

**Caracterização por meio de métodos moleculares de
cepas ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas
no Brasil**

Martha Virginia Ribeiro Rojas

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Faculdade de Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Saúde Pública**

**Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientador: Prof. Associado Glavur Rogério Matté**



**São Paulo
2007**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

49282 | 2008 doc

Dedicatória

**À minha mãe,
por todo incentivo à minha carreira.**

Agradecimentos

Ao professor Dr. Glavur Rogério Matté, por todos os ensinamentos, dedicação, conquistas e orientação neste trabalho.

À professora Dra. Maria Helena Matté, pela co-orientação, oportunidade, dedicação, confiança em meu trabalho, e por ter me ensinado a nunca me deixar abater diante das dificuldades.

À minha amiga de sempre, Vandréia, pelo carinho, incentivo desde a época de FUNDAP, e por estar sempre presente nos bons momentos de minha vida e, até nos "não tão bons" assim.

À Fernanda e Rosinha, pelo carinho, por compartilharem as infinitas "séries bioquímicas" no laboratório e por todas as horas "extras" que permanecemos nele.

Às queridas amigas, Ronalda e Livia, por todo o apoio no laboratório, incentivo, risadas, conversas, cafés, congressos, relatórios, "géis de agarose" e por todos os desabafos compartilhados.

Aos colegas de "Saúde Pública", Tiago Rocca, Sirlei, Marcellus, Carlos Gambaro, Roberto Hoffman, Jaber e Artemir, pela troca de idéias e pelo carinho.

Às amigas Jeane e Valéria, que sempre me passaram força e coragem para continuar...

À minha querida amiga e colega bióloga, Luana (Lu), com quem compartilhei vários episódios durante a pós-graduação, e que sabe tão bem quanto eu o que é a realização de um trabalho científico. Obrigada querida!

Ao Guilherme Matté (Gui), por tornar o dia, ou melhor, a noite, mais leve e feliz. Por sempre estar de bem com o mundo, e por me fazer rir mesmo quando eu me sentia exausta.

À Dra. Solange Martone Rocha, pela amizade, carinho, apoio nas coletas em São Sebastião e na realização do trabalho.

À Maria do Carmo Dória, pelo carinho, amizade, auxílio nas coletas e pelo apoio técnico de laboratório.

Aos amigos Kaio Nabas Ribeiro e Marcello Telles, pela amizade e carinho, sempre!

Aos queridos Luís Fernando Rêgo e Pedro Rêgo, pelo auxílio nas coletas em São Sebastião, pela hospitalidade e pelo carinho.

Ao aluno "agregado", Pedro Miguel da Costa Pedro, pelas dicas nos experimentos e por compartilhar os PCRs "extras", cantando "Ebony and Ivory" e Elvis.

Aos membros da Banca Examinadora, Dra. Maria Inês Zanoli Sato e Dra. Maria Bernadete de Paula Eduardo, pelas sugestões para a realização da versão final da dissertação.

À bióloga Mirian Lopes da Silva, do Laboratório de Saúde Pública, pelo auxílio técnico oferecido em laboratório.

À Dra. Eliana Roxo, por sempre se preocupar e me incentivar na área da pesquisa.

À professora Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues, do Instituto Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), por ter doado a cepa controle da coleção de culturas de seu laboratório, de grande importância para a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Prática de Saúde Pública, Seção de Pós-Graduação, Informática e Biblioteca desta instituição, por todo o apoio técnico e administrativo cedido durante minha estada aqui como aluna.

Ao Jairo, Paulo e aos demais funcionários que integram o quadro da Área de Segurança da FSP, por serem tão atenciosos e prestativos.

Às estagiárias do Programa de Aprimoramento Profissional (PAP/FUNDAP), do Laboratório de Saúde Pública desta instituição, Lícia, Cíntia e Elizabeth, pela ajuda oferecida no laboratório.

Ao CECOVisA (Centro de Colaboração em Vigilância Sanitária) da USP, pelo apoio prestado ao projeto, por meio do Convênio CA nº 06/99-44-ANVSMA.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por financiarem minha bolsa de mestrado.

Em especial

À Minha mãe, por todo o carinho, apoio e incentivo.

Ao meu irmão Renato, por sempre estar presente em minha vida.

À Dra. Lucia Baldassi, uma das responsáveis por minha chegada até aqui. A quem devo, literalmente, minha "iniciação científica". Humana, como poucas pessoas que conheci e aprendi a admirar e respeitar. Alguém de quem sempre irei me lembrar.

À Milena Dropa (Mi),

Pelos ensinamentos no laboratório, pela amizade incondicional, pela sinceridade, honestidade, paciência, dedicação, e por transmitir tanta paz e serenidade durante todo o tempo.

Ao amigo de todas as horas, César Camilo Pileggi (Cesinha), por todo o carinho e companheirismo desde a faculdade de biologia, e por sempre cuidar, compreender e acreditar em mim.

RESUMO

Rojas MVR. Caracterização por métodos moleculares, de cepas ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas no Brasil. [dissertação de mestrado]. São Paulo, Brasil: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2007.

Introdução - *Vibrio parahaemolyticus* é uma espécie de ambiente marinho, responsável por gastroenterite humana e associada a diversos surtos, epidemias e pandemias. As gastroenterites estão relacionadas às cepas produtoras de hemolisina termoestável direta (TDH) e hemolisina análoga à termoestável (TRH), consideradas os principais fatores de virulência da espécie. **Objetivos** – estudar a viabilidade dos métodos moleculares para confirmar a identificação das cepas de *V. parahaemolyticus*; conhecer a distribuição dos genes relacionados à virulência (*tdh*, *trh*), e do gene *tl*; e conhecer a diversidade genotípica entre os isolados. **Material e Métodos** – 52 cepas ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* do Brasil foram analisadas. Para confirmar a identificação das espécies e pesquisar a presença dos genes *tdh*, *trh* e *tl*, os isolados foram submetidos a análises moleculares pela PCR, com primers específicos. A diversidade genotípica foi analisada pela técnica de PFGE, e a extração plasmidial seguida de eletroforese também foi realizada. **Resultados** – A identificação de todas as 52 cepas foi confirmada pela PCR como sendo *V. parahaemolyticus*. O gene *tl* esteve presente nos 52 (100%) isolados, o gene *tdh* foi identificado em 2 (3,8%) deles, enquanto que o gene *trh*, não foi detectado em nenhuma das cepas estudadas. **Conclusões** – A freqüente presença do gene *tl* pode indicá-lo como um marcador para a detecção do agente. A baixa detecção do gene *tdh* em cepas ambientais é comum de acordo com a literatura. Este estudo revela a efetividade da PCR na confirmação taxonômica da espécie e na detecção de genes de virulência. A análise dos perfis moleculares possibilitou a observação da diversidade genotípica entre os isolados, nos

quais também foi possível observar a presença de plasmídios. As técnicas moleculares mostraram ser um importante instrumento no campo da saúde pública, podendo auxiliar no monitoramento do patógeno no meio ambiente, contribuindo com as autoridades sanitárias.

Descritores: Saúde Pública; Vigilância Sanitária; *Vibrio parahaemolyticus*; Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR); Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).

ABSTRACT

Rojas MVR. Caracterização por métodos moleculares, de cepas ambientais de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas no Brasil./Characterization by molecular methods of *Vibrio parahaemolyticus* environmental strains isolated in Brazil. [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2007.

Introduction - *Vibrio parahaemolyticus* is a species from marine environment, responsible for human gastroenteritis and associated to several outbreaks, epidemics and pandemics. Gastroenteritis are related to strains producing thermostable direct hemolysin (TDH) and thermostable direct hemolysin-related (TRH), considered the main virulence factors of the species. **Objectives** – to study the viability of molecular methods to confirm the identification of isolates of *V. parahaemolyticus*; to know the distribution of genes related to virulence (*tdh*, *trh*), and of the gene *tl*; and to know the genetic diversity among isolates. **Material and Methods** – Fifty-two (52) environmental *V. parahaemolyticus* strains from Brazil were analyzed. To confirm species identification and search for the presence of genes *tdh*, *trh* and *tl*, the isolates were submitted to molecular analysis by PCR with specific primers. The genetic diversity was analyzed by PFGE technique, and the plasmid extraction followed by electrophoresis was also carried out. **Results** – The identification of the 52 isolates was confirmed by PCR as *V. parahaemolyticus*. The *tl* gene was present in 52 (100%) isolates, *tdh* gene was identified in 2 (3,8%) of them, while *trh* gene was not detected in any studied strain. **Conclusions** – The frequent presence of *tl* gene can indicate it as a marker for the microorganism detection. The low detection of *tdh* gene in environmental strains is a common finding according the literature. This study reveals an effectiveness of PCR in the taxonomic confirmation of the species and in the virulence genes detection. The fingerprinting analysis of isolates it made possible to observe the genetic diversity among isolates, in which it was also possible to observe the presence of plasmids. Molecular

techniques showed to be an important tool in the public health field, once they can help in the pathogen monitoring in the environment, contributing to the sanitary authorities.

Descriptors: Public Health; Sanitary Surveillance; *Vibrio parahaemolyticus*; Polymerase Chain Reaction (PCR); Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1
1.2 PATOGENICIDADE EM HUMANOS.....	7
1.2.1 FATORES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA.....	10
1.3 IMPORTÂNCIA DA APLICAÇÃO MÉTODOS MOLECULARES NA PESQUISA COM MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	12
1.3.1 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	13
1.3.2 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	16
1.3.3 PERFIL PLASMIDIAL.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 ESTOCAGEM DAS CEPAS.....	20
4.2 PREPARAÇÃO DAS CEPAS PARA A REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS MOLECULARES.....	24
4.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	24
4.3 TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	25

4.3.1 INICIADORES E CONDIÇÕES DE CICLOS DE PCR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
4.3.2 PESQUISA DE GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA DA ESPÉCIE.....	26
4.3.3 INICIADORES E CONDIÇÕES DE CICLOS DE PCR, UTILIZANDO A PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DE GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i> E DO GENE <i>tl</i>	27
4.4 TÉCNICA DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	28
4.4.1 PREPARAÇÃO DO <i>plug</i>	28
4.4.2 DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	29
4.4.3 CONDIÇÕES PARA A REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PFGE.....	30
4.5 PESQUISA DE PLASMÍDIOS.....	31
4.5.1 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	31
4.6 PREPARAÇÃO DO ÁGAR WAGATSUMA PARA DETECÇÃO DE BETA HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	33
5 RESULTADOS	34
5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>V. parahaemolyticus</i>	34
5.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE PELA PCR.....	37
5.3 PESQUISA DE GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA (<i>tdh</i> , <i>trh</i>) E GENE <i>tl</i> , PELA PCR MULTIPLEX.....	38

5.4	DETECÇÃO DE KANAGAWA EM ÁGAR WAGATSUMA...	42
5.5	COMPARAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO, POR MEIO DA PFGE, ENTRE AS CEPAS DE <i>V. parahaemolyticus</i>	43
5.6	COMPARAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO, POR MEIO DA PFGE, ENTRE AS CEPAS DE <i>V. parahaemolyticus</i>	47
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÕES	66
8	REFERÊNCIAS	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vista parcial do ponto de coleta das amostras (próximo a um emissário de efluentes domésticos), localizado sob a Ponte do Pontal da Cruz, São Sebastião, São Paulo..... 23
- Figura 2 - Vista panorâmica do ponto de coleta das amostras (área de influência salina)..... 23
- Figura 3 - Gel de agarose (3%), corado com brometo de etídeo (1µg/mL), resultante da PCR de cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental. M = 150kb; C+ = Controle-positivo; 901b-751d = cepas de *V. parahaemolyticus*; V.h = *V. harveyi* (controle-negativo); 702-896b = cepas de *V. parahaemolyticus*; B = Branco..... 37
- Figura 4 - Gel de agarose (3%), corado com brometo de etídeo (1µg/mL), resultante da detecção dos genes *tdh*, *tl*, *trh*, em cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental, pela PCR-Multiplex. 1ª. Linha: M = 100kb DNA Ladder, 62 = *V. parahaemolyticus* (controle-positivo); *E.coli* = controle-negativo; 295-178 = *V. parahaemolyticus*; *E. coli*; Vm = controles negativos; 65-48 = *V. parahaemolyticus*. 2ª. Linha: M = 100kb DNA Ladder, 54-230 = *V. parahaemolyticus*; 244-128 = controle-negativo; 211-1014 = *V. parahaemolyticus*; B = Branco..... 38

Figura 5 - Fotografias das placas de AW, resultado da beta hemólise/ Fenômeno Kanagawa (K+) produzido por cepas de *V. parahaemolyticus* de origem ambiental. 62 = Controle-positivo; Colônias 178, 295, 1014 = *V. parahaemolyticus* (K+); Colônia 344 = cepa de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental, Kanagawa-negativa (K-)..... 42

Figura 6 - Gel de agarose (1,1%), corado com brometo de etídio (1µg/mL), representando os perfis de bandas, gerados a partir da enzima *Sfil*, obtidos pela PFGE, em cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental. M = 485kb; 900b-464 = cepas de *V. parahaemolyticus*; V.h = cepa de *V.harveyi*; 62 = cepa controle-positivo de *V. parahaemolyticus*..... 43

Figura 7 - Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE, de 15 das 20 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras de água. Incluindo-se, uma cepa controle-positivo (62 C) e outra, controle-negativo (*V. harveyi*)..... 45

Figura 8 - Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE, de 20 das 32 cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de ostras. Incluindo-se, uma cepa controle-positivo (62 C) e outra, controle-negativo (*V. harveyi*)..... 46

Figura 9 - Gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio (1µg/mL), resultante da eletroforese (6V/cm/1h), realizada a partir da extração plasmidial de cepas de *V. parahaemolyticus* de origem ambiental. M = *Hind* III; 454-1144= cepas de *V. parahaemolyticus*; M = *Hind* III..... 47

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Testes bioquímicos utilizados na caracterização de cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de água, coletadas em um ponto do rio Ribeirão da Fazenda, localizado em São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo, Brasil..... 35
- Quadro 2 - Testes bioquímicos utilizados na caracterização de *V. parahaemolyticus* isolados de amostras de ostras, coletadas em pontos distintos, localizados no Litoral Sul de São Paulo, Brasil..... 36
- Quadro 3 - Resultados dos testes de identificação dos genes de virulência (*tdh*, *trh*) e gene *tl*, e presença de beta-hemólise em cepas de *V. parahaemolyticus*, obtidas de cepas isoladas de amostras de água, coletadas em um ponto do rio Ribeirão da Fazenda, localizado em São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo, Brasil..... 40
- Quadro 4 - Resultados dos testes de identificação dos genes de virulência (*tdh*, *trh*) e gene *tl*, e presença de beta-hemólise (K+) para cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras de ostras, provenientes do Litoral Sul de São Paulo, Brasil..... 41
- Quadro 5 - Distribuição das cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de ostras, segundo o número de plasmídios observados..... 48

Quadro 6 - Distribuição das cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de água, segundo o número de plasmídios observados..... 49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais de *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus é uma espécie pertencente ao gênero *Vibrio* e a família *Vibrionaceae*. É um bacilo gram-negativo, halofílico, curvo ou reto, móvel, não formador de esporos; produtor das enzimas catalase e oxidase; anaeróbio facultativo. Apresenta flagelo polar quando em meio de cultivo líquido e, flagelos peritríquios quando em meio sólido. Encontra-se distribuído em ambiente marinho e requer 2 a 3% de cloreto de sódio (NaCl) para se manter sob suas condições normais (Joseph et al. 1982; MacCarter 2001, Barboni 2002, Farmer JJ et al. 2005).

