	-	+	NC 115	ASS	-	-	-	+	+
NC 30	AS	-	-	-	+	+	NC 116	ASS	-	-	-	-	+
NC 31	AS	-	-	-	-	+	NC 117	ASS	-	-	-	-	-
NC 32	AS	-	-	-	-	+	NC 118	ASS	-	-	-	-	-
NC 33	AS	-	-	-	-	+	NC 119	ASS	-	-	-	+	+
NC 34	AS	-	-	-	-	-	NC 120	ASS	-	-	-	+	+
NC 37	AS	-	-	-	-	+	NC 121	ASS	-	-	-	+	+
NC 38	AS	-	-	-	-	+	NC 122	ASS	-	-	-	-	+
NC 39	AS	-	-	-	-	+	NC 123	ASS	-	-	-	-	+

Legenda - [AD]: Água doce ; [AS]: Água salgada; [ASS]: Água salgada sedimento; [*wbe* O1]: gene que participam na biossíntese do antígeno O (específico para o sorogrupo O1); [*wbe* O139]: associada à biossíntese de lipopolissacarídeos (específico para o sorogrupo O139); [*ctx*A]: Subunidade A da Toxina Colérica; [*tcp*A]: Fator de colonização corregulado com a toxina colérica; [*st/sto*]: enterotoxina termoestável NAG-ST.

P - Perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados selecionados de *V. cholerae* segundo a origem.

ORIGEM	NUMERO DE ISOLADOS	PERFIL	AMP	NAL	CIP	TET	CLO	TRI
AD	13	Sensível	12 (92,3)	12 (92,30)	13 (100)	13 (100)	13 (100)	13 (100)
		Intermediário	1 (7,69)	1 (7,69)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		Resistente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AS	35	Sensível	33 (94,28)	35 (100)	35 (100)	35 (100)	35 (100)	35 (100)
		Intermediário	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		Resistente	2 (5,71)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ASS	21	Sensível	20 (95,23)	21 (100)	21 (100)	21 (100)	21 (100)	21 (100)
		Intermediário	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		Resistente	1 (4,76)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Legenda - Datoa apresentados como N° (%) segundo a origem; [AMP]: ampicilina; [NAL]: ácido nalidíxico; [CIP]: ciprofloxacina; [TET]: tetraciclina; [CLO]: cloranfenicol; [TRI]: trimetoprima; [AD]: água doce; [AS]: água salgada; [ASS]: água salgada - sedimento. Foi excluído desta tabela o isolado que apresentou resistência a mais de um antimicrobiano.

REFERÊNCIAS[†]

- ALMEIDA, B.C. **Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no canal de São Sebastião**. 2009. 198 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALMAGRO-MORENO, S.; PRUSS, K.; TAYLOR, R. Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 5, doi:10.1371/journal.ppat.1004787, 2015.
- AL-SAARI NURHIDAYU, GAO, F., A.K.M. ROHUL, A., SATO, K., SATO, K., MINO, S., SAWABE, T. Advanced Microbial Taxonomy Combined with Genome-Based-Approaches Reveals that *Vibrio astriarenae* sp. nov., an Agarolytic Marine Bacterium, Forms a New Clade in *Vibrionaceae*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136279. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0136279>, 2015.
- ALVARADO, D. **Deteccao de sequencias geneticas associadas a virulencia em cepas de Vibrio cholerae nao-O1 e nao-O139 isolados de ambientes marinhos do Estado de Sao Paulo**. 1997. 95 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- AUSTIN, B. Bacteria pathogens of marine fish. In: BELKIN, S; COLWELL, R. R. O. (eds.) *Oceans and Health: pathogens in the marine environment*. Dordrecht: Kluwer, 2005. p. 391-413
- BAKHSI, B.; MOHAMMADI-BARZELIGHI, H.; SHARIFNIA, A.; DASHTBANI-ROOZBEHANI, A.; RAHBAR, M.; POURSHAFIE, R. Presence of CTX gene cluster in environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* and its potential clinical significance. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 30, p. 285–289, 2012.
- BARTHOLOMEW, W., FINKELSTEIN, H.. Crystal violet binding capacity and the Gram reaction of bacterial cells. **Journal of Bacteriology**, v. 67, n. 6, p. 689, 1954.
- BELLÉS-GARULERA. Variability of planktonic and epiphytic vibrios in a coastal environment affected by *Ostreopsis* blooms. **Scientia Marina**, v. 80, n. S1, p. 97-106, ISSN1886-8134, 2016.
- BJELLAND, A.; FAUSKE, A.; NGUYEN, A.; ORLIEN, E.; ØSTGAARD, I.; SØRUM, H. Expression of *Vibrio salmonicida* virulence genes and immune response parameters in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). doi: **Frontiers in Microbiology**, v. 4, DOI: 10.3389/fmicb.2013.00401.401, p.78-89, 2013.
- BENSON, H. J. Antimicrobial sensitivity testing: the Kirby-Bauer method. In: BENSON, H. J. **Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology**, Boston: McGraw Hill, p. 139–141, 1998.
- BERGIN, D.; REEVES, P.; RENWICK, J.; WIENTJES, B.; KAVANAGH, K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4161–4170, 2005.

[†] De acordo com:

BHATTACHARYA, D.; DEY, S.; PERUMAL, G.; RAMAMURTHY, T.; PARANDE, M.; KHOLKUTE, S.; ROY, S. *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant and emergence of Haitian *ctxB* variant in the strains isolated from South India. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, p. 195–200, 2016.

BOMAN, H.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 103-26. PMID:3318666, 1987.

BORGHI, E.; ROMAGNOLI, S.; FUCHS, B.; CIRASOLA, D.; PERDONI, F.; TOSI, D.; BRAIDOTTI, P.; BULFAMANTE, G.; MORACE, G.; MYLONAKIS, E. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 163-173, 2014.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597–603, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de Vigilância Epidemiológica da Cólera** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010. 170 p. : il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BROECK, V.; HORVATH, D.; DEWOLF, C. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1771–1775, 2007.

BURBANO-ROSETO, E. **Frequências e diversidades de colifagos somáticos isolados de amostras de água de mar, plancton e bivalves da Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba**. 2009. 154 f. Dissertação (Doutorado Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CDC, **Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera**. http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_99_8_EN/en/index.html, Atlanta, GA: CDC, 1999.

CECCARELLI, D.; CHEN, A.; HASAN, N.; RASHED, S.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* carrying multiple virulence factors and *V. cholerae* O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 1909 – 1918. doi:10.1128/AEM.03540-14, 2015.

CECCHINI, F.; FAJS, L.; COSNIER, S.; MARKS, R. *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, 79, p. 199–209. 2016.

CHADWICK, S.; CALDWELL, S.; CHADWICK, P. Adherence patterns and virulence for *Galleria mellonella* larvae of isolates of *Serratia marcescens*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 55, p. 133-134, 1990.

CHEN, L.; ZHENG, D.; LIU, B.; YANG, J.; JIN, Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 44, doi: 10.1093/nar/gkv1239, 2015.

CHIBEBE, J.; FUCHS, B.; SABINO, C.; JUNQUEIRA, J.; JORGE, A.; RIBEIRO, M.; GILMORE, M.; RICE, L.; TEGOS, G.; HAMBLIN, M. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. **PLoS One**, v. 8, e55926, 2013.

CHUN, J.; GRIM, C.; HASAN, N.; JE, H.; SEON, Y.; HALEY, B. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 15442–15447. doi:10.1073/pnas.0907787106, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; 19th International Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S19. Wayne, 2009.

COLWELL, R. Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. **Science**, v. 274, p. 2025–2031, 1996.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an in sectmodel for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 163–169, 2000.

COTTRELL, M.; KIRCHMAN, L. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. **Journal Limnology and Oceanography: Methods**, v. 48, p. 168–178, 2003.

COTTRELL, M.; KIRCHMAN, D. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1692–1697, 2000a.

COTTRELL, M.; WOOD, D.; YU, D.; KIRCHMAN, D. Selected chitinase genes in cultured and uncultured marine bacteria in the alpha and gamma-subclasses of the proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1195–1201, 2000b.

DANIN-POLEG, Y.; COHEN, L.A.; GANCZ, H.; BROZA, Y.Y.; GOLDSHMIDT, H.; MALUL, E.; VALINSKY, L.; LERNER, L. *Vibrio cholerae* strain typing and phylogeny study based on simple sequence repeats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 736–746, 2007.

DORSCH, M.; LANE, D.; STACKEBRANDT, E. Towards a Phylogeny of the Genus *Vibrio* Based on 16S rRNA Sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, vol. 42, n. 1, p. 58–63, 1992.

ESTEVEZ, K.; HERVIO-HEATH, D.; MOSSER, T.; RODIER, C.; TOURNOUD, M.; JUMAS, E.; COLWELL, R.; MONFORT, P. Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in French Mediterranean coastal lagoons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 7600–7609. doi:10.1128/AEM.01848-15, 2015.

FARMER, J.; JANDA, M.; BIRKHEAD. *Vibrio*. In: MURRAY, P. R. (eds.) **Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed. ASM Press, Washington, D. C. 2003. p. 706 - 718.

FARUQUE, S. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3752–3757, 1998.

FIELDS, P. I.; POPOVIC, T.; WACHSMUTH, K.; OLSVIK, F. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2118–2121, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION Kaysner, C., DePaola, A. BAM: *Vibrio*. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 9. *Vibrio*. 2004. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>. Acesso em: 10 janeiro 2017.

FROELICH, B.; AYRAPETYAN, M.; DOLIVER, D. Integration of *Vibrio vulnificus* in to marine aggregates and its subsequent uptake by *Crassostrea virginica* oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 1454–1458, doi:10.1128/AEM. 03095-12, 2012.

GABRIEL, M.; MATSU, G.; FRIEDMAN, R.; LOVELL, C. Optimization of Multilocus Sequence Analysis for Identification of Species in the Genus *Vibrio*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 80, n. 17, p. 5359–5365, 2014.

GIANNOULI, M.; PALATUCCI, A.; RUBINO, V.; RUGGIERO, G.; ROMANO, M.; TRIASSI, M.; RICCI, V.; ZARRILLI, R. Use of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* as an in vivo model to study the virulence of *Helicobacter pylori*. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 2- 28, 2014.

GLAESER, F.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 237–245, 2015.

GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A. Isolation, enumeration and preservation of the 452 *Vibrionaceae*. In: Thompson, F., Austin, B., Swings, J. (Eds.), **The Biology of Vibrios**. 453 American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 15–26, 2006.

GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F.; THOMPSON, C.; SWINGS, J. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, p. 239–245, 2003.

HALEY, J.; CHEN, A.; GRIM, J., CLARK, P., DIAZ, M., TAVIANI, E. *Vibrio cholerae* in a historically cholera-free country. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, p. 381–389, 2012.

HALL, A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. Information Retrieval Ltd., c1979-c2000. 1999. p. 95-98.

HAN F., WALKER R. D., JANES M. E., PRINYAWIWATKUL W., GE B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7096 – 7098, 2007.

HEIDELBERG, J. F.; HEIDELBERG, B.; COLWELL, R. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5488–5497, 2002.

HEYMANN, D. *Vibrio cholerae* serogroups 01 and 0139. In: Control of communicable diseases manual. 19th ed. Washington, DC: **American Public Health Association**, 120–128, 2008

HILL, L.; VELI, N.; COOTE, P. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas aeruginosa* infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 254-261, 2014.

HOGUE, C.; WATSKY, D.; PEELER, R.; LIBONATI, J.; ISRAEL, E.; MORRIS, J. Epidemiology and spectrum of *Vibrio* infections in a Chesapeake Bay community. **Journal of Infectious Diseases**, v. 160, p. 985–993, 1989.