As características bioquímicas de *V. parahaemolyticus* são descritas na literatura como: fermenta a glicose, não produz gás, fermenta a maltose, manitol, manose e, não fermenta a lactose, salicina, sacarose e sorbitol. Não produz acetoina: Voges-Proskauer (VP) negativo. É observada a variação na fermentação da arabinose. É positivo para a produção de indol, lisina e ornitina descarboxilase; reduz nitrato a nitrito e degrada a gelatina e a lecitina. Não dehidrolisa a arginina e tampouco hidrolisa a esculina. Uma característica muito importante, mas variável, em *V. parahaemolyticus*, é a hemólise de eritrócitos, conhecida como Fenômeno Kanagawa (Joseph et al. 1982; Farmer JJ et al. 2005).

A ecologia da espécie vem sendo extensivamente estudada, principalmente em relação à temperatura e salinidade. Sua temperatura mínima de crescimento ocorre entre 9 e 10°C, e ao máximo de, aproximadamente, 44°C; a temperatura ótima encontra-se entre 35 e 37°C e seu pH entre 7,5 e 8,0 (Joseph et al. 1982), sendo que, a presença da bactéria, pode ocorrer acima e abaixo desses valores (Adams & Moss 2002).

Pesquisadores brasileiros apontam que há maior ocorrência de vibrios nas regiões tropicais, devido à salinidade das águas costeiras, onde são apanhados mariscos, e ressaltam baixa e alta salinidade, como fatores restritivos à espécie (Magalhães et al. 1992). Kelly & Stroh (1988), afirmam que infecções gastrintestinais, causadas por *V. parahaemolyticus*, são mais frequentes nos meses de verão, período em que sua distribuição quantitativa no ambiente marinho é maior. Outros estudos relatam casos de isolamento de *V. parahaemolyticus* em baixas concentrações salinas, da ordem de 2,74 a 4,16 Unidades Práticas de Salinidade (UPS) (Lira et al. 2001).

De acordo com pesquisas realizadas por Magalhães et al. (1991), onde foram identificadas cepas de *V. parahaemolyticus* em espécimes fecais humanas, o Brasil oferece condições propícias à infecções gastrintestinais por vibrios, especialmente no Nordeste, onde a temperatura da água está sempre acima de 20°C, o consumo de mariscos e peixes pela população é elevado e o controle sanitário é precário.

Nos meses frios, *V. parahaemolyticus* pode ser encontrado no lodo marinho; nos meses quentes é encontrada livremente na água do mar, peixes e moluscos (CVE 2003). Watkins e Cabelli (1985) em suas pesquisas, observaram que *V. parahaemolyticus* pode ser encontrado em águas poluídas por efluentes domésticos, onde há maior concentração de nutrientes, o que auxilia na estimulação de seu desenvolvimento. Lira et al. (2001) e Serra et al. (2003) em estudos realizados no Brasil isolaram o patógeno de ambientes estuarinos, moderadamente poluídos com esgotos domésticos. Em ambiente marinho, as concentrações de *V. parahaemolyticus* podem variar de acordo com fatores que produzam alterações no zooplâncton, incluindo temperatura, luminosidade, concentração de nutrientes, fitoplâncton e correntes marítimas (Hernandez et al. 2005).

V. parahaemolyticus foi isolado pela primeira vez em 1950, durante um extenso surto de gastroenterite, ocorrido na cidade de Osaka no Japão, onde ocorreram 20 óbitos entre os 272 casos. O surto foi ocasionado pela ingestão de "shirasu" (espécie de sardinha), não submetida à cocção. (Fujino et al. 1951). Além da espécie poder ser encontrada na água do mar e concentrada em moluscos bivalves filtradores, como ostras e mexilhões, e ser considerada patogênica para esses animais e para o homem, também pode ser encontrada em carne de caranguejo, camarões e pescados (Sousa 1989; Center Disease for Control - CDC 1997; Pereira et al. 2004).

V. parahaemolyticus é conhecido como um dos principais agentes causadores de doenças de origem alimentar nos EUA. As infecções gastrintestinais em humanos estão frequentemente associadas à ingestão de produtos de origem marinha, consumidos crus ou mal cozidos. A ingestão de números elevados do organismo pode causar além de gastroenterite, septicemia, e em alguns casos, levar o indivíduo à morte (CDC 1997; Daniels 2000; Yeung et al. 2002).

Diversas espécies do gênero *Vibrio* podem ser potencialmente patogênicas para o homem e preocupam os cientistas, como é o caso de *V. parahaemolyticus*, que se encontra entre os patógenos mais importantes relacionados a alimentos nas regiões asiáticas e em outros países de litoral extenso (Matté 2003).

Em Taiwan, *V. parahaemolyticus* tornou-se o patógeno responsável por mais de 50% dos casos de toxinfecção alimentar, relacionados a surtos, que ocorrem anualmente (Chiou et al. 2000). Nas últimas décadas, estudos demonstraram que a espécie foi considerada responsável por 40 a 70% dos casos de toxinfecção alimentar ocorrentes no Japão; (Makino et al. 2003). Em 1999, ocorreu um surto de gastroenterite na França, que afetou 44 indivíduos em decorrência da ingestão de camarão importado da Ásia, contaminado por *V. parahaemolyticus* (Lemoine et al. 1999).

Em 2002, no Brasil, ocorreu um surto de gastroenterite por *V. parahaemolyticus* envolvendo participantes de um evento científico na cidade de Fortaleza (Ceará). Segundo a Vigilância Sanitária do Município de Fortaleza (Regional II) o surto foi ocasionado pelo consumo de "patinhas de caranguejo", ingeridas cruas, servidas em um dos hotéis da região. As cepas isoladas das fezes dos pacientes envolvidos foram identificadas, por um laboratório de referência no país, como "Kanagawa-positivas", O3:K6, que estão relacionadas à surtos pandêmicos em diversas regiões do mundo (Oliveira et al. 2002).

No Chile, *V. parahaemolyticus* é considerado um patógeno emergente e a associação entre o consumo de mariscos crus ou mal cozidos e surtos epidêmicos é muito clara (Nair & Opazo 2005; Heitmann et al. 2005). A espécie também foi responsável por epidemias nas cidades de Antofagasta (1998) e Puerto Montt (2004) e, após estudos realizados, foi observado que as cepas eram de origem pandêmica, sorotipo O3:K6. Pesquisas moleculares, então realizadas, demonstraram ser um clone patogênico que emergira no sudeste asiático em 1996, que se disseminou e causou uma pandemia (Hernandez et al. 2005; González-Escalona et al. 2005).

Nas investigações epidemiológicas de doenças gastrintestinais, causadas por *V. parahaemolyticus*, podem ser aplicadas técnicas de sorotipagem das cepas, por onde é possível determinar a classificação antigênica, baseada nos antígenos somático (O) e capsular (K). O esquema antigênico de tipagem para essa espécie foi desenhado pela primeira vez por Sakazaki, em 1963 no Japão e, complementado posteriormente, por outros pesquisadores. Existem kits comerciais que reconhecem para a espécie 13 grupos O e 71 tipos K, todos com potencial patogênico. (Igushi et al. 1995).

Os sorogrupos O3:K6, O4:K68, O5:K15 O1:KUT (K não sorotipado) têm sido os mais frequentemente relacionados com infecções gastrintestinais por *V. parahaemolyticus*, na Ásia e EUA, nos últimos 5 anos (Chowdhury et al. 2000; Cabrera-García et al. 2004). A partir de amostras ambientais isoladas na costa francesa, também foi possível detectar o sorotipo O3:K6 (Quilici et al. 2005).

Pereira et al. (2007), em pesquisa realizada no Brasil, com cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de mexilhões, observaram a ocorrência de 10 sorotipos diferentes: O10:K52 (3) O9:K56 (2), O10:KUN (2), O1:K25 (1) , O2:K3 (1), O2:K30 (1) , O3:K6 (1), O5:KUN (1), O8:K15 (1), e O8:K60 (1). Entre esses sorotipos é destacado o O3:K6, pandêmico.

O fundamento da expansão do clone O3:K6 de *V. parahaemolyticus* ainda permanece uma incógnita, sendo que seu nível de produção de TDH e sua suscetibilidade antimicrobiana, não se diferenciam de outras cepas patogênicas da espécie. Especula-se que sua capacidade de persistir no meio ambiente e/ou sua habilidade de produzir infecção, são as bases de seu êxito como patógeno (Yi-Shin et al. 2003).

1.2 Patogenicidade em humanos

A espécie *V. parahaemolyticus* encontra-se entre as 3 principais espécies do gênero *Vibrio* consideradas patogênicas para o homem. Causadora de gastroenterite aguda, apresenta os seguintes sintomas: cólicas abdominais, diarreia aquosa, náuseas, vômitos, cefaléia e febre branda. Esses sintomas em geral ocorrem, aproximadamente 24 horas após a ingestão do microrganismo. A infecção é autolimitada, de severidade moderada. A dose infectiva é geralmente maior que um milhão de organismos (Nair & Opazo 2005; CDC 2005; CVE 2003).

Efeitos patogênicos causados por infecções gastrintestinais em humanos estão associados às cepas produtoras de *Thermostable Direct Hemolysin* (TDH) - hemolisina termoestável direta - e *Thermostable Direct Hemolysin-related* (TRH) - hemolisina análoga à termoestável, as quais estão relacionadas ao Fenômeno Kanagawa, que pode ser identificado pela hemólise tipo beta em Ágar Wagatsuma (Honda & Iida 1993; Wagatsuma 1968).

Embora pesquisadores afirmem que somente membros da espécie *V. parahaemolyticus* que produzam TDH e/ou TRH, podem ser considerados patogênicos e causar gastroenterite aguda (Nishibuchi & Kaper 1995), outros estudos têm levantado a hipótese de que outros fatores possam contribuir para a virulência desse organismo (Magalhães et al. 1991; (Akeda et al. 2002; Ottaviani et al. 2005). Codificada pelos genes *tdh* e *trh*, respectivamente, essas hemolisinas são consideradas os principais fatores de virulência da espécie. Segundo estudos, cepas virulentas podem apresentar *tdh* + e *trh* -, enquanto algumas são *trh* + *tdh* - (Lee & Pan 1993). A similaridade genética entre as duas hemolisinas é de 68,6% (Iida et al. 1998). Outro gene (*tl*), da hemolisina termolábil (TLH), é constantemente observado nessa espécie, porém sua relação com patogenicidade para o homem, ainda não foi estabelecida (Bej. et al. 1999). Leitão e Arina (1976) em pesquisas realizadas no Brasil, afirmaram que cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas a partir de ambiente marinho, apresentam pouca ou nenhuma atividade hemolítica. Honda et al. (1991) em estudos realizados no Japão, isolaram cepas "Kanagawa-negativas", produtoras de uma hemolisina diferente das TDH e TRH, porém, semelhante a ambas, a qual foi denominada TDH/I. Nishibuchi & Kaper (1990) pesquisando a relação entre variações fenotípicas e variações da seqüência de nucleotídeos do gene *tdh* de *V. parahaemolyticus* TDH+ notaram que, culturas hemólise-positivas, típicas fenotipicamente, carregavam duas cópias do gene *tdh* no

cromossomo, designadas *tdh1* e *tdh2*, sendo a *tdh2* quem expressava, primariamente, a atividade hemolítica.

Pesquisas moleculares revelaram que o gene *tdh* encontra-se ausente na maioria das cepas ambientais de *V. parahaemolyticus*, e presente, em algumas cepas de *V. mimicus* e *V. cholerae* não-O1. Há também evidências de que ocorra transferência dos genes, *tdh* e *trh*, via plasmídios e/ou elementos de inserção. O potencial de mobilidade desses genes sugere ainda, que essa espécie pode ter adquirido esses genes de um organismo ancestral (Nishibuchi & Kaper 1995; Makino et al. 2003).

Existem controvérsias a respeito do teste Kanagawa em *V. parahaemolyticus*, pelo fato de algumas espécies de vibrio induzirem hemólise em Ágar Wagatsuma, como é o caso do *V. vulnificus*, *V. cholerae* não-O1 e *V. mimicus*, que segundo estudos, são portadores de hemolisina semelhante a TDH (Honda et al. 1992). Com base nessas informações, pesquisadores sugerem que o teste Kanagawa deve ser considerado somente como um indicador de patogenicidade, e não para diferenciar espécies (Pereira et al. 2004).

Segundo Bej et al. (1999), *V. parahaemolyticus* pode ser produtor ou não de urease, porém as cepas urease-positivas não produzem hemolisina, e portanto, não apresentam o fenômeno Kanagawa. Osawa et al. (1996) em suas pesquisas, isolaram amostras produtoras de urease, para as quais uma proporção inferior a 6% eram carreadoras de TDH, sugerindo

então que a hidrólise da uréia não é um marcador seguro para identificar a TDH em *V. parahaemolyticus*.

1.2.1 Fatores Relacionados à Virulência

Dentre os fatores de virulência associados à *V. parahaemolyticus*, se destacam as hemolisinas TDH e TRH. Essas hemolisinas são exotoxinas, que atacam a membrana celular dos eritrócitos, causando a ruptura das células. A lise celular causa a completa degradação da hemoglobina, o que resulta na hemólise dos eritrócitos (Zhang & Austin 2005). Pesquisadores apontam que hemolisinas expressas nos vibrios marinhos, são reguladas pelas condições limitadas em ferro, que podem ocorrer durante a infecção (Iida & Honda 1997; Shinoda 1999).

A TDH é uma proteína composta por 165 aminoácidos que manifestam severas atividades biológicas, incluindo, além de atividade hemolítica, enterotoxicidade, citotoxicidade, cardiotoxicidade. Sua atividade tóxica foi observada tanto *in vivo* como *in vitro*. Mesmo sendo considerada um dos principais fatores de virulência de *V. parahaemolyticus*, seu completo mecanismo de patogenicidade ainda não foi elucidado (Bhattacharjee et al. 2005). Outro fator importante, em cepas desse patógeno, é a presença da TRH, que codificada pelo seu respectivo gene (*trh*), também pode desencadear virulência. Contudo, essa toxina foi inicialmente determinada em cepas provenientes de casos de gastroenterite que apresentavam teste "Kanagawa-negativo" (Shirai et al. 1990).

Em pesquisas moleculares, incluindo vários isolados clínicos, foi demonstrado que na sequência de nucleotídeos do gene *trh*, encontram-se estabelecidas duas subdivisões: *trh1* e *trh2* (Kishishita et al. 1992).

Assim como na TDH, foi verificado em testes de alça ligada em coelhos, que a TRH apresenta atividade citotóxica em uma vasta gama de tecidos (Akeda et al. 2002). Estudos demonstram que além das hemolisinas, a espécie *V. parahaemolyticus* também necessita de outros fatores para causar doenças, como: variabilidade de pili, hemaglutininas, fatores de colonização e capacidade de invasão celular (Peterson & Zuppardo 2002).

A TLH presente em isolados de *V. parahaemolyticus*, vem sendo encontrada no genoma de todas as cepas estudadas, sejam de origem clínica ou ambiental (Shinoda et al. 1991; Bej et al. 1999), porém segundo estudos, não há homologia entre a sequência de nucleotídeos do gene *tl* com os genes *tdh* e *trh* da espécie (Taniguchi et al. 1996).

Yamaichi et al. (1999) construíram um mapa do DNA genômico de uma cepa de *V. parahaemolyticus*, "Kanagawa-negativa" (AQ4673), onde foram observados dois cromossomos circulares de 3.2 Mb e 1.9 Mb. Nesse mesmo estudo, foi detectada a presença do gene 16S rDNA em ambos os cromossomos, indicando que os mesmos são cromossomos, e não "megaplasmídios". De acordo com Tagomori et al. (2002), a observação de genes de resistência no cromossomo maior de uma cepa clínica, é uma

evidência adicional de que não se trata de "megaplasmídio" e sim de um cromossomo.