HUQ, A.; HALEY, B.; TAVIANI, E.; CHEN, A.; HASAN, N.; COLWELL, R. Detection, isolation, and identification of *Vibrio cholerae* from the environment, **Current Protocols in Microbiology journal**, v. 6A, n. 5, p. 1–58, 2012.

HURST, M.; BEATTIE, A.; JONES, S.; HSU, P.; CALDER, J.; VAN KOTEN, C. *Galleria mellonella* mortality as a result of *Yersinia entomophaga* infection is temperature-dependent. **Applied and Environmental Microbiology**, doi:10.1128/AEM.00790-15. p. 1-49 Manuscript Posted Online, 2015.

INSUA, J.; LLOBET, E.; MORANTA, D.; PEREZ-GUTIERREZ, C.; TOMAS, A.; GARMENDIA, J.; Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 3552-3565, 2013.

ISLAM, A.; LABBATE, M.; DJORDJEVIC, P.; ALAM, M.; DARLING, A.; MELVOLD, J.,; HOLMES, J.; JOHURA, T.; CRAVIOTO, A.; CHARLES, G.; STOKES, W. Indigenous *Vibrio cholerae* strains from a non-endemic region are pathogenic. **Open Biology**, v. 3, p. 120-181, 2013.

ISLAM, M.; GOLDAR, M.; MORSHED, G.; BAKHT, M.; SACK, D. A. Chemotaxis between *Vibrio cholerae* O1 and a blue - green alga, *Anabaena* sp. **Epidemiology and Infection**, v. 134, p. 645-650. doi:10.1017/S0950268805005297, 2006.

ISLAM, S.; GOLDAR, M.; MORSHED, G.; KHAN, N.; ISLAM, M.; SACK, B. Involvement of the hap gene (mucinase) in the survival of *Vibrio cholerae* O1 in association with the blue -green alga, *Anabaena* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 793–800. doi:10.1139/w02-073, 2002.

ISLAM, M.; DRASAR, B.; BRADLEY, D. Long-term persistence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the mucilaginous sheath of a blue - green alga, *Anabaena variabilis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 133–139, 1990.

ITOI, S.; KANOMATA, Y.; KOYAMA, Y.; KADOKURA, K.; UCHIDA, S.; NISHIO, T.; OKU, T.; SUGITA, H. Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1774, p. 1099–1107, 2007.

IVERSSON, L.; DA ROCHA, J.; ALVES, E.; PERRENOUD, J.; ARAÚJO, J.; MATTÉ, G.; ESCRIVÃO, A. Cólera no Brasil. **Saúde e Sociedade de São Paulo**, v. 2, n. 1, p. 3-7, 1993.

JUN, J.W.; KIM, J.H.; HAN, J.E.; SHIN, S.P.; GOMEZ, D.K; JR, OH, C.C.; OH, K.S.; PARK, S.C. Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from the giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 27, p. 618 – 621, 2010.

KAPER, J.B.; FASANO, A.; TRUCKSIS, M. Toxins of *Vibrio cholerae*. In: WACHSMUTH, K.I.; BLAKE, P.A; OLSVIK, O. (eds.) ***Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives**. 1994. American Society for Microbiology, Washington, DC. p. 145-176.

KASPAR, C.; TAMPLIN, M. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2425–2429, 1993.

KEAST, A.; RILEY, T. V. Identification of *Vibrio* spp. with the ‘string’ test. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 106-108, 1997.

KEMP, M.; MASSEY, R. The use of insect models to study human pathogens. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 4, p. 105–110, 2007.

- KEYMER, D.P.; LAM, L.H.; AND BOEHM, A.B. Biogeographic patterns in genomic diversity among a large collection of *Vibrio cholerae* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1658–1666, 2009.
- KITAOKA, M.; MIYATA, ST.; UNTERWEGER, D.; PUKATZKI, S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 397–407, 2011.
- KIRN T.; LAFFERTY J.; SANDOE M.; TAYLOR K. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 896-910, 2000.
- KIRSCHNER, A.; SCHAUER, S.; STEINBERGER, B.; WILHARTITZ, I.; GRIM, C.J.; HUQ, A. Interaction of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 with copepods, cladocerans and competing bacteria in the large alkaline lake Neusiedler See, Austria. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 496–506, 2008.
- KONKEL, M.; TILLY, K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 157-166, 2000.
- KOBAYASHI, T.; ENOMOTO, S.; SAKAZAKI, R.; KUWAHARA, S. A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). **Nippon Saikingaku Zasshi**, v. 18, p.387-392, 1963.
- KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**, v. 178, p. 703. 1956.
- KUMAR, P.; MISHRA, K.; DESHMUKH, G.; JAIN, M.; ZADE, M.; INGOLE, KV.; YADAVA, P. Haitian variant *ctxB* producing *Vibrio cholerae* O1 with reduced susceptibility to ciprofloxacin is persistent in Yavatmal, Maharashtra, India, after causing a cholera outbreak. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. O292–O293, 2014.
- LE ROUX, F.; GAY, M.; LAMBERT, C.; NICOLAS, L.; GOUY, M.; BERTHE F. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. **Disease of aquatic organisms**, v. 58, p. 143–150. <http://dx.doi.org/10.3354/dao058143>, 2004.
- LEIBOVICI-WEISSMAN, Y.; NEUBERGER, A.; BITTERMAN, R.; SINCLAIR, D.; SALAM, A.; PAUL, M. Antimicrobial drugs for treating cholera. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.6, N. CD008625. doi: 10.1002/14651858.CD008625.pub2, 2014.
- LI, L.; MENDIS, N.; TRIGUI, H.; OLIVER, JD.; FAUCHER, SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Frontiers in microbiology**, v.5, 2014.
- LIN, W.; FULLNER, K.; CLAYTON, R.; SEXTON, J. A.; ROGERS, M. B.; CALIA, K. E.; MEKALANOS, J. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 3, p. 1071-1076. 1999.
- LOH, J.; ADENWALLA, N.; WILES, S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A *streptococcus*. **Virulence**, v. 4, p. 419-428, 2013.
- LYONS, M.; LAU,Y.; CARDEN, E.; WARD, E.; ROBERTS, B.; SMOLOWITZ, R. Characteristics of marine aggregates in shallow - water ecosystems: implications for disease ecology. **Ecohealth**, v. 4, p. 406–420, doi:10.1007/s10393- 007-0134-0, 2007.

MCMILLAN, S.; VERNER-JEFFREYS, D.; WEEKS, J.; AUSTIN, B.; DESBOIS, D. Larva of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, is a suitable alternative host for studying virulence of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*. **BMC Microbiology**, v. 15, p. 1-27, 2015.

MAGNY, G.; HASAN, N.; ROCHE, B. How community ecology can improve our understanding of cholera dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 137, p. 235-239, 2014.

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**. 2008. 192f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MARTINS, M.T. **Ecologia de *Vibrio cholerae* no ecossistema aquático**. 1988. Tese (Livre docência) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

MITRA, R.; FIGUEROA, P.; MUKHOPADHYAY, K. Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1928–1933, 2000.

MIZANUR, M.; ISLAM, M.; KHAN, S.; ANDRAHIM, Z. The chemotactic response of *Vibrio cholerae* O139 to the mucilaginous sheath of blue - green algae is mediated by a combination of sheath components. **Microbes and Environments**, v. 17, p. 18–25. doi:10.1264/jsme2.2002.18. 2002.

MOHAPATRA, S., RAMACHANDRAN, D., MANTRI, C., COLWELL, R., SINGH, D. Determination of relationships among non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains from housekeeping gene sequences and ribotype patterns. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 57-62, 2009.

MORRIS, J.; GLENN, J. Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. **Epidemiologic Reviews**, v. 12, p. 179-191, 1990.

MORRIS, G.; MERSON, M.; HUQ, I.; KIBRYA, A.; BLACK, R. Comparison of four plating media for isolating *Vibrio cholerae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, p. 179–83, 1979.

MOTES, M.; DE PAOLA, A.; COOK, D.; VEAZEY, J.; HUNSUCKER, J.; GARTHRIGHT, W. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1459–1465, 1998.

MUKHERJEE, K.; ALTINCICEK, B.; HAIN, T.; DOMANN, E.; VILCINSKAS, A.; CHAKRABORTY, T. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 310-317, 2010.

NAKANISHI, Y. An isolation agar medium for cholerae and enteropathogenic halophilic vibrios. **Modern Media**, v. 9, p. 246, 1963.

NUIDATE, T.; TANSILA, N.; SAENGKERDSUB, S.; KONGREUNG, J.; BAKKIYARAJ, J.; VUDDHAKUL, V. Role of Indole Production on Virulence of *Vibrio cholerae* Using *Galleria mellonella* Larvae Model. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 56, n. 3, p. 368–374, 2016.

OBERBECKMANN, S.; FUCHS, M.; MEINERS, M.; WICHELS, A.; WILTSHIRE, H.; GERDTS, G. Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 543–551, doi:10.1007/s00248-011-9990-9, 2012.

OCTAVIA, S.; SALIM, A.; KURNIAWAN, J.; LAM, C.; LEUNG, Q.; AHSAN, S.; LAN, R. Population structure and evolution of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* by Multilocus Sequence Typing. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. 1 - 13, 2013.

OTTAVIANI, D.; LEONI, F.; ROCCHIGIANI, E.; SANTARELLI, S.; MASINI, L.; DITRANI, V.; CANONICO, C.; PIANETTI, A.; TEGA, L.; CARRATURO, A. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 47–53, 2009.

PAL, B.; KHUNTIA, H.; SAMAL, S.; KAR, S.; PATNAIK, B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor *Vibrio cholerae* O1 Ogawa possessing the *ctxB* gene of the classical biotype in Orissa, India. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 384-389, 2010.

PELEG, A.; JARA, S.; MONGA, D.; ELIOPOULOS, G.; MOELLERING, R.; MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2605–2609, 2009.

PIERCE, N. F.; BANWELL, J. G.; MITRA, C.; CARANASOS, J.; KEIMOWITZ, I.; THOMAS, J.; MONDAL, A. Controlled comparison of tetracycline and furazolidone in cholera. **British Medical Journal**, v. 3, p. 277–280, 1968.

PRETZER, C.; DRUZHININA, I.; AMARO, C.; BENEDIKSDOTTIR, E.; HEDENSTROM, I.; HERVIO-HEATH, D.; HUHULESCU, S.; SCHETS, F.; FARNLEITNER, A.; KIRSCHNER, A. High genetic diversity of *Vibrio cholerae* in the European lake Neusiedler See is associated with intensive recombination in the reed habitat and the long-distance transfer of strains. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 328–344, 2017.

PUJALTE, M.; ORTIGOSA, M.; URDACI, M.; GARAY, E.; GRIMONT, P. *Vibriomytili* sp. nov., from mussels. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, p. 358–362, doi:10.1099/00207713-43-2-358. 1993.

RAMALINGAM, S.; MURUGESAN, A.; MOORTHY, S.; NAGASUNDARAM, M.; MANOHARAN, M. An outbreak of cholera among a rural population in South India: Is it time to vaccinate the children in endemic areas? **Indian Journal Medical Research**, v. 135, n. 5, p. 678–679, 2012.

RAMAMURTHY, T.; GRAG, S.; SHARMA, R. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. **Lancet**, n. 341, p. 703-704, 1993.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 70, n. e4392, doi:10.3791/4392, 2012.

RAMOS, F.; LAINSON, Z.; SILVA, E.; PROIETE, A.; MARECO, M.; LAMARAO, M. Cholera in north Brazil: on the occurrence of strains of *Vibrio cholerae* O1 which fail to ferment sucrose during routine plating on Thiosulphate-Citrate-Bile-Salt-Sucrose Agar (TCBS). A new problem in Diagnosis and control. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 39, 141-144, 1997.

RIVERA, I.N.G.; LIPP, E. K.; GIL, A.; CHOOPUN, N.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 599-606, 2003.