Makino et al. (2003) promoveram o sequenciamento de todo o genoma de uma cepa clínica de *V. parahaemolyticus* (RIMD2210633), determinando que esse microrganismo contém dois cromossomos circulares de 3.288.558 pares de base (pb) e 1.877.212 pb. Ainda no mesmo estudo, também foram constatados *TTSS* (*Type III Secretion System*), interpretados como uma Central de genes de fatores de virulência de bactérias causadoras de diarreia, como as da *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica, que causam gastroenterite por invasão ou interação com as células epiteliais do intestino. Experimentos então realizados, demonstraram que os *TTSS* de *V. parahaemolyticus* são funcionais e formam a ilha de patogenicidade da bactéria.

1.3 Importância da Aplicação de Métodos Moleculares na Pesquisa com *V. parahaemolyticus*

Os métodos convencionais de avaliação de patogenicidade de um microrganismo que utilizam animais, por exemplo, permitem que se possa determinar a toxicidade das culturas microbianas por meio de vários fatores de virulência porém, essas técnicas são de alto custo, e ainda, muitas das vezes, submetem animais de laboratório a sacrifícios desnecessários. Hoje, em muitos casos, tais metodologias são substituídas vantajosamente, pelos métodos moleculares (Singh et al. 2001).

1.3.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A PCR possibilita amplificar seqüências específicas de DNA a partir da utilização de iniciadores - *primers*. Essa técnica é empregada para detectar genes codificadores de fatores de virulência em microrganismos, como também, para observar características interespecíficas a partir de iniciadores arbitrários ou específicos, dentro da taxonomia e epidemiologia molecular (Stern et al. 1984, Versalovic et al. 1991, Fields et al. 1992, Koch et al. 1993, Rivera et al. 1995a e b, Singh et al. 2001, Ivanova et al. 2001).

A técnica da PCR permite a replicação *in vitro* de uma seqüência definida do DNA, onde segmentos genéticos podem ser amplificados até mesmo de seqüências escassas, aumentando assim a probabilidade de detecção das mesmas (por meio de sondas genéticas em misturas heterogêneas de DNA) (Atlas et al. 1992; Ludwig et al. 1994).

Há também, as chamadas adaptações da PCR, com o emprego de múltiplos iniciadores, como a PCR Multiplex (Newton & Graham 1997).

Os métodos utilizados para detecção de espécies de *Vibrio*, utilizando a PCR, têm demonstrado sensibilidade e eficiência (Kapley & Puhorit 2001). No entanto, mesmo sendo uma técnica eficiente, surgem adaptações de protocolos, para que haja maior eficácia do teste (Ferreira & Grattapaglia 1996). Geralmente, duas classes de protocolos para esses estudos são empregadas: a primeira amplifica um ou alguns fragmentos de

DNA que podem ser seqüenciados ou analisados por métodos com a utilização de enzimas de restrição. A análise das regiões entre os segmentos 16S e 23S do rDNA ou regiões variáveis do RNA transportador (RNAt), podem ser amplificadas e analisadas em eletroforese em gel e, assim, se estabelecer a relação entre seqüências de DNA conhecidas que permitirão a caracterização de gêneros e espécies (Matté 1995).

A segunda classe de protocolos utiliza seqüências curtas de DNA, as quais são utilizadas como iniciadores para amplificar numerosos fragmentos distintos do DNA genômico pertencente ao organismo pesquisado. Quando esses fragmentos são submetidos a um sistema eletroforético, o mesmo resulta num padrão de bandas, gerando um perfil chamado de *fingerprinting*, semelhante a impressões digitais, que podem demonstrar variações intraespecíficas de uma determinada espécie (Matté 2003).

Segundo Versalovic et al. (1991) e Louws et al. (1994), na grande maioria das bactérias, existem elementos do DNA que são repetitivos, os quais podem ser utilizados no delineamento de iniciadores para a amplificação do DNA genômico das cepas pesquisadas. Ainda de acordo com os autores, foram desenvolvidos iniciadores de seqüências de DNA, conhecidos como:

- Sequências intergênicas repetitivas unânimes em enterobactérias específicas (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*), que recebe o nome de ERIC, composta de 124 e 127 pares de base (pb), e que podem ser utilizados como iniciadores na PCR, para obter uma diferenciação genética que evidencie polimorfismo específico para diversos gêneros e espécies de microrganismos.

Essas seqüências são altamente conservadas e já foram identificadas em *Escherichia coli* e em outras espécies como: *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Vibrio cholerae* (Hulton et al. 1991; Singh et al. 2001).

- Sequências palindrômicas repetitivas extragênicas, denominadas REP (*Repetitive intragenic palindromic sequence*) compostas por 35 a 40 pb, e ainda seqüências chamadas BOX, com 145 pb, apresentando três subunidades (box A, box B e box C), parecendo estar localizadas em regiões intergênicas distintas ao redor do genoma (Louws et al. 1994).

Rivera et al. (1995b), empregaram a ERIC-PCR, para caracterizar genotipicamente, culturas de *V. cholerae* O1, não-O1 e O139, isoladas no Brasil, Peru e Índia, de amostras clínicas e ambientais. conseguiram a partir daí, diferenciar as culturas patogênicas (CT+/ZOT+) das não-patogênicas.

Makino et al. (2003) realizaram o sequenciamento de todo o genoma de uma cepa clínica de *V. parahaemolyticus*, o qual foi comparado ao genoma de *V. cholerae*, que havia sido previamente seqüenciado por Heidelberg et al. (2000), tendo sido detectadas várias diferenças na organização do genoma desses dois importantes patógenos.

1.3.2 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Um dos métodos moleculares bastante utilizados na investigação epidemiológica de doenças é o da Eletroforese em Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE).

Nessa técnica são utilizadas enzimas de restrição, de corte raro, que possibilitam a clivagem do DNA gênomico, resultando em menor número de fragmentos e conseqüentemente, na melhor visualização das bandas geradas após a eletroforese (Matté 2003).

1.3.3 Perfil Plasmidial

Os plasmídios ocorrem naturalmente em bactérias, e em alguns organismos eucarióticos unicelulares, possuem a capacidade de replicação autônoma e, freqüentemente, transportam genes que conferem resistência a diferentes antibióticos (Zaha 1996). Pesquisas de plasmídios são consideradas de suma importância no estudo de cepas ambientais (Matté et al. 1997; Matte 2003).

Plasmídios no ambiente podem gerar problemas no tratamento de doenças infecciosas (Atlas et al. 1993; Brock et al. 1994). Pesquisadores que trabalharam com diferentes gêneros e espécies bacterianas patogênicas, empregando diferentes métodos de extração de DNA plasmidial, observaram a presença de vários plasmídios, além de terem verificado que o perfil plasmidial estava relacionado com a região geográfica de onde tinham sido isoladas as cepas em estudo (Toranzo et al. 1983).

2 JUSTIFICATIVA

Por estar entre os principais agentes etiológicos de doenças gastrintestinais em humanos, principalmente em países de litoral extenso, faz-se necessário um estudo mais aplicado sobre a diversidade de *V. parahaemolyticus* no Brasil em relação a seus fatores de virulência.

Com base nas pesquisas realizadas até o momento, foi reconhecida a importância de se estudar os fatores de virulência de cepas ambientais de *V. parahaemolyticus*, isoladas no Brasil. As regiões litorâneas do Brasil são consideradas grandes produtoras de alimentos de origem marinha, o que torna necessário, o conhecimento da ocorrência de organismos com potencial patogênico.

Além do monitoramento do agente em nosso meio, estudos epidemiológicos apontam para a atualização de técnicas moleculares empregadas na área de Saúde Pública, principalmente nos laboratórios de Vigilância em Saúde.

Dados microbiológicos, bem como, sobre mecanismos de patogenicidade da espécie, podem auxiliar no diagnóstico de gastroenterites causadas por *V. parahaemolyticus*, ocorrentes no Brasil.

Em nosso país, estudos moleculares envolvendo *V. parahaemolyticus* são escassos, o que atenta para a necessidade de melhor caracterização desse microrganismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Pesquisar cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental isoladas no Brasil, para confirmar sua caracterização, conhecer a ocorrência e a distribuição de genes relacionados à virulência e também a variabilidade genotípica.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Confirmar a identificação das cepas de *V. parahaemolyticus*, por meio da PCR, utilizando iniciadores específicos;
- ✓ Verificar a ocorrência dos genes relacionados à virulência em *V. parahaemolyticus* (*tdh*, *trh*), bem como, o gene *tl*, por meio da PCR Multiplex;
- ✓ Verificar a ocorrência do Fenômeno Kanagawa;
- ✓ Conhecer a diversidade genotípica das cepas, pela aplicação da técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE);
- ✓ Verificar a presença de plasmídios;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estocagem das Cepas

Foi utilizado neste estudo, um total de 52 cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental, isoladas de amostras de ostras (32 cepas) e de água (20 cepas). As mesmas são pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Saúde Pública, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP). Parte das cepas (ostras) foi isolada de amostras coletadas em regiões do Litoral Sul de São Paulo, e analisadas em estudos prévios, desenvolvidos durante trabalhos de pesquisa no próprio laboratório. Outra parte foi isolada de amostras de água, coletadas em um ponto do rio Ribeirão da Fazenda, localizado na região de São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo. Todos os isolados de amostras de ostras, foram submetidos ao reisolamento em ágar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose-DIFCO) e incubados a 35°C por 24 horas, para verificação da viabilidade dos mesmos. Em seguida foram submetidos às provas bioquímicas: Ágar Ferro de Kligler (fermentação da lactose/glicose, produção de gás); oxidase; crescimento em diferentes concentrações de NaCl (0%, 6%, 8%, 10%), produção de indol, fermentação da sacarose, maltose, manitol, salicina, arabinose; descarboxilação da lisina/ornitina, dehidrólise da arginina, hidrólise de esculina; Voges Proskauer (VP), Vermelho de Metila (VM) e redução de nitrato, segundo Matté et al. 1993.

Como controle-positivo para a identificação dos isolados pesquisados, foi utilizada uma cepa de *V. parahaemolyticus* (Nº.62), fornecida pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foi também, utilizada como controle-negativo, uma cepa de *V. harveyi*, da Coleção de Culturas do próprio Laboratório de Saúde Pública, para testar a especificidade dos iniciadores empregados. Confirmadas, como *V. parahaemolyticus*, pelas provas bioquímicas, as cepas foram cultivadas em caldo lúria contendo 3% de NaCl e, incubadas a 35°C por 24 horas. Posteriormente, 0,5 mL de cultura de cada cepa foi adicionado a um micro-tubo tipo Eppendorf®, com solução de 60% de glicerina estéril, para conservação a -70°C, até a realização dos estudos moleculares. As amostras de água, utilizadas no estudo foram coletadas em um ponto do rio Ribeirão da Fazenda, localizado em São Sebastião, São Paulo. Esse ponto fica localizado sob a Ponte do Pontal da Cruz, onde as águas são consideradas, de acordo com o CONAMA 357/2005, como águas salobras Classe 1 (destinadas à recreação de contato primário). Esse local é próximo a um emissário de efluentes domésticos, e sofre influência de águas salinas (Figuras 1 e 2).

As coletas foram realizadas manualmente, com o auxílio de frascos de polietileno, previamente esterilizados. Em seguida as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas para o laboratório, onde foram efetuados os procedimentos microbiológicos.

A metodologia adotada para isolamento da bactéria nas amostras de água foi iniciada pela técnica de Membrana Filtrante, em 1L de amostra. Para a filtragem foi utilizada membrana em éster de celulose, com 47mm de diâmetro e 0,45µm de poro (*Millipore*). Logo após, as amostras foram enriquecidas em água peptonada alcalina (APA), contendo 1% de NaCl, e incubadas à 35°C por 24 horas, como descrito por Matté et al. 1993. Após o período de incubação, as amostras foram semeadas em ágar TCBS (DIFCO). Colônias presuntivas de *V. parahaemolyticus* foram então submetidas a testes bioquímicos complementares.

Confirmadas como *V. parahaemolyticus* pelos testes bioquímicos, as cepas foram mantidas a -70°C, para a realização dos estudos posteriores.



Fonte: Foto feita pela autora

Figura 1. Vista parcial do ponto de coleta das amostras (próximo a um emissário de efluentes domésticos), localizado sob a Ponte do Pontal da Cruz, São Sebastião, São Paulo.



Fonte: Foto feita pela autora

Figura 2. Vista panorâmica do ponto de coleta das amostras (influência de águas salinas).

4.2 Preparação das Cepas para a Realização dos Estudos Moleculares

4.2.1 Extração do DNA Genômico

Para realizar a extração de DNA genômico das cepas de *V. parahaemolyticus*, foi realizado o método do choque térmico, descrito por Chapman et al. (2001).

As cepas foram semeadas em caldo lúria 3% (10mL) e cultivadas por 18 horas a 35°C. Em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm a 24°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 1mL de água milliQ® estéril. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e transferida para um tubo tipo Eppendorf®, novamente centrifugado a 12.000 rpm, por 3 minutos a 24°C. Foi descartado o sobrenadante e o sedimento ressuspensão em 200µL de água milliQ® estéril. Os tubos tipo Eppendorf® contendo as cepas, foram vedados e colocados em um suporte para realização da fervura a 95°C por 10 minutos. Após, o aquecimento, os tubos foram imediatamente incubados em temperatura de -20°C por 30 minutos, para o rompimento das células bacterianas. Em seguida, foram mantidos em temperatura ambiente e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 24°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo tipo Eppendorf®. Quando a PCR não era realizada em seguida a extração, os extratos eram armazenados em freezer -20°C.

4.3 Técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.3.1 Iniciadores e Condições de Ciclos de PCR para a Identificação de *V. parahaemolyticus*

Para a técnica da PCR, cada tubo de reação continha um volume total de 25 μ L, nos quais havia os seguintes reagentes: 5 μ L de DNA genômico de *V. parahaemolyticus*, 5 μ L de tampão de reação, 1,5mM de MgCl₂ (Anresco), 200 μ M de dNTP (Invitrogen), 0,3 μ M de cada um dos iniciadores e 1,25U de Taq-DNA-polimerase (Invitrogen). Foi adicionada quantidade suficiente de água MilliQ[®] estéril para completar o volume final, requerido para a reação.

Para a confirmação de cepas de *V. parahaemolyticus*, previamente identificadas por provas fenotípicas, foram empregados os seguintes iniciadores: V para-F (5' GCT GAC AAA ACA ACA ATT TAT TGT T 3') e V para-R (5' GGA GTT TCG AGT TGA TGA AC 3'), descritos por Kong et al. (2002). Em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf), a reação se deu com uma desnaturação inicial a 94°C por 2 min., seguida de 35 ciclos consistindo de: desnaturação a 94°C por 1 min., anelamento a 55°C por 1 min., e extensão a 72°C por 1 min. Após a finalização dos ciclos houve uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

✓ Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da reação de PCR foram separados em géis de agarose (2%), corados com brometo de etídio (1µg/mL). A eletroforese foi realizada com a intensidade de corrente elétrica de 6V/cm, por 1 hora. As imagens foram capturadas pelo sistema Epi Chemi II e o programa Lab Works (Bioimaging Systems, Upland, CA - UVP).

4.3.2 Pesquisa de Genes Relacionados à Virulência da Espécie

Para a detecção dos genes relacionados à virulência (*tdh*, *trh*), bem como do gene *tl*, na reação da PCR Multiplex, foram utilizados os iniciadores propostos por Bej et al. (1999): L-*tdh* (5' GTA AAG GTCTCT GAC TTT TGG AC 3') e R-*tdh* (5' TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC3'); L-*trh* (5' TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT 3') e R-*trh* (5' CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC 3'); L-*tl* (5' AAA CGC GAT TAT GCA GAA GCA CTG 3'), R-*tl* (5' GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC 3').

4.3.3 Iniciadores e Condições de Ciclos de PCR, utilizando a PCR Multiplex, para Identificação de Genes Relacionados à Virulência de *V. parahaemolyticus* e do Gene *tl*

Para a realização da PCR Multiplex, foram preparados: 5µL do DNA genômico de *V. parahaemolyticus*, 0,2µM de cada iniciador, para *tl*, *tdh*, *trh*, 5µL de tampão de reação (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200µM de dNTP (Invitrogen), 1,5U de Taq-polimerase (Invitrogen). Foi adicionada quantidade suficiente de água milliQ® estéril para completar o volume final requerido para a reação. Em um termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf), a reação se deu com uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min., seguida de 30 ciclos de amplificação, consistindo cada ciclo de desnaturação a 94°C, 1 min., anelamento a 58°C, 1 min., e extensão a 72°C, 1 minuto. Após a finalização dos ciclos, houve uma extensão final a 72°C de 5 min., sendo a seguir resfriado a 4°C e mantido nesta temperatura até o momento de sua retirada.

✓ Eletroforese em Gel de Agarose

Foram preparados géis de agarose (3%), corados com brometo de etídio (1µg/mL). A eletroforese foi realizada com a intensidade de corrente elétrica de 6V/cm por 1h.

As imagens foram capturadas pelo sistema Epi Chemi II Darkroom e o programa Lab Works (Bioimaging Systems, Upland, CA – UVP) e analisadas visualmente.

A identificação da espécie se deu pelo peso molecular dos produtos da reação de PCR, comparados com o marcador de peso molecular de 150 Kb, utilizado em cada gel.

4.4 Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada para as 53 cepas identificadas como *V. parahaemolyticus*, incluindo o controle-positivo (Nº.62).

O procedimento foi baseado na metodologia descrita pelo Center for Diseases Control – CDC (2006), para cepas de *V. cholerae*, com algumas modificações para as cepas de *V. parahaemolyticus*, conforme serão descritas.

4.4.1 Preparação do *plug*

Para a preparação dos *plugs* de *V. parahaemolyticus*, cada cepa foi ativada em 50mL de caldo lúria (3%), e incubadas a 35°C por 18-24h. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos a 24°C. Foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 1mL de solução tampão TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0) e transferido para microtubos tipo Eppendorf®, que foram centrifugados a 12000rpm por 3 minutos a 24°C.

Em seguida, foram adicionados às células 400 μ L de TE I, e desta suspensão, 80 μ L foram adicionados a 320 μ L de agarose para *Pulsed Field* a 1,1%, previamente aquecido a 55-60°C. Em seguida, os moldes (3 por amostra) para confecção dos *plugs* foram preenchidos e incubados por 15 minutos a 4°C, para solidificação. Os *plugs* foram retirados dos moldes e colocados em 5mL de uma solução de lise (EDTA 50mM, pH8,0; Tris-HCl 50mM, pH 7,5; SDS 20%, Sarkosyl 1%, proteinase K 20mg/mL), em tubos tipo Falcow[®], e incubados a 55°C por 2h. Após a incubação foram realizadas duas lavagens dos *plugs*, em 10mL de água milliQ[®] e quatro lavagens, em 10mL de TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0), com intervalos de 15min., em temperatura de 55°C. Os *plugs* foram transferidos para um microtubo tipo Eppendorf[®] e estocados em 1mL de TE I a 4°C, até o momento da digestão enzimática.

4.4.2 Digestão Enzimática

A enzima de restrição utilizada foi a *Sfi*I (Amersham Pharmacia Biotech), que fornece fragmentos de restrição com peso molecular adequado para a corrida eletroforética e para a visualização dos perfis moleculares das cepas estudadas (CDC 2006; Wong et al. 2006). Neste procedimento, foi utilizado apenas um *plug* por amostra. Cada *plug* foi transferido para um novo microtubo tipo Eppendorf[®], e neste, foram adicionados 300 μ L do tampão específico da enzima *Sfi*I, diluído de 10X para 1X (Amersham Pharmacia Biotech).

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria (50°C) por 30 min. Foi retirado o tampão da enzima e adicionados 300µL de uma solução contendo novamente o tampão, e as amostras foram incubadas a 50°C por 18h.

4.4.3 Condições para a Realização da Técnica de PFGE

Após a digestão pela enzima *Sfi*I, os fragmentos de restrição foram submetidos à eletroforese em campo pulsado (Chef Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)).

Em um gel de agarose para *Pulsed Field* foram montados os *plugs* das amostras, e de 1 marcador de peso molecular (Multimeric Phase Lambda DNA Ladder 48, 5Kb, Bio-Rad) a 1,1% em solução tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45mM, EDTA dissódico 1mM, pH 8,0).

As condições da eletroforese seguiram em dois blocos:

Bloco 1: voltagem de 6V/cm, a 14°C, por 13h, com intervalo de pulsos de 2,00s a 10,00s, em ângulo de 120°C.

Bloco 2: voltagem de 6V/cm, a 14°C, por 6h, com intervalo de pulsos de 20,00s a 25,00s, em ângulo de 120°C.

O gel de PFGE foi corado em brometo de etídio 1µg/mL, durante 20-30min e descorado com água MilliQ® por 1h, sendo em seguida visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

A avaliação do perfil de bandas foi realizada pela comparação com o perfil obtido pelo marcador de peso molecular presente em cada gel. A análise do perfil de bandas foi realizada com a utilização do programa Gel Works 1D Advanced, versão 4.01 e Gel Works 1D Database versão 1.12 (UVP Bioimaging Systems, Upland, CA).

Os perfis foram agrupados pelo Coeficiente de Dice (CD) e demonstrados graficamente em dendrogramas.

O valor encontrado do CD pode definir a similaridade entre as amostras, baseado nos critérios estabelecidos pelo laboratório de referência para tipagem de linhagens, da Universidade de Iowa, EUA (Bingen 1994), apud Darini et al. (1998).

4.5 Pesquisa de Plasmídios

4.5.1 Extração do DNA Plasmidial

As cepas de *V. parahaemolyticus* tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos com a utilização de um kit comercial (Fast Plasmid Mini - Eppendorf). As cepas foram semeadas em 3 mL de caldo luria, contendo 3% de NaCl e cultivadas por 18 horas a 35°C. Em seguida, 1,5mL de cada amostra foram transferidos para o tubo de extração do kit e, centrifugados por 1 min. a 12.000 rpm, 24°C. O sobrenadante foi descartado e em seguida o sedimento foi ressuspensão em 400µL de solução de lise e incubado em temperatura ambiente por 3 min.

Em seguida, centrifugada por 1 min. a 12.000 rpm, 24°C. A seguir, foram adicionados 400µL do tampão de lavagem, e a amostra foi centrifugada por 1 min. a 12.000 rpm. Após, foi retirada uma coluna central do conteúdo de cada tubo e o filtrado foi desprezado. Cada coluna foi recolocada no mesmo tubo e a seguir a amostra foi centrifugada por 1 min. a 12.000 rpm. Em seguida, cada coluna foi transferida para outro tubo (1,5mL) onde foram adicionados 50µL de solução tampão de eluição, que foi centrifugado por 1 min. a 12.000 rpm. Por fim, as colunas foram descartadas e o extrato de cada amostra foi armazenado a -20 °C até a realização da eletroforese.

Para promover a abertura dos plasmídios, foi realizado o aquecimento, em banho-maria (65 °C) por 15 min. e, posteriormente, as amostras foram mantidas em banho de gelo por 5 min.

✓ **Eletroforese em Gel de Agarose**

O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio (1µg/mL). A intensidade de corrente utilizada foi de 6V/cm por 1 hora. A captura de imagem foi realizada pelo sistema Epi Chemi II Darkroom e programa Lab Works (Bioimaging Systems, UVP). A leitura do perfil plasmidial foi realizada por comparação dos fragmentos obtidos em cada perfil. O tamanho do plasmídio foi estimado pela comparação desses fragmentos, com o marcador de peso molecular de 23Kb, em cada gel.

4.6 Preparação do Ágar Wagatsuma (AW) para detecção de beta hemólise em eritrócitos humanos (Wagatsuma 1968)

O AW foi utilizado na pesquisa, para verificar a possível ocorrência do Fenômeno Kanagawa (K+) nas cepas em estudo. Para a preparação de 100mL de base para AW, foram utilizados: 0,5g de extrato de levedura, 1,0g de peptona, 1,0g de manitol, 0,5g de cloreto de potássio monobásico (K₂HPO₄), 7,0g de cloreto de sódio (NaCl), 1,5g de ágar-ágar e 100µL de uma solução (0,1%), de cristal violeta. Em seguida, o meio de cultura foi levado ao banho-maria (60°C), para a dissolução, e esterilizado em autoclave (121°C/15 min).

Em fluxo laminar foram adicionados 5% de ¹eritrócitos humanos, obtidos assepticamente, lavados em solução salina (1%). O meio foi homogeneizado e distribuído (25mL) em placas de Petri, estéreis. Todas as culturas de *V. parahaemolyticus* do estudo, previamente cultivadas em caldo lúria (3%) por 24h foram semeadas em forma de *spot*, nas placas de AW e incubadas a 35°C por 24h. O resultado era considerado positivo, quando havia crescimento do microrganismo e, concomitantemente, produção de beta-hemólise ao redor das colônias.

¹ Os eritrócitos humanos utilizados na preparação do AW foram cedidos pelo próprio pesquisador.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação das Cepas de *V. parahaemolyticus*

Foram identificadas como sendo *V. parahaemolyticus*, as 52 cepas isoladas de amostras ambientais (água e ostras), provenientes de diferentes fontes.

As reações bioquímicas esperadas pela espécie foram confirmadas para todos os isolados provenientes de amostras de água (Quadro 1), conforme descritas na literatura (Joseph et al. 1982; Farmer JJ et al. 2005). Contudo, 3 cepas, isoladas de amostras de ostras, revelaram características atípicas (Quadro 2), bem como, quando submetidas às provas bioquímicas realizadas na época do isolamento.

As cepas consideradas atípicas (54, 179, 295), apresentaram colônias de coloração amarelo-esverdeadas em ágar TCBS, sendo que *V. parahaemolyticus* é caracterizado por apresentar colônias verdes nesse meio de cultura, o que configura como negativa a prova de sacarose.

Quadro 1. Testes bioquímicos utilizados na caracterização de *V. parahaemolyticus*, isolados de amostras de água, coletadas em um ponto do rio Ribeirão da Fazenda, localizado em São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo, Brasil.

Teste	% Positiva <i>V. parahaemolyticus</i> ($\Sigma = 20$)	Reações esperadas para <i>V. parahaemolyticus</i>
Sacarose (TCBS)	0	-
Indol	100	+
Gás	0	-
Lactose	0	-
Glicose	100	+
Lisina	100	+
Ornitina	100	+
Arginina	0	-
Esculina	0	-
Sacarose (tubo)	0	-
Oxidase	100	+
Salicina	0	-
Manose	100	+
Manitol	100	+
Nitrato	100	+
Vermelho de Metila (VM)	100	+
Voges Proskauer (VP)	0	-
Crescimento em % de NaCl		
0	0	-
6	100	+
8	100	+
10	0	-

Fonte: Farmer JJ III, Janda MJ, Brenner WF, Cameron DN, Birkhead KM. *Genus I. Vibrio*: In: Pacini 1854, 411^{AL}, Tabela BXII.y.164, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, 2005.

Quadro 2. Testes bioquímicos utilizados na caracterização de *V. parahaemolyticus* isolados de amostras de ostras, coletadas em pontos distintos, localizados no Litoral Sul de São Paulo, Brasil.

Teste	% Positiva <i>V. parahaemolyticus</i> ($\Sigma = 32$ cepas)	Reações esperadas para <i>V. parahaemolyticus</i>
Sacarose (TCBS)	9,37	-
Indol	100	+
Gás	0	-
Lactose	0	-
Glicose	100	+
Lisina	100	+
Ornitina	100	+
Arginina	0	-
Esculina	9,37	-
Sacarose (tubo)	6,25	-
Oxidase	100	+
Salicina	0	-
Manose	100	+
Manitol	100	+
Nitrato	100	+
Vermelho de Metila (VM)	100	+
Voges Proskauer (VP)	0	-
Crescimento em % de NaCl		
0	0	-
6	100	+
8	93,75	+
10	0	-
*Etanol	100	+
*Putrescina	100	+

Fonte: Farmer JJ III, Janda MJ, Brenner WF, Cameron DN, Birkhead KM. *Genus I. Vibrio*: In: Pacini 1854, 411^{AL}. Tabela BXII.y.164, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, 2005;

*Teste realizado somente nos isolados de ostras.

5.2 Identificação da espécie pela PCR

Para a confirmação do posicionamento taxonômico dos isolados (52 cepas), foi utilizada a amplificação de um fragmento de 170 pb, da região do 16S rDNA de *V. parahaemolyticus*, realizada pela técnica da PCR. As 52 (100%) cepas submetidas à PCR foram identificadas, e, confirmadas, como *V. parahaemolyticus*. A cepa utilizada como controle-negativo (*V. harveyi*) não produziu o fragmento de 170pb, demonstrando também, a especificidade dos iniciadores utilizados no presente estudo.

A Figura 3 apresenta o fragmento de 170pb, resultado da amplificação da região 16S do rDNA genômico de *V. parahaemolyticus*, pela PCR.

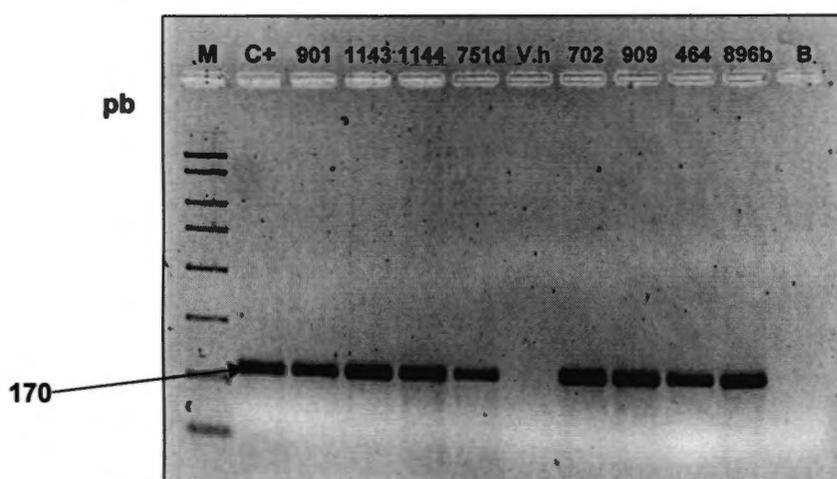


Figura 3. Gel de agarose (3%), corado com brometo de etídeo (1µg/mL), resultante da PCR de cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental. M = 150kb; C+ = Controle-positivo; 901b-751d = cepas de *V. parahaemolyticus*; V.h = *V. harveyi* (controle-negativo); 702-896b = cepas de *V. parahaemolyticus*; B = Branco.

5.3 Pesquisa de genes relacionados à virulência (*tdh*, *trh*) e gene *tl*, pela PCR Multiplex

A partir da aplicação da técnica de PCR Multiplex, o gene *tl* foi detectado em 52 (100%) cepas. O gene *tdh*, em 2 (3,8%) cepas isoladas de amostras de ostras e, em nenhum dos isolados foi observada a presença do gene *trh*. A detecção dos genes pesquisados, para algumas das amostras, pode ser observada na Figura 4.