RIVERA, I.N.G.; CHUN, J.; HUQ, A.; SACK, R.B.; COLWELL, R.R. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2421-2429, 2001.

RIVERA, I. G.; CHOWDHURY, M. A.; HUQ, A.; JACOBS, D.; MARTINS, M. T.; COLWELL, R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2898-2904, 1995.

RODRIGUE, C.; POPOVIC, T.; WACHSMUTH, K. Non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 infection in the United States, p. 69–76. In: WACHSMUTH, I.; BLAKE, P.; OLSEV, R. (ed.), ***Vibrio cholerae and cholera—molecular to global perspective***. American Society for Microbiology, Washington. D.C., 1994.

ROMALDE, J.; DIÉGUEZ, A.; LASA, A.; BALBOA, S. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1 - 11, doi: 10.3389/fmicb.2013.00413, 2014.

ROSZAK, B.; COLWELL, R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 3, p. 365, 1987.

SACK, D.; SACK, R.; NAIR, G.; SIDDIQUE, A. Cholera. **The Lancet**, v. 363: p. 223–33, 2004.

SALIM, A.; LAN, R.; REEVES, P. *Vibrio cholerae* pathogenic clones. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 11, p. 1758, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2da Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANCHES, P. Methods for isolating and identifying *Vibrio cholerae* in water. In: **Cholera on the american continents**. ed. DE CASTRO, P.; ALMEIDA, W. International Life Science Institute/ILSI Press., p. 119- 115. 1993.

SANTANA, E.; VIANAI, C.; RIVERA, I.; WEDEKIND, E. Verificação de *V. cholerae* em águas portuárias da cidade do Rio de Janeiro, Brasil: um ensaio metodológico DOI: 10.3395/2317-269x.00553, **Vigilância sanitária em debate**, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2016.

SAWABE, T.; TOSHIOGURA, Y.; MATSUMURA, Y.; FENG, G.; AMIN., A.; MINO, S.; NAKAGAWA, S.; SAWABE, T.; KUMAR, R.; FUKUI, Y.; SATOMI, M.; MATSUSHIMA, R.; THOMPSON, F.; GOMEZ-GIL, B.; CHRISTEN, R.; MARUYAMA, F.; KAWA, K.; HAYASHI, T. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritoni* ssp.nov. **Frontiers in Microbiology**, v 4, n. 414, p. 7-20, 2013.

SAWABE, T.; KITA-TSUKAMOTO, K.; THOMPSON, F. Inferring the Evolutionary History of *Vibrios* by Means of Multilocus Sequence Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, No. 21, p. 7932–7936, 2007.

SINGH, D.; MATTE, M.; MATTE, R.; JIANG, S.; SABEENA, F.; SHUKLA, N.; SANYAL, C.; HUQ, A.; COLWELL, R. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 910–921, 2001.

SHARMA, D.; MALIK, A. Incidence and prevalence of antimicrobial resistant *Vibrio cholerae* from dairy farms. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 25, p. 5331-5334, 2012.

SHARMA, C.; THUNGAPATHRA, M.; GHOSH, A.; MUKHOPADHYAY, A.; BASU, A.; MITRA, A.; BASU, I.; BHATTACHARYA, K.; TAKEDA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, S.; NAIR, G. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 756–763, 1998.

SHAW, K.; ROSENBERG, A.; GOLDSTEIN, R.; HE, X.; JACOBS, J.; CRUMP, B.; SAPKOTA, A. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland coastal bays. **PLoS One**, v. 9, p. e8961, 2014.

SHERR, E.; SHERR, F. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. **Antonie Leeuwenhoek**, n. 81, p. 293–308. 2002.

SHERR, E.; SHERR, B. Marine microbes: an overview, p. 13–46. In KIRCHMAN D. L. (eds.), **Microbial ecology of the oceans**. Wiley-Liss, London, United Kingdom, 2000.

SIMIDU, U.; TSUKAMOTO, K. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family Vibrionaceae. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 4, p. 781-790, 1985.

SLATER, J.; GREGSON, L.; DENNING, D.; WARN, P. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. **Medical Mycology**, v. 49, p. 107-113, 2011.

SMOOT, L.; SMOOT, J.; GRAHAMMER, C.; SOMERVILLE, G.; STURDEVANT, E.; MIGLIACCIO, C.; SYLVA, G.; MUSSER, J. Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, 10416-10421, 2001.

SON, M.; MEGLI, C.; KOVACIKOVA, G.; QADRI, F.; TAYLOR, R. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype Variant Clinical Isolates from Bangladesh and Haiti, Including a Molecular Genetic Analysis of Virulence Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, N. 112011, p. 3739–3749, 2011.

SOUZA, K. **Caracterizacao clonal de cepas de Vibrio cholerae isoladas nos estados de Sao Pulo e Paraiba através da técnica de ribotipagem**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SOUZA-SALES, C. **Diversidade de bacterias quitinolíticas isoladas de amostras de água de mar e plancton coletadas na regioa costeira do estados de Sao Pulo, Brasil**. 2001. 204 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

STROEHER, H., MANNING, A. *Vibrio cholerae* serotype O139: swapping genes for surface polysaccharide biosynthesis. **Trends Microbiology**, v.5, p. 178–180, 1997.

SU, Y.; LIU, C. “*Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety”, **Food Microbiology**, v. 24, p. 549-558, 2007.

TANG H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. **Fly (Austin)**, v. 3, p. 105-111, 2009.

TAKEMURA, A.; CHIEN, D.; POLZ, M. Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 38, 2014.

TORANE, V.; KUYARE, S.; NATARAJ, G.; MEHTA, P.; DUTTA, S.; SARKAR, B. Phenotypic and antibiogram pattern of *V. cholerae* isolates from a tertiary care hospital in Mumbai during 2004–2013: a retrospective cross-sectional study. **BMJ open**, v. 6, n. 11, p. e012638, 2016.

THOMAZ, L.; GARCIA-RODAS, R.; GUIMARAES, A.; TABORDA, C.; ZARAGOZA, O.; NOSANCHUK, J. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 139-146, 2013.

THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L.; VICENTE, A. C. P. Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 617-621, 2008.

THOMPSON, F.; THOMPSON, C.; VICENTE, A.; THEOPHILO, D.; HOFER, E.; SWINGS, J. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by FAFLP analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1946-1950, 2003.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOJO, S.; NAGANUMA, F.; ARAKAWA, K.; YOKOO, S. Involvement of both granular cells and plasmotocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 1129-1135, 2000.

TSAI, J.; LOH, J.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-29, 2016.

URASSA, W.; MHANDO, Y.; MHALU, F.; MJONGA, S. Antimicrobial susceptibility pattern of *Vibrio cholerae* O1 strains during two cholera outbreaks in Dar es Salaam, Tanzania. **East African Medical Journal**, v. 77, n. 7, p. 350-353, 2000.

URBANCZYK, H.; AST, C.; HIGGINS, J.; CARSON, J.; DUNLAP, P. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology Society**, v. 57, p. 2823-2829, 2007.

VIEGAS, S.; MIL-HOMENS, D.; ARSÉNIO, F.; ARRAIANO, C. The Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in the Insect Model *Galleria mellonella* Is Impaired by Mutations in RNase E and RNase III. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6124-6133. v. 79, n. 19, 2013.

WAGHMARE, P.; RATHOD, G.; INGOLE, K.; SHAIKH, K.; PATHAK, S. Changing trends in the epidemiology of *Vibrio cholera* in an outbreak of 2013 in Solapur, Maharashtra. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 2, p. 194-196, 2016.

WALDOR, W.; MEKALANOS, J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, v. 272, p. 1910-1914, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention and control of cholera outbreaks: WHO policy and recommendations. p. 1 - 9. 2013. <http://www.who.int/cholera/prevention_control/recommendations/en/index4.html>. **Acesso em: 02 Fevereiro 2017.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia.** p. 46-47, 1999.

WILLIAMSON, D.; MILLS, G.; JOHNSON, J.; PORTER, S.; WILES, S.; In vivo correlates of molecularly inferred virulence among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in the wax moth *Galleria mellonella* model system. **Virulence**, v. 5, p. 388-393, 2014.

XU, S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, L.; ATWELL, W.; GRIMES, J.; COLWELL, R. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology**, v. 8, p. 313-323, 1982.

YAMASAKI, S.; GARG, S.; NAIR, G.B.; TAKEDA, Y. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non-O1 serogroups of *V. cholerae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 115–121, 1999.

ZO, Y.G.; CHOKESAJJAWATEE, N.; ARAKAWA, E.; WATANABE, H.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Covariability of *Vibrio cholerae* microdiversity and environmental parameters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2915–2920, 2008.

5 CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Vibrio cholerae* EM AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL.

5.2.1 Introdução

Os micro-organismos são essenciais para a preservação ambiental e contribuem na estabilidade dos ecossistemas (SHERR et al., 2000; 2002). No ecossistema aquático, particularmente no mar, os micro-organismos são os organismos mais numerosos, possuindo a maior diversidade genética existente, apesar da maior parte das espécies ainda permanecer desconhecida (HEIDELBERG et al., 2002; URAKAWA et al., 2000). Os isolados do gênero *Vibrio* são autóctones do ecossistema, os quais no transcurso do tempo, pela influência de múltiplos fatores, podem se tornar patogênicos, sendo considerados como um risco para a saúde humana e animal. As principais espécies implicadas em surtos de veiculação hídrica e alimentar são *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (AUSTIN, 2005; NARRACCI et al., 2014; ROMALDE et al., 2014; WHO, 2013).

Os métodos atualmente utilizados para a identificação e caracterização destas espécies bacterianas são muito demorados, o que constitui uma desvantagem para o reporte dos surtos. Além disso, a capacidade de diferenciação dos micro-organismos pelos meios empregados não é suficientemente específica (HUQ et al., 2012; WHO, 1999). Assim, outros testes adicionais são necessários, como provas bioquímicas, para serem confirmados os resultados, prolongando o tempo de emissão da análise (BRASIL, 2010; CDC, 1999; FAO, 2004). Entretanto, esses testes não diferenciam entre isolados patogênicos e não patogênicos, razão pela qual a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), passou a ser empregada, uma vez que permite identificar a presença/ausência de *Vibrios* patogênicos (FARUQUE et al., 1998; OTTAVIANI et al., 2009; RODRIGUE et al., 1994; SINGH et al., 2001).

Como estes tipos de metodologias têm caráter qualitativo, outras técnicas têm sido usadas, como o PCR em Tempo Real, permitindo fazer uma determinação rápida e quantitativa dos micro-organismos em amostras alimentares, ambientais ou clínicas. Estudos desenvolvidos para detectar e quantificar espécies do gênero *Vibrio*, particularmente o *V. cholerae*, utilizaram diversos alvos, como genes associados à síntese de lipolissacarídeos, associados à resistência a antibióticos, de proteínas de membrana e associados à virulência, mostrando que esta metodologia é funcional, rápida e sensível (CHATTERJEE et al., 2009; CHO et al. 2013; LALITHA et al. 2008; NANDI et al., 2000; TEH et al., 2010).