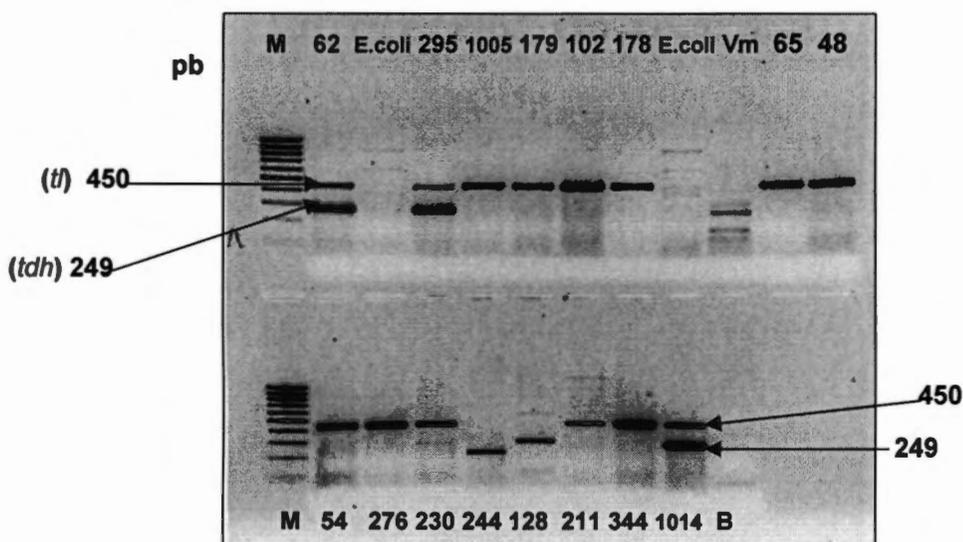


Figura 4. Gel de agarose (3%), corado com brometo de etídio (1µg/mL), resultante da detecção dos genes *tdh*, *tl*, *trh*, em cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental, pela PCR-Multiplex. 1ª. Linha: M = 100kb DNA Ladder, 62 = *V. parahaemolyticus* (controle-positivo); *E.coli* = controle-negativo; 295-178 = *V. parahaemolyticus*; *E. coli*; Vm = controles negativos; 65-48 = *V. parahaemolyticus*. 2ª. Linha: M = 100kb DNA Ladder, 54-230 = *V. parahaemolyticus*; 244-128 = *Vibrio* spp - controle-negativo; 211-1014 = *V. parahaemolyticus*; B = Branco.

Os Quadros 3 e 4 apresentam um resumo dos resultados obtidos para a detecção de genes de virulência, pela técnica da PCR Multiplex, bem como, os resultados do teste de Kanagawa, para as cepas de *V. parahaemolyticus* utilizadas no estudo.

Quadro 3. Resultados dos testes de identificação dos genes de virulência (*tdh*, *trh*) e gene *tl*, e presença de beta-hemólise para cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de água, coletadas de um ponto do rio Ribeirão da Fazenda, São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo, Brasil

Identificação	β hemólise (K+)	Genes alvo		
		<i>tdh</i>	<i>tl</i>	<i>Trh</i>
Controle-positivo (62)	+	+	+	-
454	-	-	+	-
464	-	-	+	-
702	-	-	+	-
751d	-	-	+	-
896b	-	-	+	-
898a	-	-	+	-
900	-	-	+	-
901a	-	-	+	-
901b	-	-	+	-
906	-	-	+	-
907	-	-	+	-
908	-	-	+	-
909	-	-	+	-
1122a	-	-	+	-
1123	-	-	+	-
1129	-	-	+	-
1141	-	-	+	-
1143a	-	-	+	-
1143b	-	-	+	-
1144	-	-	+	-

+= positivo; -= negativo

Quadro 4. Resultados dos testes de identificação dos genes de virulência (*tdh*, *trh*) e gene *tl*, e Kanagawa, para cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras de ostras, provenientes do Litoral Sul de São Paulo, Brasil

Identificação	β hemólise (K+)	Genes alvo		
		<i>tdh</i>	<i>tl</i>	<i>Trh</i>
Controle-positivo (62)	+	+	+	-
1005/03	-	-	+	-
1006/03	-	-	+	-
1007/03	-	-	+	-
1008/03	-	-	+	-
1010/03	-	-	+	-
1011/03	-	-	+	-
1012/03	-	-	+	-
1013/03	-	-	+	-
1014/03	+	+	+	-
1015/03	-	-	+	-
1016/03	-	-	+	-
1017/03	-	-	+	-
1018/03	-	-	+	-
1019/03	-	-	+	-
1020/03	-	-	+	-
1021/03	-	-	+	-
1022/03	-	-	+	-
1023/03	-	-	+	-
1024/03	-	-	+	-
1025/03	-	-	+	-
1026/03	-	-	+	-
1027/03	-	-	+	-
1028/03	-	-	+	-
48	-	-	+	-
54	-	-	+	-
65	-	-	+	-
102	-	-	+	-
178	+	-	+	-
179	-	-	+	-
211	-	-	+	-
276	-	-	+	-
295	+	+	+	-
344	-	-	+	-

† = positivo; - = negativo

5.4 Detecção do Fenômeno Kanagawa em Ágar Wagatsuma

Foi observada a presença de beta hemólise em AW em 3 (5,7%) cepas pesquisadas neste estudo. Porém, em uma delas (178), não foi detectada a presença do gene *tdh*, pela PCR Multiplex. A Figura 5 apresenta beta-hemólise ao redor das colônias de *V. parahaemolyticus* de origem ambiental.

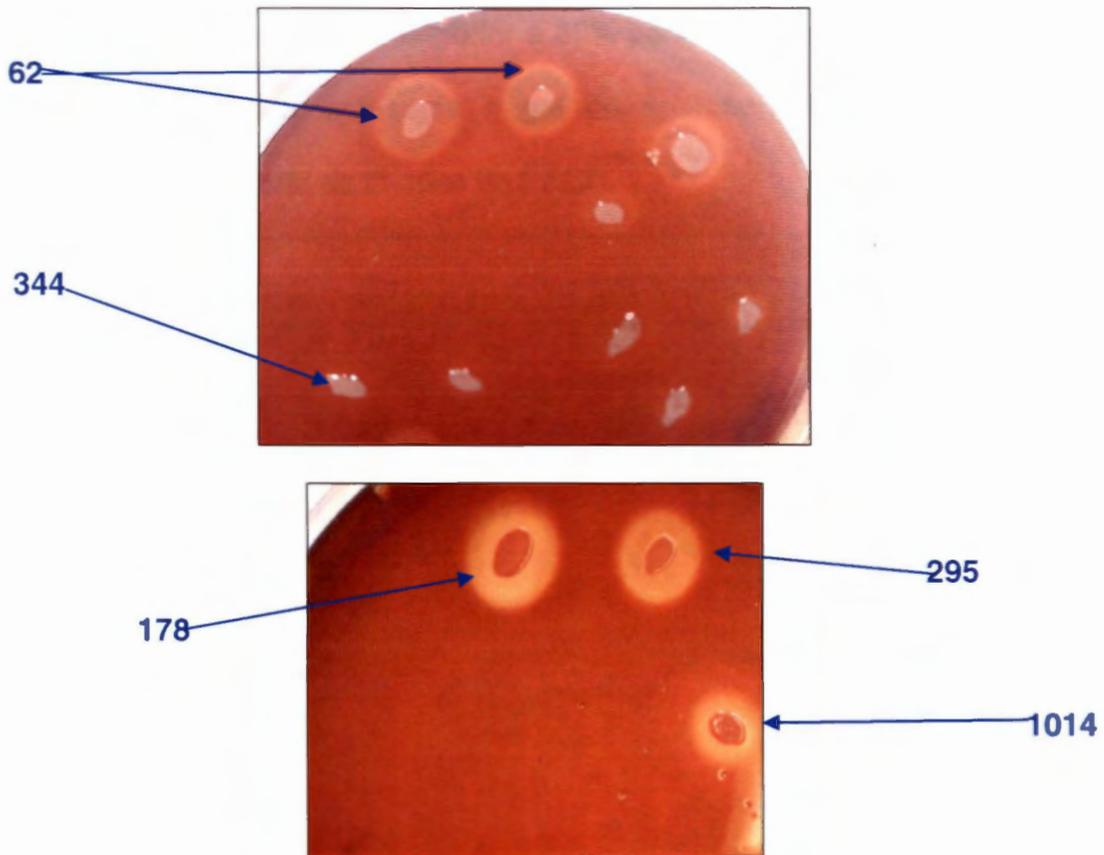


Figura 5. Fotografias das placas de AW, resultado da beta hemólise/ Fenômeno Kanagawa (K+) produzido por cepas de *V. parahaemolyticus* de origem ambiental; 62 = Controle-positivo; 178, 295, 1014 = cepas de *V. parahaemolyticus* (K+); 344 = cepa de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental, Kanagawa-negativa (K-).

5.5 Comparação do perfil genético, por meio da PFGE, entre as cepas de *V. parahaemolyticus*

Os resultados obtidos a partir da PFGE, foram analisados em função da similaridade dos perfis de bandas gerados. Com base na distribuição no gel de agarose, foi observada uma diversidade de perfis, porém, ficando evidente a presença de clones microbiológicos entre os isolados, com similaridade superior a 80% para os dois diferentes grupos de cepas. A Figura 6 apresenta o gel de agarose com parte das cepas pesquisadas, a partir da técnica de PFGE.

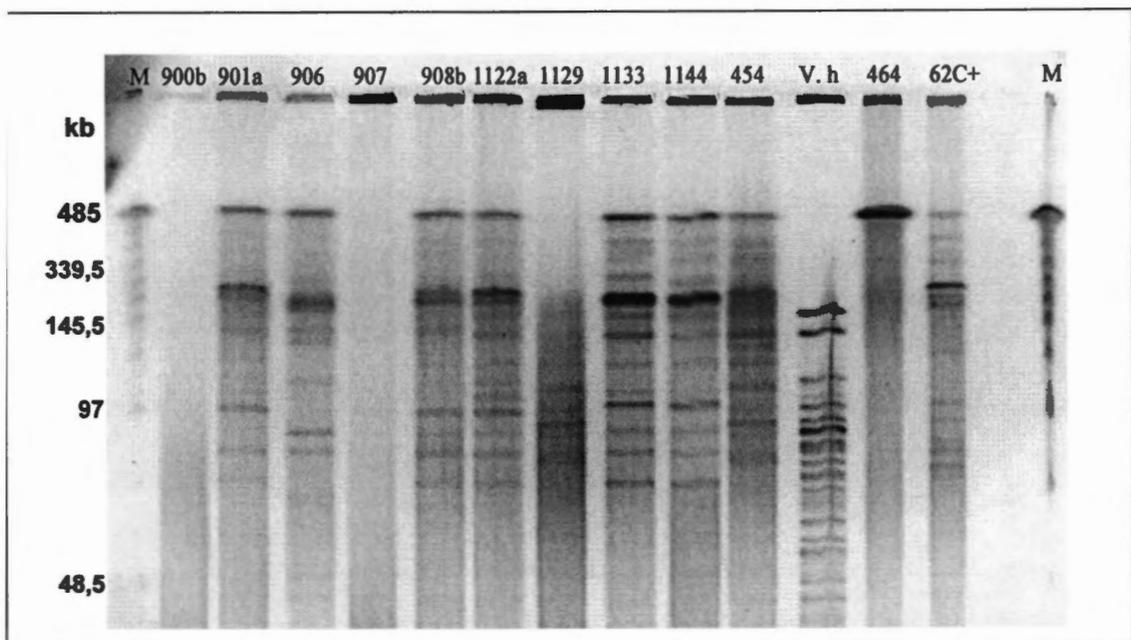


Figura 6. Gel de agarose (1,1%), corado com brometo de etídio (1µg/mL), representando os perfis de bandas, gerados a partir da enzima *SfiI*, obtidos pela PFGE, em cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental. M = 485kb; 900b-464 = cepas de *V. parahaemolyticus*; V.h = cepa de *V.harveyi*; 62 = cepa controle-positivo de *V. parahaemolyticus*.

As análises dos perfis de bandas, para todos os isolados (água e ostras), foram realizadas a partir do coeficiente de similaridade de Dice (CD).

Com o resultado obtido a partir dos dendrogramas, foram observados para as cepas isoladas de amostras de água, perfis iguais ou muito próximos entre si, como representa a Figura 7.

Os perfis das cepas isoladas de amostras de ostras, também se revelaram iguais ou muito próximos entre si, porém algumas cepas apresentaram perfis diversificados. O dendrograma representado na Figura 8 demonstra a relação entre estes perfis.

De forma geral, os perfis apresentaram fragmentos com bandas que variam entre 485Kb e 48,5Kb.

Entre as cepas isoladas de amostras de água, o coeficiente de similaridade foi igual ou maior que 81% (Fig. 7). De forma semelhante, o dendrograma originado entre as cepas isoladas de amostras de ostras, apresentou o CD igual ou maior que 81% (Fig. 8).

A cepa utilizada como controle-negativo (*V. harveyi*), apresentou similaridade de 57% em relação às cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de água e 58% em relação aos isolados de ostras.

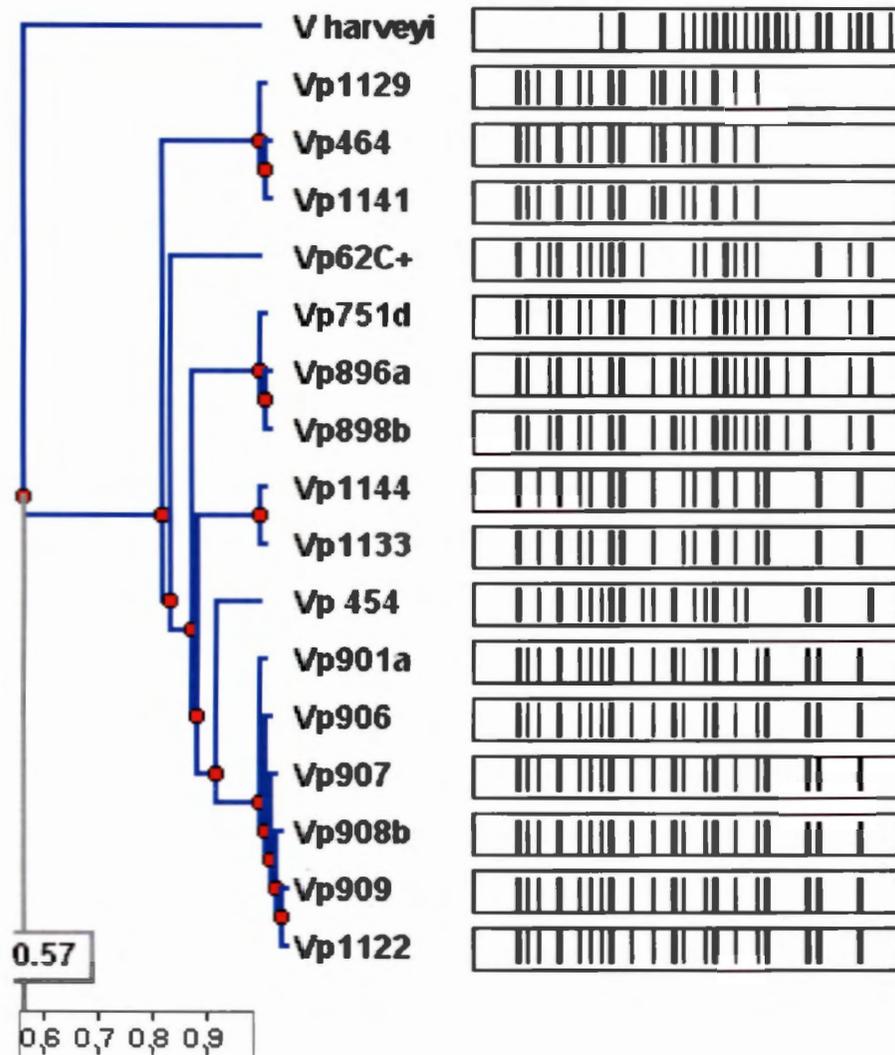


Figura 7. Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE, de 15 das 20 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de amostras de água. Incluindo-se, uma cepa controle-positivo (62 C) e outra, controle-negativo (*V. harveyi*).

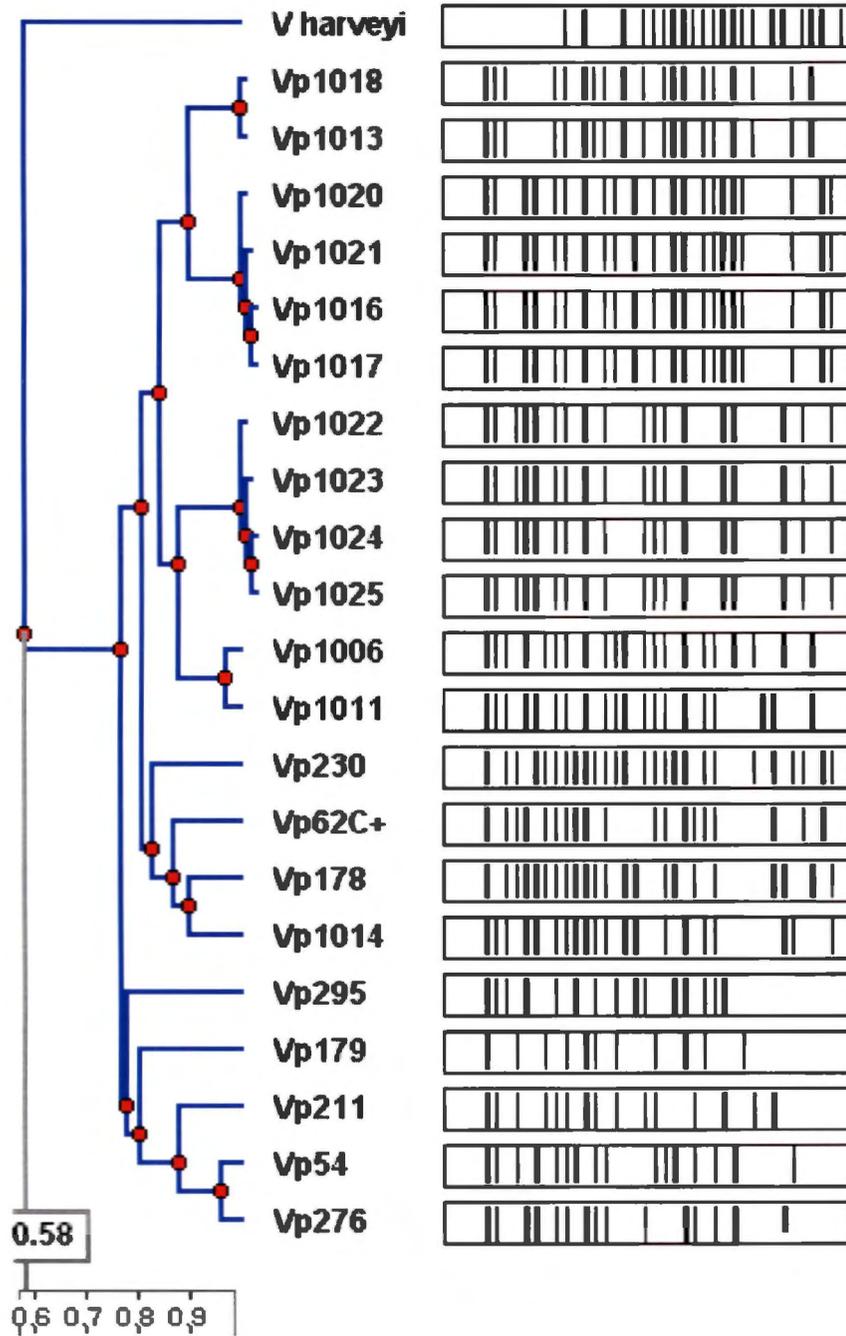


Figura 8. Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE, de 20 das 32 cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de ostras. Incluindo-se, uma cepa controle-positivo (62C) e outra, controle-negativo (*V. harveyi*).

5.6 Perfil Plasmidial das Cepas de *V. parahaemolyticus*

O perfil plasmidial obtido das cepas de *V. parahaemolyticus* estudadas possibilitou a verificação da presença de plasmídios em 48% delas. A Figura 9 apresenta a imagem de detecção dos plasmídios, nas cepas de *V. parahaemolyticus*, de origem ambiental pesquisadas. Os Quadros 5 e 6 apresentam o número de plasmídios detectados nos isolados provenientes das amostras de ostras e água, respectivamente, bem como, na cepa (Nº.62) utilizada como controle-positivo.

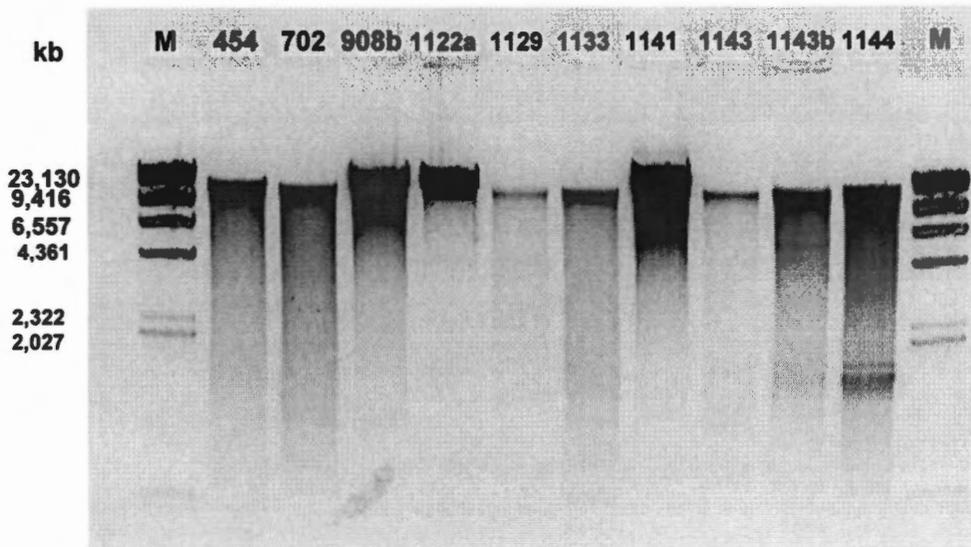


Figura 9. Gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio (1µg/mL), resultante da eletroforese (6V/cm/1h), realizada a partir da extração plasmidial de cepas de *V. parahaemolyticus* de origem ambiental. M = *Hind* III; 454-1144= cepas de *V. parahaemolyticus*; M = *Hind* III.

Quadro 5. Distribuição das cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de ostras, segundo o número de plasmídios observados.

Identificação	Nº. de Plasmídios
Controle-positivo (62)	0
1005/03	0
1006/03	1
1007/03	1
1008/03	0
1010/03	1
1011/03	1
1012/03	1
1013/03	1
1014/03	1
1015/03	1
1016/03	1
1017/03	1
1018/03	1
1019/03	1
1020/03	2
1021/03	1
1022/03	0
1023/03	1
1024/03	1
1025/03	0
1026/03	1
1028/03	2
48	1
54	1
65	1
102	1
178	2
179	1
211	1
276	1
295	1
344	0

Quadro 6. Distribuição das cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de amostras de água, segundo o número de plasmídios observados.

Identificação	Nº. de Plasmídios
Controle-positivo (62)	0
454	1
464	1
702	1
751d	2
896b	1
898a	1
900	0
901a	1
901b	1
906	0
907	1
908	0
909	0
1122a	1
1129	1
1123	2
1141	1
1143a	2
1143b	4
1144	4

6 DISCUSSÃO

V. parahaemolyticus é conhecido como um dos principais agentes causadores de doenças de origem alimentar, principalmente em países asiáticos, onde o hábito de consumir produtos de origem marinha é bem maior do que em outras regiões. Porém, o organismo também vem sendo reconhecido por causar surtos de grande extensão em outros países, como EUA, França, Itália e Chile e Peru (Bag et al. 1999; DePaola et al 2000; Lemoine et al. 1999; Croci et al 2001; Robert Pillot et al. 2004; Heitmann 2005; Nair & Opazo 2005; CDC 2006; Gil AI et al. 2007). Assim, tendo em vista a ocorrência de surtos e epidemias em países vizinhos ao Brasil, os estudos sobre a espécie tornam-se essencialmente importantes no que se refere à Vigilância em Saúde.

De acordo com o CDC (2006), os casos reportados de infecção por *V. parahaemolyticus* são mais comuns durante os meses de verão e estão diretamente associados ao consumo de mariscos ingeridos crus ou mal cozidos, especialmente, moluscos bivalves. Causador de infecções gastrintestinais severas, a espécie pode causar septicemia e, em alguns casos, levar o indivíduo à morte (Daniels et al. 2000; Yeung et al. 2002).

No Brasil, embora a legislação sanitária de alimentos - Resolução RDC N°. 12, de janeiro de 2001 (Brasil 2001), determine que seja realizada a contagem de *V. parahaemolyticus* em amostras de peixes e

moluscos, os órgãos de saúde pública não preconizam a pesquisa desse microrganismo no ambiente, exceto em áreas de aquicultura (Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 357/2005). No entanto, diversas pesquisas foram realizadas no país, onde o patógeno foi isolado de amostras de peixes e moluscos (Sousa 1989; Matté et al. 1994a; Archer & Moretto 1994; Barboni 2002; Sousa et al. 2004; Pereira et al. 2004; Pereira et al. 2007; Matté et al. 2007), de água de estuário (Lira et al. 2001; Serra et al. 2003) e clínicas (Magalhães et al. 1991; Oliveira et al. 2002).

A carência de informações a respeito de gastroenterites causadas por espécies de *Vibrio* no Brasil, incluindo *V. parahaemolyticus*, levou pesquisadores da cidade de Recife (Pernambuco) à realização de estudos com espécimes fecais diarréicos isolados em um laboratório local. Nessa pesquisa, de 1.100 amostras submetidas à coprocultura, 198 eram de indivíduos adultos, e do total das fezes examinadas, 14 (1,3%) foram positivas para *V. parahaemolyticus*. Todos os pacientes inqueridos a respeito da fonte de infecção informaram ter consumido peixes e mariscos entre 6 e 36 horas antes do início dos sintomas gastrintestinais. De fato, os pesquisadores consideraram que 1,3 % de isolados foi uma porcentagem baixa, entretanto, foi levado em consideração que a grande maioria dos espécimes fecais foram provenientes de crianças, e a minoria (198), de

pacientes adultos, o que elevaria os casos positivos para 7,1% (Magalhães et al. 1991). Com base nessas informações, é de extrema importância que sejam realizadas investigações epidemiológicas adequadas quanto à doenças diarreicas, especialmente em regiões endêmicas, o que implica, no treinamento de equipes médicas e de outros profissionais da área da saúde frente ao diagnóstico diferencial de doenças diarreicas.

Em 2002, na cidade de Fortaleza (Ceará) ocorreu um surto de gastroenterite por *V. parahaemolyticus*, entre participantes de um evento científico, onde foram identificadas cepas Kanagawa-positivas, O3:K6. Contudo, segundo a FUNASA (2002) houveram algumas limitações durante a investigação dos casos, devido ao retorno da maioria dos participantes do evento para seus respectivos estados, dificultando assim, a coleta de dados e limitando o número de caso-controles. Também foi destacada a ausência de procedimentos técnicos, para apoiar a investigação de surtos de DTA em meios de comunicação eletrônica oficial em nível estadual e nacional http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico04_ano02.pdf

Como *V. parahaemolyticus* continua sendo uma importante causa de gastroenterite, com distribuição mundial, inclusive com um surto recentemente (2002) ocorrido no Brasil, e por estar associada ao grande aumento do consumo de pescado cru, decorrente da crescente incorporação de hábitos da cultura nipônica no país (Silva 2007), torna-se evidente a

necessidade de um contínuo monitoramento desse agente em nosso meio. No Estado de São Paulo, segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE (2003), não constam ocorrências de surtos por *V. parahaemolyticus* [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/Vibrio parah.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/Vibrio_parah.htm).

Mesmo sendo um organismo natural de ambiente marinho, o aumento do número de *V. parahaemolyticus* no ambiente pode estar relacionado à presença de matéria orgânica, como foi observado no decorrer das coletas de água provenientes da região de São Sebastião, realizadas no presente estudo. A grande influência de ação antrópica no local foi verificada pela presença de efluentes domésticos com contagens de coliformes fecais entre a faixa de 10^4 - 10^5 NMP/100mL (CETESB 2005/2006), ou seja, acima dos limites estabelecidos pelo CONAMA 357/2005 para águas salobras, classe 1 (destinadas à áreas de recreação de contato primário).

Em estudos realizados por Watkins & Cabelli (1985) com amostras de água, coletadas próximo à Baía de Narragansett (EUA), foi possível identificar a distribuição de *V. parahaemolyticus* e verificar uma maior incidência do patógeno em ambientes impactados pela presença de esgotos domésticos. Da mesma forma como foi observado por Serra et al. (2003) em estudos realizados com amostras coletadas de um estuário, em São Luís do Maranhão, Brasil, onde o acúmulo de matéria orgânica no ambiente pode ter refletido na abundante presença de *V. parahaemolyticus* no local.

Cabrera-García et al. (2004), em estudos realizados com amostras de águas costeiras no México, atribuíram a incidência de *V. parahaemolyticus* no ambiente, à presença de matéria orgânica em suspensão, incluindo temperatura da água, salinidade e concentração de oxigênio. Portanto, as cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas no presente estudo, provenientes de água, podem também, estar relacionadas à presença de matéria orgânica no ambiente. Durante as coletas de água, foram observados períodos de seca, o que poderia contribuir para a concentração do patógeno no local, já que o mesmo sofria influência de águas salinas. Foram também realizadas algumas análises físico-químicas, como análise de OD, DBO, N-amoniaco, Fósforo-Total, Sólidos-Dissolvidos-Totais, que de acordo com os resultados obtidos, indicaram alteração significativa na qualidade dessas águas (dados não apresentados). De fato, dados obtidos na literatura científica, demonstram que algumas espécies de *Vibrio*, incluindo *V. parahaemolyticus*, podem ser encontradas em baixas quantidades em amostras de água marinha, sendo mais frequentemente isolados de moluscos filtradores, que são concentradores desses microrganismos (Matté et al. 1994a; Archer & Moretto 1994; Sousa 1989).

Segundo Watkins & Cabelli (1985) e Lira et al. (2001), diferentes métodos de isolamento utilizados na pesquisa com *V. parahaemolyticus* podem resultar em diferentes concentrações deste microrganismo, o que pode dificultar o conhecimento da real distribuição e

frequência deste patógeno no ambiente. Da mesma forma, Matté et al. em 1994a, demonstraram que embora o meio de enriquecimento Glucose Salt Teepol Broth (GSTB), fosse o mais indicado para o isolamento da espécie, as amostras enriquecidas com água peptonada alcalina (APA) 1%, resultaram na melhor recuperação do microrganismo em amostras de moluscos. A mesma observação foi também feita por Serra et al. (2003), em suas pesquisas com *V. parahaemolyticus* em amostras de águas de estuário.

É importante ressaltar que no presente estudo, todas as cepas isoladas de amostras de água apresentaram características bioquímicas compatíveis com *V. parahaemolyticus*. Porém, dos isolados de ostras, 3 cepas (54, 179, 295) apresentavam características atípicas. Essas características foram observadas quanto à utilização da sacarose, que para a espécie é considerada, segundo a literatura, como sacarose negativa (Joseph et al. 1982; Farmer et al. 2005). Frente aos resultados obtidos, as cepas necessitavam de uma confirmação mais específica. Porém, na literatura analisada, não foi observado nenhum trabalho que demonstrasse a presença de diferentes características bioquímicas em isolados de *V. parahaemolyticus*, exceto em relação ao teste de urease. Devido aos resultados obtidos, em relação ao metabolismo das cepas deste estudo, testes bioquímicos foram repetidos para os organismos considerados atípicos, que tiveram, portanto, confirmação para a espécie, resultando

assim, na manutenção das características atípicas. Da mesma forma, 4 cepas, previamente isoladas da mesma coleta, e que haviam sido posicionadas, fenotipicamente, como *V. parahaemolyticus*, não foram confirmadas pela PCR como sendo o agente (dados não apresentados). De fato, a literatura demonstra que existem ainda, espécies de *Vibrio* que apresentam características muito variáveis e próximas umas das outras, como é o caso do *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, o que comprova que métodos moleculares podem auxiliar no conhecimento taxonômico dos microrganismos, ou simplesmente podem alertar sobre a existência de um organismo com perfil atípico aos usuais (Matté 2003; Thompson et al. 2004; Farmer et al. 2005).