5.2.2 Materiais e métodos

5.2.2.1 Isolados microbianos e condições de cultura

Um total de 80 isolados pertencentes ao gênero *Vibrio* e 3 isolados de outros gêneros foram utilizados neste estudo (Apêndice Q). Como controle, foi utilizado o isolado de *V. cholerae* O1 ATCC 14035 originário da Índia, caracterizado por testes bioquímicos, imunológicos como Sorotipo O1 El Tor, *ctx* positivo, que tem sido usado como controle em outros estudos de PCR em Tempo Real (KIM et al., 2012; KONG et al., 2002; LYON, 2001; MARASHI et al., 2013). Os isolados foram inoculados em tubos contendo Água Peptonada Alcalina (APA) e incubados a 28 °C por 24 horas (FDA, 2004). Após a incubação, as culturas microbianas foram semeadas em placas contendo Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sais Biliares e Sacarose) (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) pelo método de esgotamento em placa e incubadas a 28 °C por 24 horas. Uma colônia característica de *V. cholerae* (coloração amarela) foi selecionada e foi inoculada em caldo LB e incubada a 37 °C, com agitação a 150 rpm por 24 horas. A extração do DNA genômico dos micro-organismos foi realizada utilizando o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.2.2.2 Seleção e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores

Os fragmentos dos genes utilizados, *purM* (Fosforibosil-formilglicinamida ciclo-ligase) e *pntA* (Piridina nucleotídeo transidrogenase), foram selecionados no desenho dos oligonucleotídeos para a detecção da espécie *V. cholerae*. Esta seleção baseou-se nas regiões de alta similaridade entre os alinhamentos das sequências de referência de 67 isolados de *V. cholerae*, e nas regiões variáveis das sequências de 12 isolados de outras espécies do gênero *Vibrio*, disponibilizadas na base de dados do MLST de *V. cholerae* (<http://pubmlst.org/vcholerae/>) e da base de dados do GenBank do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI. Entretanto, o fragmento do gene da toxina colérica (CT - subunidades AB - *ctx*) foi específico para a detecção deste gene associado à virulência, previamente avaliado por Guabala, 2006 (Apêndice D, Apêndice R).

Os oligonucleotídeos desenhados e selecionados neste estudo amplificaram fragmentos de aproximadamente 120 pb (*purM*), 130 pb (*pntA*) e 219 pb (*ctxAB*) e a especificidade foi avaliada inicialmente por PCR convencional nos isolados listados no Apêndice Q.

As reações de PCR foram realizadas utilizando os seguintes reagentes: 5 µL de solução tampão 10 X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 5,0 µL de solução mix de dNTPs a 2 mM (Invitrogen), 1,25 µL de cada solução dos iniciadores a 20 µM (Invitrogen), 0,5 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 34,5 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA (50 ng/µL), em um volume final de 50 µL.

As reações de PCR para a detecção do gene da toxina colérica foram realizadas em um volume de 25 µL utilizando os reagentes com a seguinte concentração final: solução tampão com MgCl₂ a 1 X (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), solução mix de dNTPs a 0,2 mM (Promega), iniciadores a 0,8 µM (Sigma-Genosys, St. Louis, MO, EUA), 0,025 U da enzima GoTaq TM Polimerase (Promega).

As condições de amplificação dos genes foram: 94 °C por 2 minutos / 35 ciclos (94 °C por 15 segundos/ 50 °C por 30 segundos / 72 °C por 1 minuto e 30 segundos) / 72 °C por 5 minutos. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf, Nova York, NY, Estados Unidos) e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v), utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) (SAMBROOK et al., 1989).

5.2.2.3 Preparo e extração de DNA

A sensibilidade da PCR em Tempo Real para a detecção de *V. cholerae* e do gene da toxina colérica foi realizada utilizando como referência o isolado de *V. cholerae* ATCC 14035 a uma concentração microbiana medida em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 600 nm a uma D.O de 1.0. Também foi confirmada por contagem em placa, o que correspondeu aproximadamente a $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. O inóculo foi posteriormente submetido a diluições seriadas utilizando água do mar cedida pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP), para obter soluções a uma concentração de 10^8 até 10^0 UFC.mL⁻¹. A suspensão microbiana foi colocada sob agitação a 150 rpm por 5 minutos para a homogeneização do inóculo.

8 mL das amostras de água foram filtrados utilizando a técnica de membrana filtrante (American Public Health Association - APHA, 1998) com membranas GS em Éster de Celulose com poro de (0,22 µm) (Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha) para concentração das células

microbianas e submetidas à extração de DNA genômico utilizando o kit comercial *Power Water*® (MoBio laboratories, Inc. Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foram verificadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

5.2.2.4 Avaliação da sensibilidade da detecção por PCR em Tempo Real de *V. cholerae* e do gene da toxina colérica.

As reações de PCR quantitativo para detecção de *V. cholerae* foram realizadas em um volume final de 20 µL utilizando os seguintes reagentes: 1 X de solução de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems - Life Technologies™, Warrington, UK), 0,25 µM de cada iniciador (Bio-synthesis, Lewisville, TX, EUA) e DNA 50 ng/µL.

As reações de amplificação foram realizadas no sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems - Life Technologies™, Warrington, UK) com as seguintes condições para todos os genes: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 62 °C por 1 minuto. Para avaliar a curva de desnaturação, foi adicionada uma ciclagem de 95 °C por 15 segundos, a 62 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos.

Para o preparo da curva padrão para PCR em Tempo Real na detecção de *V. cholerae*, o DNA usado foi preparado partindo do isolado *V. cholerae* ATCC 14035. O produto da PCR de cada gene testado foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 2000 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Diluições em série 1:10 foram realizadas para criação da curva padrão. Estes foram expressos como número de cópias em cada reação de PCR em Tempo Real, calculado a partir do tamanho do fragmento amplificado em cada padrão, vezes o número de moléculas em 1 mol, dividido pelo tamanho do clone ou do fragmento amplificado, vezes o peso molecular meio de um par de bases. Foram feitas curvas de cada gene em triplicata (SAMBROOK et al., 1989) (Equação 1).

Equação 1 - Fórmula utilizada para o desenvolvimento da curva padrão.

$$\text{Número de cópias} = \frac{\text{xg/ul DNA} * 6,022 \times 10^{23}}{\text{Tamanho do fragmento} * 649 \text{ amplificado (pb)}}$$

Legenda - [xg/ul DNA]: Tamanho do fragmento amplificado; [6,022x10²³]: Número de moléculas em 1 mol; [649]: Peso molecular meio de um par de bases.

5.2.2.5 Avaliação por PCR em Tempo Real da detecção de *V. cholerae* e do gene da toxina colérica em amostras ambientais

Quatro amostras de água doce e sete de água salgada foram coletadas dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. No estado de São Paulo, as amostras de água doce foram coletadas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB dos Rios Mogi Guaçu, Ribeirão dos Porcos, Ribeirão do meio e Cachoeira de cima, no mês de Abril de 2017 (Figura 11).

No estado do Rio de Janeiro, o local selecionado para a coleta das amostras foi a Baía de Guanabara. As coletas foram realizadas em companhia do grupo do Laboratório de Eco toxicologia, do Departamento de Oceanografia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. As amostras de água salgada foram coletadas de seis pontos (P1 - Canal do Cunha; P2 - Cais São Cristovão ; P3 - Canal do Mangue; P4 - Cais Gamboa; P5 - Museu do Amanhã; P9 - Cais Caju), no mês de maio de 2017 (Figura 12), a dez centímetros abaixo da superfície em frascos de polipropileno estéreis.

Figura 11 - Pontos de coleta no Estado de São Paulo selecionados.

Legenda - Os pontos de coleta do projeto encontram-se localizados no quadrante preto. Fonte: Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2013. CETESB - Companhia Ambiental do Estado do São Paulo. <http://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/relatorio-aguas-superficiais-2013-parte1.pdf>

5.2.3 Resultados

5.2.3.1 Seleção e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores

A especificidade de todos os oligonucleotídeos foi determinada utilizando a base de dados do MLST de *V. cholerae* e do Genbank do NCBI e foram confirmadas utilizando o DNA genômico extraído dos oitenta e oito micro-organismos selecionados (Apêndice S, Tabela 6).

Os resultados demonstram que unicamente o DNA genômico de 77 isolados de *V. cholerae* O1 e não O1/não O139 foram positivos para os genes *purM* e *pntA* e 7 isolados amplificaram o fragmento do gene *ctxAB*. Entretanto, o resto de isolados foi negativo para a amplificação destes genes.

Tabela 6 - Especificidade dos oligonucleotídeos desenhados neste estudo para detecção de *Vibrio cholerae* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Isolado	N° de isolados	ORIGEM	Presença (+)/Ausência (-) do produto de PCR		
			<i>pur M</i>	<i>pnt A</i>	<i>ctx AB</i>
<i>V. cholerae</i> não O1	13	Água doce	+	+	-
<i>V. cholerae</i> não O1	1	Clínica	+	+	+
<i>V. cholerae</i> não O1/não O139	36	Água salgada (Região costeira)	+	+	+ *
<i>V. cholerae</i> não O1/não O139	25	Sedimento	+	+	-
<i>V. cholerae</i> O1 ATCC 14035	1	Clínica	+	+	+
<i>V. cholerae</i> O1 IAL 1936	1	Clínica	+	+	+
<i>V. mimicus</i> INQS 00317	1	Clínica	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> IAL 1960	1	Clínica	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	1	Clínica	-	-	-
<i>Aeromonas cavia</i> controle CI	1	Ambiental	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	1	Ambiental	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	Clínica	-	-	-

Legenda - [ctxAB *]: 4 isolados amplificaram este fragmento.

5.2.3.2 Avaliação da sensibilidade da detecção por PCR em Tempo Real de *V. cholerae* e do gene da toxina colérica.

O limite de detecção foi determinado utilizando o número *threshold* (Ct). Com um Ct > 30 foi considerado como negativo para os genes *purM*, *pntA* e *ctxAB* (Figura 13). A correlação entre o Ct e o número de cópias do gene gerou uma reta com um R² de 1 para cada um dos genes.

A análise da curva de temperatura de dissociação (T_m) dos genes *purM*, *pntA* e *ctxAB* mostrou uma temperatura constante de 81,65 °C ± 0,15, 82, 55 °C ± 0,5 e 78,06 °C ± 0,2, respectivamente (Figura 13).

A sensibilidade da metodologia avaliada por meio das diluições do DNA de *Vibrio cholerae* permitiu detectar com os genes *purM* e *pntA* 10⁵ UFC.mL⁻¹ e com o gene *ctxAB* 10⁴ UFC.mL⁻¹ (Figura 13, Apêndice T). Portanto, como a norma padrão estabelece para pesquisa

ambiental de *V. cholerae* a coleta de no mínimo 5 litros de água, a metodologia proposta permite quantificar até 10^2 e 10^1 células/mL com os iniciadores *purM* e *pntA* na primeira concentração e *ctx* na última. Ao avaliar o limite de detecção por PCR convencional dos genes *purM*, *pntA* e *ctxAB*, foi possível amplificar até as 10^4 UFC.mL⁻¹, 10^5 UFC.mL⁻¹, 10^3 UFC.mL⁻¹, respectivamente (Apêndice U).

Figura 13 - Sensibilidade da detecção de *Vibrio cholerae* ATCC 14035 por PCR em Tempo Real.

Legenda - O DNA de *V. cholerae* O1 foi amplificado com cada um dos genes alvo, avaliando a correlação entre o Ct e o logaritmo do número de cópias do gene (Curva Padrão), temperatura de dissociação e o logaritmo do número de cópias do gene com cada uma das diluições. [A]: Gene *purM*; [B]: Gene *pntA*; [C]: Gene *ctxAB*.

5.2.3.3 Avaliação por PCR em Tempo Real da detecção de *V. cholerae* e do gene da toxina colérica em amostras ambientais

Em relação aos valores dos parâmetros físico-químicos das amostras de águas superficiais do Porto da cidade de Rio de Janeiro, nos pontos de coleta, uma variação pequena de temperatura (25,4 a 27,2 °C) foi verificada. Quanto ao parâmetro salinidade, o ponto P3 (28,3‰) apresentou o menor índice de salinidade. Já nas coletas realizadas no

estado de São Paulo, não foi possível obter todas as informações, mas com as disponibilizadas observou-se que o pH se manteve relativamente estável. Os dados dos parâmetros físico-químicos de cada um dos pontos coletados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos das coletas no Rio de Janeiro e São Paulo.