Organismos pertencentes a ambiente marinho podem sofrer mudanças de acordo com o ambiente pelas condições de adaptação a novas situações, o que possibilita modificações na atividade metabólica. A atividade metabólica pode ser regulada pelo controle de síntese de enzimas e outras moléculas, essa regulação é denominada de controle da expressão gênica. Em bactérias, o controle da expressão gênica serve para que haja um ajuste à nova condição ambiental imposta, o que pode aperfeiçoar seu crescimento e divisão (Matté 2003).

Em estudos realizados por Croci et al. (2007), comparando testes bioquímicos e moleculares para identificação de *V. parahaemolyticus*, foi concluído que a maioria das cepas testadas bioquimicamente, teve seus

resultados conforme o esperado, porém alguns testes apresentaram resultados falso-positivos, que foram verificados pela aplicação de técnicas moleculares.

A determinação do posicionamento taxonômico, realizada pela PCR, para as cepas isoladas de amostras de água, confirmou, assim como os testes bioquímicos, a taxonomia de 100% das cepas pesquisadas do presente estudo. De fato, estudos comprovam que o desenvolvimento e a aplicação da biologia molecular, no campo da sistemática bacteriana, têm-se revelado muito eficiente, uma vez que a precisão para a definição das espécies é muito maior do que quando se utilizam métodos convencionais (Matté 2003).

Devido aos resultados obtidos pelas provas fenotípicas realizadas com as cepas aqui pesquisadas, se reconhece a importância de identificar corretamente as espécies do gênero *Vibrio*, principalmente, isoladas de ambiente, ressaltando-se que, mesmo diante de características atípicas, esses microrganismos devem ser submetidos à realização de estudos taxonômicos. As cepas deste estudo, que apresentaram características atípicas, serão ainda submetidas aos estudos de sequenciamento de nucleotídeos, de forma a assegurar os resultados.

A pesquisa de genes relacionados à virulência de *V. parahaemolyticus* (*tdh*, *trh*), bem como do gene *tl*, possibilitou a detecção dos genes *tl* em 100% e, *tdh* em 3,8% das cepas, o que possibilitou

determinar a utilidade da técnica de PCR Multiplex na caracterização dos mesmos, em uma única reação.

A presença do gene *tl* revelou sua ocorrência em todos os isolados (Quadros 3 e 4), sugerindo que esse gene possa servir como um marcador na detecção do agente em cepas de *V. parahaemolyticus* de origem ambiental. Esses resultados foram concordantes com Bej et al. (1999) e Cabanillas-Beltrán et al. (2007), onde também foi observada a presença desse gene em 100% dos isolados de origem ambiental e clínica, sugerindo sua utilização como marcador para detecção do agente. O gene *trh* não foi detectado em nenhuma das cepas pesquisadas (Quadros 3 e 4), o que não implica na inexistência de cepas virulentas. De acordo com Lee & Pan (1993), cepas virulentas de *V. parahaemolyticus* podem apresentar *tdh+* e *trh-*, enquanto algumas podem ser *trh+* e *tdh-*.

A presença do gene *tdh* foi detectada em 3 (3,8%) cepas (178, 295, 1014), o que está de acordo com Thompson & Vanderzant (1976); Nishibuchi & Kaper (1995); Bates & Oliver (2004), que afirmam que esse gene encontra-se ausente na maioria das cepas ambientais de *V. parahaemolyticus*. Cabrera-García et al. (2004) também detectaram somente 4 cepas *tdh+*, de 46 isolados ambientais. Porém, DePaola et al. (2003) indicaram uma alta prevalência (12,8%) de cepas ambientais de *V. parahaemolyticus* *tdh+*, observada em seus estudos, em isolados de amostras de ostras.

Em testes realizados *in vivo* e *in vitro*, foi comprovado que além de atividade hemolítica, a TDH manifesta atividade citotóxica (Raimond et al. 2000; Bhattacharjee et al. 2005). Contudo, é importante ressaltar que em estudos realizados por Ottaviani et al. (2005), todas as cepas, isoladas de moluscos, apresentaram atividade citotóxica frente aos testes de laboratório em que foram utilizados animais, independente de terem apresentado os genes *tdh* e/ou *trh*, o que implica não só na possível presença de outros mecanismos de virulência, mas também na existência desses fatores em cepas ambientais. O teste em Ágar Wagatsuma é preconizado para a verificação do Fenômeno Kanagawa em cepas de *V. parahaemolyticus* patogênicas para o homem, porém, nos últimos anos vem sendo apontada a necessidade de mais testes de sensibilidade e, técnicas rápidas, como a utilização de ferramentas da biologia molecular para a detecção do patógeno em amostras clínicas, bem como de alimentos. Além disso, segundo pesquisadores, o teste Kanagawa pode resultar em uma reação falso-positiva (Deepanjali et al. 2005)

Em pesquisa realizada por Archer & Moretto (1994) com amostras de mexilhões provenientes da região de Santa Catarina, Brasil, foram detectadas cepas de *V. parahaemolyticus* "Kanagawa-negativas". Os autores porém, não descartaram a possibilidade da ocorrência de toxinfecção, uma vez que outros pesquisadores (Magalhães et al. 1991;

Honda et al. 1991; Ottaviani et al. 2005) sugerem a existência de outros fatores relacionados à patogenia da espécie.

Como foi destacado no Quadro 3 uma das cepas pesquisadas no presente estudo apresentou beta-hemólise em AW, o que configura o Fenômeno Kanagawa. Porém nesta cepa, não foi detectada a presença do gene *tdh* pela PCR, como era esperado, já que o mesmo é quem codifica a hemolisina e desencadeia a atividade hemolítica. Assim, diante deste resultado, fica uma incógnita quanto à expressão fenotípica da cepa na ausência de *tdh*. No entanto, é sugerida a hipótese de que haja uma outra hemolisina atuante, que também possa ser responsável por beta-hemólise nos eritrócitos, o que demonstra poder haver exceções quanto às características fenotípicas de cepas de *V. parahaemolyticus*. Em estudos realizados por Bej et al. (1999), também foi verificado que em uma cepa de origem ambiental, "Kanagawa-positiva", não foi detectado o gene *tdh*.

Há controvérsias a respeito do teste Kanagawa em cepas de *V. parahaemolyticus*, fundamentadas, porém, no fato de que outras espécies de vibrio podem induzir hemólise em Ágar Wagatsuma, por serem portadoras de uma hemolisina semelhante à TDH (Honda et al. 1992).

De acordo com pesquisas realizadas, existem variantes do gene *tdh*, exemplo, o *tdh1* e *tdh2*, que segundo Nishibuchi & Kaper (1990) foram detectadas em cepas de *V. parahaemolyticus* TDH+, revelando que a expressão fenotípica tem como responsável, primariamente, o gene *tdh2*, o

que reforça a possibilidade de outras hemolisinas, ainda não detectadas, estarem associadas à patogenia da espécie.

Outra técnica também utilizada para o monitoramento de *V. parahaemolyticus*, é a sorotipagem (Magalhães et al.1991; Pereira et al. 2004; Heitmann et al. 2005; Bhattacharjee et al. 2005).

Pesquisas realizadas no Brasil, permitiram a classificação de cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas de mexilhões, em 10 sorotipos diferentes, destacando a presença do sorotipo O3:K6, capaz de produzir surtos pandêmicos em diversas regiões do mundo (Pereira et al. 2007).

O método de sorotipagem, porém, depende das reações de proteínas de membrana que devem estar expostas e, serem reconhecidas por anticorpos. Caso estas proteínas não estejam sendo expressas, ou o painel de soros não seja adequado para aquela linhagem, a reação não ocorre e a bactéria não pode ser tipada (Darini et al. 1998). De fato, a existência de um grande número de isolados não tipáveis por métodos sorológicos tem levado pesquisadores a utilizar métodos genotípicos para melhor caracterizar esses organismos (Wong & Lin 2001).

Wong et al. (1996), reportaram a aplicabilidade da técnica de PFGE como ferramenta de estudo de diversidade entre isolados clínicos de *V. parahaemolyticus*, obtidos durante os anos de 1993 e 1994 em Taiwan, onde ocorreu um extenso surto de origem alimentar, causado pela espécie. Com base em sua alta habilidade discriminatória, a PFGE vem sendo

amplamente utilizada na caracterização de surtos causados por alimentos, ao longo dos anos em países asiáticos e norte americanos (Wong et al. 1999b; Wong et al. 2006; Rahman et al. 2005; Sirichantalergs et al. 2007; Bhoopong et al. 2007).

No presente estudo, a técnica de PFGE possibilitou a identificação da diversidade genotípica entre os isolados de diferentes origens. Para gerar polimorfismo entre as bandas de DNA dos isolados foi utilizada a enzima *Sfi*I. Em outras pesquisas com *V. parahaemolyticus*, onde foi empregada a técnica de PFGE, dentre as enzimas utilizadas, também está a *Sfi*I (Wong et al. 1999b; Wong et al. 2005; Chiu et al. 2007).

Com os resultados obtidos pela PFGE realizada neste estudo, foi possível observar uma diversidade de perfis que evidenciaram a presença de clones microbiológicos entre os isolados, com uma similaridade superior a 80% para cada um dos dois diferentes grupos de cepas estudadas. Segundo Tenover (1995), a similaridade entre espécies é considerada significativa acima de 77%.

Frente aos resultados obtidos pela PFGE, foi constatada a importância da aplicação deste método para conhecer a diversidade dos organismos, principalmente, em relação à distribuição geográfica dos mesmos. Em outros estudos, onde foi realizada a técnica, pesquisadores observaram perfis idênticos, entre 3 isolados de *V. parahaemolyticus* (*tdh+trh+*) de origem ambiental e clínica, provenientes de surtos ocorridos

na região de Washington (EUA) concluindo que esses dados podem ser de grande utilidade na avaliação de risco de infecções por esse patógeno, associados ao consumo de ostras cruas, nas regiões de Óregon e Washington, EUA (Chiu et al. 2007).

Ressalta-se que, durante o presente estudo, não foi observado na literatura consultada, exceto Matté (2003), nenhum trabalho que utilizasse a técnica de PFGE para a realização de tipagem de *V. parahaemolyticus* no Brasil. Portanto, os resultados aqui obtidos, assim como os de Matté (2003), poderão contribuir como um banco de dados genéticos e referência, para estudos epidemiológicos futuros, relacionados a doenças gastrintestinais no país.

A pesquisa com plasmídios foi realizada no presente estudo para conhecer a ocorrência e diversidade desses elementos nos isolados de origem ambiental do Brasil. Com os resultados obtidos, foi então constatado que os plasmídios estão presentes em cepas de *V. parahaemolyticus* de origem ambiental que circulam em nosso meio. Desta forma, pode-se então sugerir que outros genes relacionados à virulência desse organismo, possam estar presentes nesses plasmídios.

Segundo Darini et al. (1998), o perfil plasmidial pode ser considerado método instável e de baixo poder discriminatório para pesquisa de diversidade de microrganismos, salvo algumas exceções. De acordo com Matté (2003), a utilização do perfil plasmidial como método de tipagem,

apesar de viável quando se trata de microrganismos recentemente isolados, não é recomendável para comparações de longo prazo, pois esses elementos podem ser transferidos, podendo ocorrer tanto a perda como a aquisição de novos plasmídios. Poucas pesquisas são encontradas na literatura de *V. parahaemolyticus*, envolvendo a presença de plasmídios. Dentre elas, em estudos realizados por Guerry & Cowell (1976), foi constatado que em 4 de 12 cepas, pesquisadas de fontes humana e ambiental, havia a presença de plasmídios, porém com funções desconhecidas.

De acordo com Joseph et al. (1982), a presença de plasmídios nos vibrios é evidente, no entanto, não se conhecem suas funções. Contudo, não se pode deixar de pesquisar esses elementos extracromossomais em cepas de *V. parahaemolyticus*, pois em estudos realizados por Nasu et al. (2000), foram detectados plasmídios em cepas clínicas (O3:K6), oriundas do Japão (Quarentena do Aeroporto de Kansai 1996), da mesma forma que em isolados clínicos em Angola (África), onde foi detectada a presença de plasmídios, sendo esses, carreadores de genes de resistência a antibióticos, sendo sugerido pelos pesquisadores que esses elementos possam ter determinado a ocorrência de cepas resistentes, encontradas no ambiente (Ceccarelli et al. 2006).

Visando contribuir para uma melhor caracterização do patógeno, é essencial que sejam realizados mais estudos para o conhecimento da espécie *V. parahaemolyticus* a partir de seu ambiente natural, de alimentos de origem marinha ou de amostras clínicas. Desta forma, os métodos moleculares utilizados no presente estudo, podem ser aplicados pelos laboratórios de referência no monitoramento desse microrganismo. Entretanto, para que seja viável essa aplicação, seria necessária a melhoria do diagnóstico clínico e laboratorial. Nesse sentido, é recomendada a estratégia de "hospitais-sentinela", localizados próximos a regiões costeiras e em locais onde há maior consumo de produtos de origem marinha.

Para tanto, os profissionais de saúde que atuam nesses hospitais, devem ser orientados para, em casos onde ocorra gastroenterite associada ao consumo de pescado, solicitem que seja realizada cultura específica para o isolamento e caracterização de agentes relacionados com vibrioses, incluindo *V. parahaemolyticus*. Tais medidas poderiam fornecer informações relevantes para atuação dos serviços de vigilância em saúde.

7 CONCLUSÕES

As técnicas utilizadas no presente estudo, permitiram obter as seguintes conclusões:

✓ A utilização de iniciadores específicos para *V. parahaemolyticus* empregados na técnica de PCR, demonstrou especificidade, possibilitando a confirmação taxonômica dos isolados do presente estudo, podendo portanto, ser aplicados para a confirmação dos testes fenotípicos;

✓ Com a utilização da PCR Multiplex foi detectada a ocorrência do gene *tdh* em um número reduzido de cepas, a ausência do gene *trh* e a presença do gene *tl* em todas as cepas pesquisadas, demonstrando que, mesmo com baixa ocorrência, cepas de *V. parahaemolyticus tdh+*, podem ser encontradas no ambiente. Contudo, o gene *tl*, por estar presente na totalidade das cepas, pode ser utilizado como um marcador para essa espécie;

✓ O emprego do teste de Kanagawa possibilitou a observação de beta-hemólise em 3 (5,7%) cepas das estudadas. Entretanto, em apenas duas foi detectado o gene *tdh*, o que demonstra a importância da associação de métodos moleculares para a verificação de eventuais resultados inespecíficos;

✓ A técnica de PFGE possibilitou a observação da variabilidade genética entre as cepas de *V. parahaemolyticus* pesquisadas, demonstrando ser um excelente método para a tipagem molecular, podendo ser utilizada em estudos epidemiológicos;

✓ O perfil plasmidial permitiu observar a ocorrência de plasmídios em 48% das cepas do presente estudo, o que remete a possibilidade da realização de estudos complementares, visando determinar a natureza desses elementos extracromossomais;

✓ Os métodos moleculares empregados neste estudo, para identificação, caracterização dos fatores de virulência e tipagem molecular, demonstraram no seu conjunto, elevado potencial de aplicação na vigilância em saúde.

8 REFERÊNCIAS²

Adams MR, Moss MO. Food Microbiol. Guildford: Editora RSC; 2002.