Ponto	Local	Parâmetros físico-químicos				
		Tempo	Temp(°C)	pH (upH)	Salin (o‰)	Conduct (µS/cm)
P1	Canal do Cunha	Nublado	26,9	8,52	31,2	49,8
P2	Cais São Cristovão	Nublado	26,9	8,53	31,7	52,7
P3	Canal do amngue	Nublado	25,9	8,27	28,3	48,2
P4	Cais Gamboa	Nublado	27,2	8,52	32,3	52,1
P5	Museu do amanhã	Nublado	26,6	8,41	32,8	51,3
P9	Cais Caju	Nublado	25,4	8,27	29,6	44,9
MG	Mogi Guaçu	-	17,5	6	35	91
RP	Ribeirão do Porcos	-	22	6,9	-	126
RM	Ribeirão do meio	-	-	-	-	121
CC	Cachoeira de cima	-	-	6	-	65

Por outro lado, foi realizada uma PCR convencional para verificar a presença de potenciais substâncias inibidoras das reações de PCR nas amostras. Foram utilizadas amostras do DNA obtido a partir das águas ambientais filtradas e misturados com DNA do *V. cholerae* ATCC 14035. Os resultados evidenciaram ausência de substâncias inibidoras por meio da amplificação dos fragmentos dos três alvos avaliados (Figura 14). Ao avaliar as amostras de água coletadas, não foi detectada, nem por PCR convencional, nem por PCR em Tempo Real a presença de *V. cholerae* O1 ou não O1/não O139 em nenhum dos pontos avaliados (Apêndice V).

Figura 14 - Produtos de amplificação de PCR convencional dos fragmentos dos genes *purM* para identificação da espécie *Vibrio cholerae*.

Legenda - [M]: marcador de peso molecular MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA); [1-6]: Pontos do P1 até o P6; [7-8]: Controle negativo; [9]: DNA ponto P1 + DNA do isolados de *V. cholerae* O1 (ATCC 14035); [10]: DNA ponto P2 + DNA do isolados de *V. cholerae* O1 (ATCC 14035); [11]: DNA ponto P3 + DNA do isolados de *V. cholerae* O1 (ATCC 14035); [12]: Controle negativo; [13]: Controle positivo de *V. cholerae* O1 (ATCC 14035); [14]: negativo.

5.2.4 Discussão

5.2.4.1 Seleção e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores

A complementação das técnicas clássicas com as convencionais tem sido de muita importância, uma vez que tem permitido a detecção e caracterização de micro-organismos associados com surtos de diversas origens (BANG, 1999; DAVIS, et al., 2004; FISHER-LE et al., 2002). Ao nível molecular, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), múltiplos genes foram propostos como marcadores genéticos para a identificação da presença de patógenos a partir de DNA ou diretamente das amostras avaliadas (LEE, 1997; NHUNG et al., 2007; RIVERA et al., 2001; WEI et al., 2014).

No entanto, é de relevante importância, não apenas a identificação qualitativa dos micro-organismos, mas também a sua avaliação quantitativa porque a produção da sintomatologia da doença está associada, entre outros fatores, ao número de micro-organismos ingerido pelo indivíduo (BENNISH, et al., 1994; CASH, et al., 1974; HOLMGREN, et al., 1977; NELSON et al., 2009). Por tal motivo, avanços como a técnica de PCR em Tempo Real tem sido implementados para a detecção e quantificação de forma rápida, confiável e partindo de amostras de diversas origens, como alimentares, ambientais ou clínicas (COUTARD, 2007; KAUFMAN et al. 2004; WEI et al., 2014).

Esta metodologia pode utilizar sondas específicas de DNA como Taqman ou agentes fluorescentes que se intercalam no DNA como SYBR Green I PCR, onde os produtos obtidos são diferenciados pela curva de *meltig* (CARAGUEL et al., 2011; ELFVING et al., 2014; GIGLIO et al., 2003; LARIANOV et al., 2005; TONG et al., 2008; YUAN et al., 2006). O uso desta metodologia e suas variantes é de utilidade na detecção e quantificação de diversos micro-organismos, o que apresenta um significativo impacto no estudo de análise de riscos (CHUA; GUBLER, 2013; DETER, et al 2010). Isto se deve a que os dados obtidos por esta metodologia, além das medições dos parâmetros físico-químicos e eventos climáticos, podem contribuir no desenvolvimento de modelos preditivos para avaliar a proliferação de espécies patogênicas, além de ajudar na caracterização de períodos de risco, o que vai ser de benefício para a saúde pública (DETER, et al 2010; LOZANO-LEON et al., 2003; MARTINEZ-URTAZA et al., 2008; 2010).

Estudos para validar a técnica de detecção e quantificação de espécie do gênero *Vibrio*, entre elas o *V. cholerae*, foram realizados, avaliando a presença de genes associados

à virulência, da síntese de lipolissacarídeos, associados à resistência a antibióticos, de proteínas de membrana, entre outros genes, tendo sido verificado que esta metodologia era funcional, rápida e sensível (BLACKSTONE et al. 2007; FISHER et al., 2002; FYKSE, 2007; GUBALA; PROLL, 2006; GUBALA, 2006; HUQ et al., 2001; LYON, 20012).

Entretanto, neste estudo foram propostos iniciadores desenhados, partindo das sequências de dois *housekeeping genes* de isolados coletados do ecossistema aquático brasileiro e caracterizados como *V. cholerae*, com o intuito de detectar e quantificar populações deste micro-organismo específicas deste ecossistema. Os resultados evidenciaram a detecção de isolados de *V. cholerae* e não identificaram outras espécies do gênero *Vibrio*, indicando que os oligonucleotídeos propostos mostraram especificidade para identificar *V. cholerae*, o que é de muita importância devido às dificuldades na caracterização de espécies deste gênero (LE ROUX et al., 2004; SAWABE et al., 2007; THOMPSON et al., 2003).

5.2.4.2 Avaliação da sensibilidade da detecção por PCR em Tempo Real de *V. cholerae* e do gene da toxina colérica.

A complexidade e composição das amostras de origem ambiental pode alterar a sensibilidade nas metodologias moleculares, interferindo na extração de DNA e na eficiência da detecção do alvo. Isto se deve à presença de matéria orgânica suspensa e sedimento (BAAR et al., 2011; SCHRIEWER et al., 2011; TSAI et al., 1992). Assim, metodologias de extração de DNA microbiano a partir de água de mar têm sido previamente relatadas (BOCCUZZI et al., 1998; RIVERA et al., 2003; SOMMERVILLE et al., 1989). No entanto, para padronizar e agilizar os processos de detecção de micro-organismos, metodologias rápidas de extração foram disponibilizadas, fornecendo resultados reproduzíveis (JERDE et al., 2011; MORAES et al., 2014; SANTOS et al., 2012; STEFFEN ET AL., 2012). Neste estudo, para o preparo da amostra de água, o Kit utilizado permitiu a extração de uma concentração de DNA apropriada, de boa qualidade e pureza.

Além disso, os *housekeeping genes* propostos foram utilizados em diversos estudos para caracterizar a relação evolutiva entre isolados de *V. cholerae* pandêmicos, uma vez que amplificam proteínas que participam em vias metabólicas fundamentais deste micro-organismo (ESTEVES et al., 2015; OCTAVIA et al., 2013; SALIM et al., 2005; SIRIPHAP et al., 2017). Assim mesmo, foi relatado que o gene *pntA* apresentou maior variação em análises de comparação de sequência entre espécies do gênero *Vibrio*, característica que contribui na

detecção diferenciada das espécies (TEH et al., 2010). O uso do gene *ctxA* na identificação de isolados toxigênicos de *V. cholerae* é altamente específico, porque foi demonstrada a presença de uma única cópia deste gene no genoma do micro-organismo (BLACKSTONE et al., 2007). Assim, trata-se de um excelente indicador da potencial virulência dos micro-organismos (GUABALA., 2006).

Foi relatado na literatura com o gene *pntA* um limite de detecção de 2×10^3 UFC.mL⁻¹ de *V. cholerae* por PCR convencional (TEH et al., 2010). Tirapattanun, et al. (2015), utilizando Sybrgreen, detectaram 10^2 UFC.mL⁻¹ tendo como alvo genes que codificam proteínas de membrana e genes associados à virulência. Entretanto, em amostras de origem ambiental, foi detectada a presença de *V. cholerae* entre 10^3 e 10^4 UFC.mL⁻¹ utilizando os genes *mshA*, *epsM*, *rtxA* e *tcpA* (GUABALA., 2006). Do mesmo modo, Wei, et al. (2014) detectaram com multiplex PCR em Tempo Real 10^5 UFC.mL⁻¹ em amostras misturadas com DNA de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*.

Também outros alvos foram avaliados com o intuito de identificar *V. cholerae* e outras espécies do gênero *Vibrio* como proteínas e lipoproteínas de membrana externa (*ompW*, *lolB*, *gbpA*), assim como reguladores da virulência (*toxR*), revelando uma detecção exitosa do micro-organismo (CHATTERJEE et al., 2009; CHO et al. 2013; LALITHA et al. 2008; NANDI et al., 2000). Assim, foram detectadas 3.7×10^3 UFC.mL⁻¹ de *V. harveyi* e de 6×10^2 UFC.mL⁻¹ de *V. aestuarianus* e *V. vulnificus* utilizando o gene *ToxR* (CAMPBELL et al., 2003, PANICKER et al., 2005, SAULNIER et al., 2009; SCHIKORSKI et al., 2013). Em *V. cholerae*, utilizando os gene *lolB*, *ompW* e *gbpA* foram detectadas $1,42 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ no primeiro e 1×10^2 UFC.mL⁻¹ nos dois últimos (BLIEM et al., 2015; CHO et al. 2013; VEZZULLI et al., 2015).

Em suma, os resultados do estudo são comparáveis ao relatado na literatura quanto ao limite de detecção evidenciado ao avaliar nesses estudos diferentes genes como os associados a proteínas de membrana e à virulência, entre outros (CHATTERJEE et al., 2009; CHO et al. 2013; GUABALA., 2006; LALITHA et al. 2008; NANDI et al., 2000). Além disso, a análise do limite de detecção dos oligonucleotídeos desenhados e da metodologia proposta evidenciou que, para a detecção da espécie, os dois fragmentos dos genes constitutivos utilizados foram prevalentes nos isolados avaliados.

A resposta da detecção do gene *ctx* neste estudo foi de 10^2 UFC.mL⁻¹, apresentando, portanto, melhores resultados que aqueles obtidos por Ferdous, et al. (2016), que avaliaram o gene *ctxA* apresentando um limite de detecção de 3.2×10^4 UFC.mL⁻¹ com DNA genômico.

Isto indica que o oligonucleotídeo selecionado no estudo é sensível, proporcionando um limite de detecção menor. Os resultados são comparáveis com os de Blackstone, et al. (2007), onde foram identificadas $< 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$.

5.2.4.3 Avaliação por PCR em Tempo Real da detecção de *V. cholerae* e do gene da toxina colérica em amostras ambientais

Segundo a literatura, o ambiente aquático e seus produtos derivados são reconhecidos como fonte primária de veiculação do *V. cholerae* (HUEHN et al., 2014; LO et al., 2012). A prevalência deste micro-organismo já foi detectada em amostras de água salgada, lastro e frutos do mar por metodologias clássicas e moleculares (FYKSE et al., 2012; GDOURA et al., 2016; ROBERT-PILLOT et al., 2014; TAMINIAU et al., 2014; YANO et al., 2014; YU et al., 2009).

No presente trabalho, não foi possível a detecção de *V. cholerae* nas dez amostras coletadas do ambiente aquático, tanto no Rio de Janeiro (água salgada), quanto em São Paulo (água salgada e doce). Entretanto, os parâmetros físico-químicos dos pontos amostrais se apresentaram como condicionantes ideais para o estabelecimento de espécies do gênero *Vibrio*, e foram comparáveis com os dados obtidos a partir de estudos prévios (BURBANO-ROSETO et al., 2011; JACOBS et al., 2014; OBERBECKMANN et al., 2012; SANTANA et al., 2015; TAKEMURA et al., 2014; TURNER et al., 2014).

A baixa frequência da detecção de *V. cholerae* foi relatada por Rivera, et al. (2013), quando foram avaliadas amostras coletadas de diferentes portos do Brasil, três locais do litoral de São Paulo e água de lastro, verificando a presença de um único isolado *V. cholerae* O1 toxigênico em água de lastro. Igualmente, em Belém do Pará, foi isolado um baixo número de *Vibrio cholerae* não-O1 e não-O139 num período de sete anos (DE SÁ et al., 2007). Assim mesmo, Garrido-maestu, et al. (2014) e Rodriguez-Castro (2010; 2012) relataram a baixa incidência de *V. vulnificus* e a carência de *V. cholerae* no período do verão na Espanha. Já, Tout, et al. (2015) não detectaram isolados de *V. cholerae* toxigênicos utilizando o gene *ctxA* nas águas estuarinas do porto de Sydney.

Contudo Santana, et al. (2015) isolaram quatorze presuntivos isolados de *V. cholerae* de amostras de águas portuárias superficiais na Baía de Guanabara, no Estado de Rio de Janeiro, onde foram coletados 500 mL de água de sete pontos utilizando metodologias clássicas de enriquecimento e utilizando oligonucleotídeos para identificação de espécie que amplificam a região do gene ITS 16S – 23S rDNA (CHUN et al., 1999).

Este mesmo fragmento utilizado do gene 16S rRNA relatado por Chun, et al. (1999) para identificação de espécie, foi selecionado como o primeiro candidato a ser avaliado no presente estudo. No entanto, observou-se uma baixa especificidade tanto em PCR convencional, quanto em PCR em Tempo Real, uma vez que amplificava isolados de *V. mimicus* e apresentava mais de um fragmento por isolado, neste estudo. Também foram relatados problemas na resolução ao nível de gênero ou espécie por meio do sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA em estudos com outros gêneros bacterianos pelo que foi utilizada a metodologia do MLSA para identificação de espécie avaliando sete *housekeeping genes* (ESTEVES et al., 2015; JANDA et al., 2007; OCTAVIA et al., 2013; SALIM et al., 2005).

Adicionalmente, o resultado obtido por Santana e colaboradores (2015) pode ter sido influenciado pelo período de coleta das amostras, já que a coleta foi realizada de março a julho, período destinado à primeira etapa do processo de dragagem da zona portuária. Isto possibilitou a mistura do material em suspensão dos sedimentos com a coluna d'água onde essas amostras foram coletadas, favorecendo a obtenção de isolados da família *Vibrionaceae*. Além disso, a ausência de possíveis inibidores da PCR, como substâncias orgânicas presentes nas amostras, foi confirmada por PCR convencional e observada no gel de agarose, indicando a efetividade da metodologia (ABBASZADEGAN et al., 1993; BAAR et al., 2011; SCHRIEWER et al., 2011; TSAI; OLSON, 1992).

Assim sendo, os iniciadores aqui descritos (*purM* e *ctxAB*) possibilitam um método rápido, específico e sensível, comparável com os resultados relatados na literatura, para detectar e quantificar a presença de *V. cholerae*, bem como para a confirmação da sua toxigenicidade em amostras de água. A ausência de *V. cholerae* em amostras de água doce e salgada de origem ambiental indica que o número de UFC estava em concentração abaixo do limite de detecção da metodologia proposta no momento da coleta, sugerindo um baixo nível de risco de surto nesse momento em particular. Mas, para confirmar o nível de risco, é preciso incrementar o número de pontos de coleta e incluir amostras de sedimento e da coluna de água para ter um panorama mais fidedigno do que pode estar acontecendo no ecossistema aquático avaliado.

5.2.5 Conclusões

- Os oligonucleotídeos propostos mostraram especificidade para identificar *V. cholerae* de outras espécies do gênero *Vibrio*, pelas metodologias de PCR convencional e PCR em Tempo Real.
- É viável detectar a presença de *V. cholerae* com os genes *purM*, *pntA* e *ctxA* por meio de PCR em Tempo Real.
- A metodologia proposta permite quantificar até 10^2 células/mL com os iniciadores *purM* e *pntA* e 10^1 células/mL com o iniciador *ctx* de *V. cholerae*.
- A ausência de *V. cholerae* em amostras de água doce e salgada de origem ambiental indica uma concentração inferior ao limite de detecção da metodologia no momento da coleta. Por conseguinte, sugere-se aumentar o número de pontos de coleta e a inclusão de amostras de sedimento e da coluna d'água para obter um panorama geral da presença e quantidade de *V. cholerae* no ecossistema aquático em avaliação.
- A metodologia proposta mostrou ser rápida, específica e com uma boa sensibilidade para monitorar a presença de *V. cholerae*, bem como para a confirmação da sua potencial toxigenicidade.

APÊNDICES

Q - Informação dos isolados selecionados no estudo para a padronização da metodologia de PCR em Tempo Real.

Isolado	Nº de isolados	ORIGEM
<i>V. cholerae</i> não O1	13	Água doce
<i>V. cholerae</i> não O1	1	Clínica
<i>V. cholerae</i> não O1/não O139	36	Água salgada (Região costeira)
<i>V. cholerae</i> não O1/não O139	25	Sedimento
<i>V. cholerae</i> O1 ATCC 14035	1	Clínica
<i>V. cholerae</i> O1 IAL 1936	1	Clínica
<i>V. mimicus</i> INQS 00317	1	Clínica
<i>V. vulnificus</i> IAL 1960	1	Clínica
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	1	Clínica
<i>Aeromonas cavia</i> controle CI	1	Ambiental
<i>Bacillus subtilis</i>	1	Ambiental
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	Clínica

Legenda - Os isolados de água doce, água salgada e 21 isolados de sedimento foram caracterizados no capítulo 1 como *V. cholerae*. O isolado de *V. cholerae* O1 de origem clínica, os 4 isolados de sedimento foram caracterizados em outros trabalhos e eram utilizados como referência no laboratório de Microbiologia Ambiental e Ecologia Microbiana Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e coordenado pela Profa. Dra. Irma Rivera.

R - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção de espécie e do fragmento do gene associado à virulência.

Alvo	Housekeeping Gene	Produto	Iniciador 5' - 3'	Tamanho (bp)	Referência
Detecção de <i>V. cholerae</i>	<i>purM</i>	Fosforibosil-formilglicinamida ciclo- ligase	purMF - TGTGTCGGTGTCTCG	120	Este estudo
			purMR - GCGAGTAACCGTTGGAGT		
	<i>pntA</i>	Piridina nucleotideo transidrogenase	pntAF - TAT CGT CCG CGC GTT TG	130	Este estudo
			pntAR - CATCCGACATCTCTTAGCATAACC		
Detecção dos Factores associados a virulência	<i>ctxAB</i>	Fragmento do gene CT - subunidades AB	ctxabF - GGTCTTATGCCAGAGGACAG ctxabR - GTTGGGTGCAGTGGCTATAAC	219	GUABALA, 2006

S - Produtos de amplificação de PCR dos fragmentos dos genes *purM* e *pntA* para identificação de espécie *Vibrio cholerae* e do fragmento do gene *ctx* da toxina colérica.

Legenda - [M]: marcador de peso molecular MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA); [1]: Iniciador *purM* para Identificação de espécie no isolado *V. cholerae* O1 (ATCC 14035); [2]: Controle negativo; [3]: Iniciador *pntA* para Identificação de espécie no isolado *V. cholerae* O1 (ATCC 14035); [4]: Controle negativo; [5]: Iniciador *ctxAB* para Identificação do fragmento do gene associado a virulência no isolado *V. cholerae* O1 (ATCC 14035); [6]: Controle negativo.

T - Curva padrão dos genes *purM*, *pntA* e *ctxAB* para avaliação da sensibilidade na detecção de *Vibrio cholerae* por PCR em Tempo Real.

Curva padrão do gene <i>purM</i> para avaliação da sensibilidade na detecção de <i>Vibrio cholerae</i> por PCR em Tempo Real		
Identificação da diluição	Diluição	Células.mL ⁻¹
Vc	1,0 x 10 ⁸ UFC.mL ⁻¹	100000000
-2	1,0 x 10 ⁶ UFC.mL ⁻¹	1000000
-3	1,0 x 10 ⁵ UFC.mL ⁻¹	100000
-4 ●	1,0 x 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹	10000
-5	1,0 x 10 ³ UFC.mL ⁻¹	1000
-6 ● ●	1,0 x 10 ² UFC.mL ⁻¹	100
-7	1,0 x 10 ¹ UFC.mL ⁻¹	10

Legenda - Diluições sucessivas do isolado de *V. cholerae* O1 (ATCC 14035) [● ●]: Detecção de das células com os Iniciadores *purM* e *ctxAB*; [●]: Detecção de das células com o Iniciador *pntA*.

U - Produtos de amplificação de PCR dos fragmentos dos genes *purM*, *pntA* e *ctxAB* para identificação de espécie *Vibrio cholerae* utilizando como DNA as diluições realizadas dos inóculos 1:10.

Legenda - Diluições sucessivas do isolado de *V. cholerae* O1 (ATCC 14035) [A]: Iniciador *purM*; [B]: Iniciador *pntA*; [C]: Iniciador *ctxAB*; [M]: marcador de peso molecular MassRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA); [1]: 10^8 UFC.mL⁻¹; [2]: Controle negativo; [3]: 10^7 UFC.mL⁻¹; [4]: 10^6 UFC.mL⁻¹; [5]: 10^5 UFC.mL⁻¹; [6]: 10^4 UFC.mL⁻¹; [7]: 10^3 UFC.mL⁻¹; [8]: 10^2 UFC.mL⁻¹; [9]: 10^1 UFC.mL⁻¹

V - Logaritmo do número de cópias do gene alvo na detecção de *Vibrio cholerae*.

Legenda - [A]: Detecção utilizando o gene *purM*; [B]: Detecção utilizando o gene *pntA*; [C]: Detecção utilizando o gene *ctxAB*.

REFERÊNCIAS[‡]

- ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M.S.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1318–1324, 1993.
- APHA. Stsndsrd Methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation**, 20th ed. Washington. 1998.
- AUSTIN, B. Bacteria pathogens of marine fish. In: BELKIN, S; COLWELL, R. R. O. (eds.) *Oceans and Health: pathogens in the marine environment*. Dordrecht: Kluwer, 2005. p. 391-413
- BAAR, C.; D'ABBADIE, M.; VAISMAN, A.; ARANA, M.E.; HOFREITER, M.; WOODGATE, R. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 4, p. 39-51, 2011.
- BENNISH M. Cholera: pathophysiology, clinical features, and treatment. in: **Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives**. eds Wachsmuth I. K., Blake P. A., Olsvik . ASM Press, Washington, D.C. p. 229–255, 1994.
- BLACKSTONE, G.M.; NORDSTROM, J.L.; BOWEN, M.D.; MEYER, R.F.; IMBRO, P.; DEPAOLA, A. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 2, p. 254-259, 2007.
- BLIEM, R.; SCHAUER, S.; PLICKA, H.; OBWALLER, A.; SOMMER, R.; STEINRIGL, A.; ALAM, M.; REISCHER, GH.; FARNLEITNER, AH.; KIRSCHNER, A. A novel triplex quantitative PCR strategy for quantification of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 3077–3085. doi:10.1128/AEM.03516-14. 2015.
- BOCCUZZI, M.; STRAUBE, L.; RAVEL, J.; COLWELL, R.; HILL, T. Preparation of DNA extracted from environmental water samples for PCR amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 31, p. 193–199, 1998.
- BRASIL. **Boletim de qualidade das águas da região hidrográfica - Baía de Guanabara bacia da baía de guanabara**. Boletim N°3/10/2016. Pontos de coleta de monitoramento do Instituto Estadual do Ambiente - INEA <http://www.inea.rj.gov.br>. 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de Vigilância Epidemiológica da Cólera** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010. 170 p. : il. color. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) A 1ª edição intitulou-se: Manual Integrado de Prevenção e Controle da Cólera. ISBN 978-85-334-1743-4. 2010.
- BURBANO-ROSETO, E. M.; UEDA-ITO, M.; KISIELIUS, J. J.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; ALMEIDA, B. C.; SOUZA, C. P.; MARKMAN, C.; MARTINS, G. G.; ALBERTINI, L.; RIVERA, I. N. G. Diversity of Somatic

[‡] De acordo com:

Coliphages in Coastal Regions with Different Levels of Anthropogenic Activity in São Paulo State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4208-4216, 2011.

CAMPBELL, M.S.; WRIGHT, A.C. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7137-7144, 2003.

CARAGUEL, C.; STRYHN, H.; GAGNE, N.; DOHOO, I.; HAMMELL, L. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 2-15, 2011.

CASH, A.; MUSIC, I.; LIBONATI, P.; SNYDER, J.; WENZEL, P.; HORNICK, B. Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. Clinical, serological, and bacteriologic responses to known inoculum. **Journal of Infectious Diseases**, v. 129, p. 45-52, 1974.

CDC, **Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera**. http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_99_8_EN/en/index.html, Atlanta, GA: CDC, 1999.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado do São Paulo (São Paulo) **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2013** [recurso eletrônico] / CETESB. São Paulo, p.1-313. **CETESB**, 2014.

CHATTERJEE, S.; GHOSH, K.; RAYCHOUDHURI, A.; CHOWDHURY, G.; BHATTACHARYA, M. K.; MUKHOPADHYAY, A. K. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1087-1095, 2009.

CHO, M. S.; AHN, T.-Y.; JOH, K.; PAIK, S.-Y.; KWON, O.-S.; JHEONG, W.-H. A novel marker for the species-specific detection and quantitation of *Vibrio cholerae* by targeting an outer membrane lipoprotein lolB gene. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 555-559, 2013.

CHUA, K. B.; GUBLER, D. J. Perspectives of public health laboratories in emerging infectious diseases. **Emerging Microbes & Infections**, v. 2, n. 6, p. 1-6. <http://doi.org/10.1038/emi.2013.34>, 2013.

CHUN, J.; RIVERA, I.N.G.; COLWELL, R.R. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2202-2208, 1999.

COUTARD, FRANÇOIS., LOZACH, SOLEN., POMMEPUY, MONIQUE., HERVIO-HEATH, DOMINIQUE. Real-Time Reverse Transcription-PCR for Transcriptional Expression Analysis of Virulence and Housekeeping Genes in Viable but Nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after Recovery of Culturability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5183-5189, 2007. doi:10.1128/AEM.02776-06

DE SÁ, L.; RODRIGUES, E.; DE OLIVEIRA, E.; DE JESUS, I.; MENDONÇA, N.; THEOPHILO, G.; DA SILVA F.; HOFER, E.; LOUREIRO, E. Vigilância ambiental para cólera na região metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 a 2006. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, N. 4, p. 449 - 466, 2007.

DETER, J.; LOZACH, S.; VERON, A.; CHOLLET, J.; DERRIEN, A.; HERBIO-HEATH, D. Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 929-937, 2010.

ELFVING, K.; ANDERSSON, M.; MSELLEM, M.; WELINDER-OLSSON, C.; PETZOLD, M.; BJÖRKMAN, A.; TROLLFORS, B.; MÅRTENSSON, A.; LINDH, M. Real-time PCR threshold cycle (Ct) cut-offs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1-22. published online doi:10.1128/JCM.02697-13. 2014.

ESTEVE, K.; MOSSER, T.; AUJOUAT, F.; HERVIO-HEATH, D.; MONFORT, P.; JUMAS-BILAK, E. Highly diverse recombining populations of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in French Mediterranean coastal lagoons. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 700- 708. doi: 10.3389/fmicb.2015.00708, 2015.

FARUQUE, S. M. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3752-3757, 1998.

FERDOUS, J.; HOSSAIN, Z.; TULSIANI, S.; RASHID, R.; JENSEN, P.; BEGUM, A. Optimization and Validation of Real Time PCR Assays for Absolute Quantification of toxigenic *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **Tropical Biomedicine**, v. 33, n. 4, p. 641–651, 2016.

FISCHER-LE SAUX, M.; HERVIO-HEATH, D.; LOAEC, S.; COLWELL, R.; POMMEPUY, M. Detection of Cytotoxin-Hemolysin mRNA in Nonculturable Populations of Environmental and Clinical *Vibrio vulnificus* Strains in Artificial Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11. p. 5641–5646, 2002.

FYKSE, E., NILSEN, T., DESSEN, A., TRYLAND, I., DELACROIX, S., BLATNY, J. Real-time PCR and NASBA for rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* in ballast water. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64 p. 200–206, 2012.

FYKSE, E.; SKOGAN, G.; DAVIES, W.; STRAND, O.; JARAN, M.; BLATNY, J. Detection of *Vibrio cholerae* by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5. p. 1457–1466, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION Kaysner, C., DePaola, A. BAM: *Vibrio*. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 9. *Vibrio*. 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>>. Acesso em: 10 janeiro 2017.

GARRIDO-MAESTU, A.; CHAPELA, M.-J.; PENARANDA, E.; VIEITES, J. M.; CABADO, A. G. In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). **Food Control**, v. 37, p. 371-379, 2014.

GDOURA, M.; SELLAMI, H.; NASFI, H.; TRABELSI, R.; MANSOUR, S.; ATTIA, T.; NSAIBIA, S.; VALLAEYS, T.; GDOURA, R.; SIALA, M. Molecular Detection of the Three Major Pathogenic *Vibrio* Species from Seafood Products and Sediments in Tunisia Using Real-Time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 12, p. 2086–2094, doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-205, 2016.

GIGLIO S.; MONIS P.T.; SAINT C.P. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR, **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 22, e136. DOI 10.1093/nar/gng135, 2003.

GUBALA, A. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 2, p. 278–293, 2006.

GUBALA, A.; PROLL, D. Molecular-Beacon Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6424–6428, 2006.

HOLMGREN, J.; SVENNERHOLM, M. Mechanisms of disease and immunity in cholera: a review. **Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 105-112, 1977.

HUEHN, S.; EICHHORN, C.; URMERSBACH, S.; BREIDENBACH, S.; BECHLARS, S.; BIER, N.; ALTER, T.; BARTELT, E.; FRANK, C.; OBERHEITMANN, B.; GUNZER, F.; BRENNHOLT, N.; BOER, S.; APPEL, B.; DIECKMANN, R.; STRAUCH, E. Pathogenic vibrios in environmental, seafood, and clinical sources in Germany, **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 843-850, 2014.

HUQ, A.; HALEY, J.; TAVIANI, E.; CHEN, A.; HASAN, N. A.; COLWELL, R. Detection, Isolation, and Identification of *Vibrio cholerae* from the Environment. **Current Protocols in Microbiology**, v. 26 A:6A.5:6A.5.1–6A.5.51, 2012.

JACOBS, J. M.; RHODES, M.; BROWN, C. W.; HOOD, R. R.; LEIGHT, A.; LONG, W. Modeling and forecasting the distribution of *Vibrio vulnificus* in Chesapeake Bay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 117, p. 1312–1327.doi:10.1111/jam.12624, 2014.

JERDE, C.; MAHON, A.; LINDSAY, C.; LODGE, D.; JOHNSON, F.; SHUNK, I. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. 2010. **Conservation Letters**, v. 4, p. 150–157, 2011.

KAUFMAN, G.E.; BOWEN, M.D.; MEYER, R.F.; DEPAOLA, A.; BOWERS, J.; BLACKSTONE, G.M.; VICKERY, M.C.L.; BEJ, A.K. Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2424–2429, 2004.

KIM, H. J.; LEE, H. J.; LEE, K. H.; CHO, J. C. Simultaneous detection of Pathogenic *Vibrio* species using multiplex real-time PCR. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 491-498, 2012.

KONG, R. Y. C.; LEE, S. K. Y.; LAW, T. W. F.; LAW, S. H. W.; & WU, R. S. S. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. **Water research**, v. 36, n. 11, p. 2802-2812, 2002.

LALITHA, P.; SURAIYA, M. N. S.; LIM, K. L.; LEE, S. Y.; HASLINDAWATY, A. R. N.; CHAN, Y. Y. Analysis of *lolB* gene sequence and its use in the development of a PCR assay for the detection of *Vibrio cholerae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 1, p. 142-144, 2008.

LARIANOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A. Standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 1–16, 2005.

LE ROUX, F.; GAY, M.; LAMBERT, C.; NICOLAS, J.L.; GOUY, M.; BERTHE, F. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. **Disease of aquatic organisms**, v. 58, p. 143–150, 2004.

LEE, K.K.; YU, S.R.; LIU, P.C. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma 1997. prawn, *Penaeus japonicus*. **Current Microbiology**, v.34, n. 2, p.110-117. 1997.

LO, S.; BLOKESCH, M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*, **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002778, 2012.

LOZANO-LEON, A.; TORRES, J.; OSORIO, C.; MARTÍNEZ-URTAZA, J. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from na outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226 p. 281-284, 2003.

LYON W. J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4685–4693, 2001.

MARASHI, A.; MAHMOUD, S.; RAJABNIA, R.; FOOLADI, I.; ALI, A.; HOJATI, Z.; NASR, B. Determination of ctxAB expression in *Vibrio cholerae* Classical and El Tor strains using Real-Time PCR. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 2, n. 1, p. 9-13, 2013.

MARTINEZ-URTAZA, J.; BOWERS, J.; TRINANES, J.; DE PAOLA, A. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1780-1790, 2010.

MARTINEZ-URTAZA, J.; HUAPAYA, B.; GAVILAN, R. G.; BLANCO-ABAD, V.; ANSEDE-BERMEJO, J.; CADARSO-SUAREZ, C. Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. **Epidemiology**, v. 19, p. 829–837, 2008.

MORAES, P.; FRANCO, D.; PELLIZARI, V.; GOMES, F. Effect of plankton-derived organicmatter on themicrobial community of coastal marine sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 461, p. 257–266, 2014.

NANDI, B.; NANDY, R. K.; MUKHOPADHYAY, S.; NAIR, G. B.; SHIMADA, T.; GHOSE, A. C. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4145-4151, 2000.

NARRACCI, M.; ACQUAVIVA, I.; CAVALLO, A. Mar Piccolo of Taranto: *Vibrio* biodiversity in ecotoxicology approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v.21, p. 2378–2385. doi:10.1007/s11356-013-2049-3. 2014.

NELSON, E.; HARRIS, J.; MORRIS, J.; CALDERWOOD, S.; CAMILLI, A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p. 693-702, 2009.

NHUNG, P. H.; SHAH, M. M.; OHKUSU, K.; NODA, M.; HATA, H.; SUN, X. S.; IIHARA, H.; GOTO, K.; MASAKI, T.; MIYASAKA, J.; EZAKI, T. The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 309-315, 2007.

OBERBECKMANN, S.; FUCHS, B. M.; MEINERS, M.; WICHELS, A.; WILTSHIRE, K. H.; GERDTS, G. Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 543–551, doi:10.1007/s00248- 011-9990-9, 2012.

OCTAVIA, S.; SALIM, A.; KURNIAWAN, J.; LAM, C.; LEUNG, Q.; AHSAN, S. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing. **PLoS One**, v. 8, n. 6, e65342, doi: 10.1371/journal.pone.0065342 PMID: 23776471, 2013.

OTTAVIANI, D.; LEONI, F.; ROCCHEGIANI, E.; SANTARELLI, S.; MASINI, L.; DITRANI, V.; CANONICO, C.; PIANETTI, A.; TEGA, L.; CARRATURO, A. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 47–53, 2009.

PANICKER, G.; BEJ, A. K. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5702-5709, 2005.

RIVERA, I.; SOUZA, K.; SOUZA, P.; LOPES, R. Free-living and plankton-associated vibrios: assessment in ballast water, harbor areas, and coastal ecosystems in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 443, p. 1- 8, 2013.

RIVERA, I. N. G.; LIPP, E. K.; GIL, A.; CHOOPUN, N.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 599-606, 2003.

RIVERA, I.N.G.; CHUN, J.; HUQ, A.; SACK, R.B.; COLWELL, R.R. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p. 2421-2429. 2001.

ROBERT-PILLOT, A.; COPIN, S.; HIMBER, C.; GAY, M.; QUILICI, ML. Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 75–81, 2014.

RODRIGUE, C.; POPOVIC, T.; WACHSMUTH, K. Non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 infection in the Unites States, p. 69–76. In: WACHSMUTH, I.; BLAKE, P.; OLSVIK, R. (ed.), ***Vibrio cholerae and cholera—molecular to global perspective***. American Society for Microbiology, Washington. D.C., 1994.

RODRIGUEZ-CASTRO, A. **Origen, distribucion y caracterizacion de vibrios patogenos humanos en el medio ambiente marino de galicia**. Santiago de Compostela. 2012

RODRIGUEZ-CASTRO, A.; ANSEDE-BERMEJO, J.; BLANCO-ABAD, V.; VARELA-PET, J.; GARCIA- MARTIN, O.; MARTINEZ-URTAZA, J. Prevalence and genetic diversity of athogenic populations of *Vibrio parahaemolyticus* in coastal waters of Galicia, Spain. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 1, p. 58-66, 2010.

ROMALDE, J.; DIÉGUEZ, A.; LASA, A.; BALBOA, S. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1 - 11, doi: 10.3389/fmicb.2013.00413, 2014.

SALIM, A.; LAN, R.; REEVES, P. R. *Vibrio cholerae* Pathogenic Clones. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1758–1760, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, EE.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual.2da Ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1989.

SANTANA, E.; VIANAI, C.; RIVERA, I.; WEDEKIND, E. Verificação de *V. cholerae* em águas portuárias da cidade do Rio de Janeiro, Brasil: um ensaio metodológico DOI: 10.3395/2317-269x.00553 **Vigilância sanitaria em debate**, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2016.

SANTOS, H.; CARMO, F.; LEITE, D.; JESUS, H.; DE CARVALHO, P.; ALMEIDA, C.; SORIANO, A.; ALTOMARI, D.; SUHETT, L.; VÓLARO, V.; VALONI, E.; FRANCISCO, M.; VIEIRA, J.; ROCHA, R.; SARDINHA, B.; MENDES, L.; JOÃO, R.; LACAVA, B.; JESUS, R.; SEBASTIAN, G.; PESSOA, A.; VAN, ELSAS.; REZENDE, R.; PIRES, D.; DUARTE, G.; CASTRO, C.; ROSADO, A.; PEIXOTO, R. Comparison of different protocols for the extraction of microbial DNA from reef corals. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 517-527, 2012.

SAULNIER, D.; DE DECKER, S.; HAFFNER, P. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. **Journal Microbiological Methods**, v. 77, p. 191-197, 2009.

SAWABE, T.; KITA-TSUKAMOTO, K.; THOMPSON, F. Inferring the Evolutionary History of *Vibrios* by Means of Multilocus Sequence Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7932–7936, 2007.

SCHIKORSKI, T.; RENAULT, C.; PAILLARD, A.; BIDAULT-TOFFIN, D.; TOURBIEZ, D.; SAULNIER, D. Development of TaqMan Real-Time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. **Aquaculture**, v. 395, p. 106-112, 2013.

SCHRIEWER, A.; WEHLMANN, A.; WUERTZ, S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 16-21, 2011.

SHERR, E.; SHERR, F. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. **Antonie Leeuwenhoek**, n. 81, p. 293–308. 2002.

SHERR, E.; SHERR, B. Marine microbes: an overview, p. 13–46. In KIRCHMAN D. L. (eds.), **Microbial ecology of the oceans**. Wiley-Liss, London, United Kingdom, 2000.

SINGH, D.; MATTE, M.; MATTE, R.; JIANG, S.; SABEENA, F.; SHUKLA, N.; SANYAL, C.; HUQ, A.; COLWELL, R. Molecular Analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 Strains: Clonal Relationships between Clinical and Environmental Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 910–921, 2001.

SIBONI, N.; BALARAJU, V.; CARNEY, R.; LABBATE, M.; SEYMOUR, JR. Spatiotemporal Dynamics of *Vibrio* spp. within the Sydney Harbour Estuary. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 460 - 470, doi: 10.3389/fmicb.2016.00460, 2016.

SIRIPHAP, A.; LEEKITCHAROENPHON, P.; KAAS, RS.; THEETHAKAEW, C.; AARESTRUP, FM.; SUTHEINKUL, O.; HENDRIKSEN, R. Characterization and Genetic Variation of *Vibrio cholerae* Isolated from Clinical and Environmental Sources in Thailand. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169324, doi:10.1371/journal.pone.0169324, 2017.

SOMMERVILLE, C.; KNIGHT, T.; STRAUBE, L.; COLWELL, R. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 548–554, 1989.

STEFFEN, M. M.; LI, Z.; EFFLER, T. C.; HAUSER, L. J.; BOYER, G. L. Comparative Metagenomics of Toxic Freshwater Cyanobacteria Bloom Communities on Two Continents. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

TAKEMURA, A. F.; CHIEN, D. M.; ANDPOLZ, M. F. Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 38-45, doi:10.3389/fmicb.2014.00038, 2014.

TALL, A.; TEILLON, A.; BOISSET, C.; DELESMONT, R.; TOURON-BODILIS, A.; HERVIO-HEATH, D. Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp. Strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 361–372, 2012.

TAMINIAU, B.; KORSACK, N.; LEMAIRE, C.; DELCENSERIE, V.; DAUBE, G. Validation of real-time PCR for detection of six major pathogens in seafood products. **Food Control**, v. 44, p. 130-137, 2014.

TEH, C. S. J.; CHUA, K. H.; THONG, K. L. Simultaneous differential detection of human pathogenic and nonpathogenic *Vibrio* species using a multiplex PCR based on *gyrB* and *pntA* genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1940–1945, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04599.x, 2010.

THOMPSON, F. L.; LI, Y.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, C. C.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; RUPP, G. S.; A.; PEREIRA, A.; DEBEM, M. M.; SORGELOOSAND, P.; SWINGS, J. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 245-252, 2003.

TIRAPATTANUN, A.; CHOMVARIN, C.; WONGBOOT, W.; KANOKTIPPORNCHAI, B. Application of SYBR Green Real-Time PCR for Detection of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic Environment Chiang Mai **Journal of Materials Science**, v. 42, N. 3, p. 588-598, 2015.

TONG, Y.; TANG, W.; KIM, H. J.; PAN, X.; RANALLI, T.; KONG, H. Development of isothermal TaqMan assays for detection of biothreat organisms, **Biotechniques**, v. 45, n. 5, p. 543-557. DOI 10.2144/000112959, 2008.

TSAI, Y.L.; OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2292-2295, 1992.

TSAI, Y. L.; OLSON, B. H. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 754– 757, 1992.

TURNER, J.; MALAYIL, L.; GUADAGNOLI, D.; COLE, D.; LIPP, E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 1019–1028, 2014.

TOUT, J.; SIBONI, N.; MESSER, L. F.; GARREN, M.; STOCKER, R.; WEBSTER, N. S.; SEYMOUR, J. R. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 420-432, 2015.

URAKAWA, H.; YOSHIDA, T.; NISHIMURA, M.; OHWADA, K. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. **Environmental Microbiology**, v.2, p. 542–554, 2000.

VEZZULLI, L.; STAUDER, M.; GRANDE, C.; PEZZATI, E.; VERHEYE, H. M.; OWENS, N. J. P.; PRUZZO, C. *gfpA* as a Novel qPCR Target for the Species-Specific Detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1/Non- O139 in Environmental, Stool, and Historical Continuous Plankton Recorder Samples. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, e0123983. doi:10.1371/journal.pone.0123983, 2015.

WEI, S.; ZHAO, H.; XIAN, Y.; HUSSAIN, A.; WU, Y. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 115–118, 2014.

WONG, ML.; MEDRANO, JF . Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, p. 75–85, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention and control of cholera outbreaks: WHO policy and recommendations. p. 1 - 9. 2013. <http://www.who.int/cholera/prevention_control/recommendations/en/index4.html>. **Acesso em: 02 Fevereiro 2017.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia. p. 46-47, 1999.

YANO, Y.; HAMANO, K.; SATOMI, M.; TSUTSUI, T.; BAN, M.; AUE-UMNEOY, D. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. **Food Control**, v. 38, p. 30-36, 2014.

YU, X., LIU, H.; HUANG, S. Monitoring of *Vibrio cholerae* in Bullfrog and Water of livestock farm, Strait. **Journal of Preventive Medicine**, v. 4, p. 30-31, 2009.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; NEAL, S. Statistical analysis of real time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 85, p. 1-12, 2006.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste estudo, verificou-se que as metodologias clássicas podem ser utilizadas como *screening* inicial para o isolamento de micro-organismos pertencentes à família *Vibrionaceae*, mas necessitam ser complementadas com testes moleculares para uma identificação apropriada. De fato, os sete *housekeeping genes* utilizados permitiram caracterizar de forma específica setenta dos isolados como pertencentes à espécie *V. cholerae*.
- A população avaliada foi geneticamente homogênea com os sete *housekeeping genes* usados, mas foi heterogênea quanto aos genes associados à virulência avaliados e ao perfil de susceptibilidade aos antibióticos, indicando a presença no ambiente aquático de isolados com potencial patogênico. Portanto, este tipo de estudo evidencia a importância do monitoramento de *V. cholerae* no ambiente aquático, como medida que contribua na vigilância e prevenção de doenças.
- Na avaliação da infecção experimental no modelo invertebrado animal de *G. mellonella* com isolados de *V. cholerae*, observou-se que existe uma correlação entre a concentração do inóculo e a temperatura de incubação, incrementando a virulência. Adicionalmente, não foi evidenciada uma diferenciação quanto à presença ou ausência dos diversos genótipos avaliados no modelo invertebrado animal, indicando que a infecção neste modelo pode estar influenciada pela presença de outros genes associados à virulência em *V. cholerae*.
- Os isolados avaliados de *V. cholerae* apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina (CIP) e tetraciclina (TET). Entretanto, dos 70 isolados caracterizados, 4,28% apresentaram resistência a ampicilina (AMP) e apenas um isolado apresentou resistência a ampicilina (AMP), trimetopim (TRI) e apresentou um perfil intermediário para cloranfenicol (CLO).
- Os oligonucleotídeos propostos mostraram especificidade na detecção e quantificação de *V. cholerae* com os genes *purM*, *pntA* e *ctxAB* por PCR convencional e por PCR em Tempo Real.
- A ausência de *V. cholerae* em amostras de água de origem ambiental indica uma concentração de micro-organismos inferior ao limite de detecção da metodologia nas amostras avaliadas. Assim sendo, a metodologia proposta mostrou ser rápida, específica e sensível para monitorar a presença de *V. cholerae*, bem como para a confirmação da sua potencial toxigenicidade.