Akeda Y, Kodama T, Kashimoto T, Cantarelli V, Horiguchi Y, Nagayama K, Iida T, Honda T. Dominant-negative Rho, Rac, and Cdc42 facilitate the invasion process of *Vibrio parahaemolyticus* into Caco-2 cells. Infect Immun 2002; 70(2):970-3.

Archer RMB, Moretto E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em Mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus) de banco natural do litoral do município de Palhoça, Santa Catarina-Brasil. Cad Saúde Publ 1994; (10): 3, 378-388.

Atlas RM, Sayler G, Burlage RS, Bej AK. Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. Biotech 1992; 12: 706-717.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in Molecular Biology USA: John Wiley & Sons; 1995.

Barboni SVA. Ocorrência de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 a 2002 nos municípios de área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia-Brasil. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2002.

² Apresentadas Segundo o Guia de Apresentação de Teses 2ª. ed – Biblioteca/CIR. São Paulo: FSP/USP; 2006.

Bates TC & Oliver JD. The Viable But Nonculturable State of Kanagawa Positive and Negative Strains of *Vibrio parahaemolyticus*. J Microbiol 2004; 42(2): 74-79.

Bhattacharjee RN, Park KS, Okada K, Kumagai Y, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S, Iida T, Honda T. Microarray analysis identifies apoptosis regulatory gene expression in HCT116 cells infected with thermostable direct hemolysin-deletion mutant of *Vibrio parahaemolyticus*. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 335(2):328-34.

Bej AK *et al.* Detection of total hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *thr*. J Clin Microbiol Methods 1999; 36: 215-225.

Bhoopong P, Palittapongarnpim P, Pomwised R, Kiatkittipong a, Kamruzzaman M, Nakaguchi Y, *et al.* Variability of Properties of *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Individual Patients. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1544-1550.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº.12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan 2001. [Online]. Available from <URL: http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01_anvisa.pdf>

Cabanillas-Beltrán H, Llausás-Magaña E, Romero R, Espinoza A, García-Gasca A, Nishibuchi M, Ishibashi M, Gómez-Gil B. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in México.

Cabrera-García ME, Vázquez-Salinas C, Quiñones-Ramírez EI. Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(11):6401-6406.

Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(7):2493-9.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rapid Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Vibrio cholerae* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE); PulseNet USA 2006. The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance. Sections 5.71;

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Two cases of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 infection after Hurricanes Katrina and Rita - Louisiana; 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55(2):31-32.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Vibrio* illnesses after Hurricane Katrina--multiple states, August-September 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 54(37):928-931.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters in Pacific Northwest, 1997. *MMWR* 1998; 47: 457-462.

Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE), de 11 de abril de 2003. [Online]. [Acesso em 14/06/2006]. Disponível em <URL http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/Vibrio_parah.htm>.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório de Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo. Balneabilidade das Praias 2004/Série Relatórios 2004; p. 91. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente, 2005.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório de Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo. Balneabilidade das Praias 2004/Série Relatórios 2005; p. 76. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente, 2006.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) – Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 325 de 17 de março de 2005. [Acesso em 12/05/2006]. Disponível em: <URL <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Inter Journal of Food Microbiol* 2001;68:11-20.

Chiou CS, Hsu SY, Chiu SI, Wang TK, Chao CS. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol* 2000; 38(12):4621-4625.

Chiu TH, Duan J, Su YC. Characteristics of virulent *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Oregon and Washington. J Food Prot 2007; 70(4):1011-1016.

Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T, Nishibuchi M, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. Emerg Infect Dis 2000; 6(6):631-6.

Daniels NA , MacKinnon L, Bishop R, Altekrose S. Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM, Slutsker L *Vibrio parahaemolyticus* infections in United States J Infec Dis 2000; 181, 1661-1666.

Darini AL, Magalhães VD, Crott LSP. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. Medicina, Ribeirão Preto 1998; 30:73-80.

Deepanjali, et al. Seasonal Variation in Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters along the Southwest Coast of India. Appl and Envir Microb 2005; 71(7): 3575-3580.

DePaola, Kaysner CA, Bowers JVC, Cook DW. W. Environment investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters after outbreaks in Washington, Texas and New York (1997 and 1998). Appl Environm Microbiol 2000; 66, 4649-4654.

DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JVC, Wells JG, Cook DW. Seasonal abundance of total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in Alabama oysters. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1521-1526.

DePaola A, Ulaszek J, Kaysner CA, Tenje BJ, Nordstrom JL, Wells JG. Molecular, serological and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food and clinical sources in North América and Ásia. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 3999-4005.

Eisenstein BI, Engleberg NC. Applied molecular genetics: new tools for microbiologists and clinicians. *J Infect Dis* 1986; 153(30): 416-30.

Ferreira ME e Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, EMBRAPA, 220 p. 1996.

Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from Latin America cholerae epidemic. *J Clin Microbiol* 1992; 30(8): 2118-2121.

González-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara JA, Cabello F, Romero J, Espejo RT. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(1):129-131.

Iguchi T, Kondo S, Hisatsune K. *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 130(2-3):287-292.

Farmer JJ III, Janda MJ, Brenner WF, Cameron DN, Birkhead KM. *Genus I. Vibrio*: In: Pacini 1854, 411^{AL}, *Bergey's Manual of System Bacteriol* 2005; (2): 494-527.

Fujino T, Okuno, Y, Nakada D, Aoyama A, Fukai K, Mukai T, Ueho T. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *J Jp Infect Dis, Tokyo* 1951; 25: 11-16.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) - Ministério da Saúde. Bol Eletr Epidemiol 2002 [Online]. Disponível em <URL: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_04_ano02.pdf>

Gil AI, Miranda H, Lanata CF, Prada A, Hall ER, Barreno CM, Nursin S, Bhuiyan NA, Sack DA, Nair GB. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. J Infect Dis 2007; 326: 1-5.

Heidelberg JF, Eisen JÁ, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD,

Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O. DNA sequence of both chromosomes of the cholerae pathogen *Vibrio cholerae*. Nature 2000; 406:477-83.

Heitmann I, Jofré L, Hormázabal JC, Olea A, Vallebuona C, Valdés C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. Rev Chilena Infectol. 2005; 22(2):131-40.

Hernandez C, Ulloa J, Vergara JA, Espejo R, Cabello F. *Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergent public health problems in Chile. Rev Med Chil 2005; 133(9):1081-1088.

Honda et al. Characterization of a new thermostable direct haemolysin produced by a Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus* J Clin Microbiol 1991; 11:600-603.

Honda et al. The thermostable direct haemolysin of *V. parahaemolyticus* is a poreforming toxin. Can F Microbiol 1992; 38: 1975-1980.

Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* 1993; 4, 106-113.

Hulton, CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991; 5:825-834.

Iida T & Honda T. Hemolysins produced by vibrios. *F Toxicol Toxin Rev* 1997; 16, 215-227.

Iida T, Park KS, Suthienkul O, Kozawa J, Yamaichi Y, Yamamoto K, Honda T. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev Microbiol* 1998; 144 (9):2517-2523.

Ivanova EP, Romanenko LA, Matté MH, Matté GR, Lysenco AM, Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Sawabe T, Vysotskii MV, Frolova GM, Mikhailov V, Christen R, Colwell RR. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. Nov. and emendation of description. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:1071-1078.

Ivanova EP, Matté GR, Matté MH, Coenye T, Huq A, Colwell RR. Characterization of *Pseudoalteromonas citrea* and *P. nigrifaciens* isolated from Different Ecological Habitats Based on Rep-PCR Genomic Fingerprints. *System Appl Microbiol* 2002; 25: 275-283.

Joseph SW, Cowell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit Rev Microbiol* 1982; 10: 74-124.

Kapley A, Puhorit HJ. Detection of etiological agent for cholerae by PCR protocol. *Med Sci Monit* 2001; 7(2): 242-245.

Kelly MT, Stroh EM. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. *J Clin Microbiol* Washington, DC; 1988; 26(9): 1754-1756.

Kishishita M, Matsuoka N, Kumagai K, Yamasaki S, Takeda Y, Nishibuchi M. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(8):2449-2457.

Koch WH, Payne WL, Wentz BA, Cebula TA. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59(2): 556-60.

Kong RYC, Lee SKY, Law TWF, Law SHW and. Wu RSS Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research* 2002; 36(11): 2802-2812.

Lang et al. Effect of *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin in human erythrocytes. *Cell Microbiol* 2004; 6: 391-400.

Lederberg JRE, Shape R, Oaks JR. *Emerging Infections. Microbiol Threats to Health in the United States*. Washington, DC. National Academy Press 1992.

Lee C, Pan SF. Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction. *J Gen Microbiol* 1993; 139(12):3225-31.

Leitão MFF, Arina HK. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho no Estado de São Paulo: Incidência em peixes, moluscos e crustáceos. Colet Inst Tecn de Alimen 1976; 7: 82-190.

Lemoine T, Germanetto P, Giraud P. Toxi-infection alimentaire collective à *Vibrio parahaemolyticus*. Bull. Épidémiol Hebd 1999, 10: 37-38.

Lira A, et al. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados na Grande Recife, PE. Rev Higiene Alimentar, Recife. 2001; 15: (90).

Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Bruijin FJ. Specific genomic fingerprintings of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl Environ Microbiol 1994; 60(7): 2286-95.

Ludwig W, Dorn S, Springer N, Kirchhof G, Schleifer KH. PCR – based preparations of 23S rRNA - targeted group – specific polynucleotide probes. Appl Environ Microbiol 1994; 60(9): 3236-44.

MacCarter LL. Polar Flagellar Motility of the *Vibrionaceae*. Microbiol and Molecular Biol Reviews 2001; 65 (3): 445-462.

Magalhães V, Lima RA, Tateno S, Magalhães M. Gastroenteritis humanas associadas à *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991; 33 (1): 64-68.

Magalhães M. et al. Isolation of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* from diarrheal patients in northeast Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1991; 33 (4): 263-265.

Magalhães M, Takeda Y, Magalhães V, Tateno S. Brazilian urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* carry genetic potential to produce the TDH-related hemolysin. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87(1): 167-168.

Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet* 2003; 361:743-9.

Matté GR. Isolamento de vibrios potencialmente patogênicos em moluscos bivalves. [tese de doutorado]. São Paulo; Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1993.

Matté GR, Matté MH, Sato MIZ, Sanchez PS, Rivera IG, Martins MT. Potentially Pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region an the Atlantic coast of Brazil. *J Appl Bacteriol* 1994a; 77:281-287.

Matté GR, Matté MH, Rivera IG, Martins MT. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from a tropical region. *J Food Protect* 1994b; 57:870-873.

Matté MH. Pesquisa de *Aeromonas* spp. potencialmente patogênicas em alguns pontos da represa guarapiranga destinados à recreação e captação para abastecimento público. [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1996.

Matté GR. Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares. [tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2003.

Matté MH, Baldassi L, Barbosa ML, Malucelli MIC, Nitrini SMOO, Matté GR. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. *Food Control* 2007; 18: 747-751.

Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980;8:4321-4325.

Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park KS, Yokoyama K et al. A Filamentous Phage Associated with Recent Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Strains. J C Microbiol 2000; 2159-2161.

Nair GB & Opazo JCH. La pandemia de *Vibrio parahaemolyticus*. Revista chilena de infectologia 2005; 1-5.

Newton CR & Graham A. PCR. The Introduction to Biotechniques series. Bios Sci Publ 1997.

Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a Virulence Gene Acquired by a Marine Bacterium. Infection and Immunity, MINIREVIEW 1995; 63:2093-7.

Oliveira WK, Wada MY, Lima JRC, Pinheiro AMC, Brito NPB, Arcanjo SRS, Barbosa LMM, Machado CB, et al. Investigação do surto de gastroenterite por *Vibrio parahaemolyticus* em Fortaleza/Ceará, setembro, 2002. Bol Epidemiol 2002; (4): 5-7.

Osawa R, Okitsu T, Morozumi H, Yamai S. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. Appl Environ Microbiol 1996; 62(2):725-7.

Ottavianni et al. Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy . Short Communication. Food Microbiol 2005; 22: 585-590.

Pereira CS, Viana CM, Rodrigues D dos P. *Vibrio parahaemolyticus* Produtores de Urease Isolados a partir de Ostras (*Crassostrea rizophorae*) Coletadas *In Natura* em Restaurantes e Mexilhões (*Perna perna*) de Banco Natural. Ciênc Tecnol Aliment 2004; (24)4591-4595.

Pereira CS, Possas C de A, Viana CM, Rodrigues D dos P. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from mussels (*Perna perna*) commercialized at Niterói, Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(1):56-59.

Persin DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic Molecular Microbiology – Principles and Applications. Washington, DC. American Society for Microbiology 1993.

Peterson KM, Zuppardo A. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Molecular Med Microbiol 2002; 1291-1909.

Quilici ML, Robert-Pillot A, Picart J, Fournier JM. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. Emerg Infect Dis 2005; 11(7):1148-1149.

Rivera IG, Chowdhury MAR, Huq A, Jacobs D, Martins MT, Cowell RR. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and the PCR to generate fingerprintings of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and Non-O1 strains. Appl Environ Microbiol 1995b; 2898-2904.

Rivera IG, Chowdhury MAR, Sanchez PS, Sato MI, Huq A, Cowell RR, Martins MT. Detection of cholerae (ctx) and zonula occludens (zot) toxin genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. World J Microbiol Biotechnol 1995a; 11:572-577.

Rahman M, Bhuiyan NA, Ramamurthy T, Rahman M, Mollby R, Nair GB. Biochemical fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* by the Phene Plate system: comparison between pandemic and non-pandemic serotypes. Short Report - Epidemiol Infect 2006; 1-5.

Robert-Pillot A, Guenolè A, Lesne J, Delesmont R, Fournier JM, Quilici ML. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. J Food Microbiol 2004; 9, 319-325.

Serichantalergs O, Bhuiyan AM, Nair BG, Chivaratanond O, Apichai S, Bodhidatta AS, Mason CJ. The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhea in Thailand, and a new emergent serovar (O3:K6) with pandemic traits. J Med Microbiol 2007; 56, 608-613.

Serra CLM, Cavalcante PRS, Alves LMC, Nascimento AR, Diniz SCC de S. Avaliação de parâmetros físico e químicos e pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em águas do estuário do rio Anil (São Luís, Estado do Maranhão). Acta Scien Biol Sciences. Maringá 2003; 25(2): 261-263.

Silva ML. Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2007.

Singh DV, Matté MH, Matté, GR, Jiang S, Sabeena F, Shukla BN, Sanyal, SC, Huq A, Cowell RR. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 910-21.

Shinoda S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. J Nat Toxins. 1999; 8(2):259-269.

Shinoda S, Matsuoka H, Tsuchie T, Miyoshi S, Yamamoto S, Taniguchi H, Mizuguchi Y. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. J Gen Microbiol. 1991; 137(12):2705-2711.

Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y, Nishibuchi M. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct haemolysin (TDH) and TDH-related haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. Infect Immun 1990; 58(11): 3568-3573.

Sousa CP. Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em águas marinhas costeiras, carne de caranguejo (*Callinectes* sp) e ostras (*Crassostrea* sp) em João Pessoa - PB. [dissertação de mestrado]. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa; 1989.

Sousa OV, Vieira RHSF, Menezes FGR, Reis CMF, Hofer E. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in Oysters, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River Estuary, Fortaleza, Ceará, Brasil. Rev Inst Med Trop 2004; 46 (2): 59-62.

Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell 1984; 37:1015-1026.

Tagomori K, Iida T, Honda T. Comparison of Genome Structure of Vibrios, Bacteria Possessing Two Chromosomes. J Bacteriol 2002; 184 (16): 4351-4354.

Tenover, FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-2239. Guest Commentary.

Thompson CA, Vanderzant C. Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources. J Food Sci 1976; 41: 150-151.

Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68(3):403-431.

Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Saúde Pública. Guia de apresentação de teses. Cuenca AMB, de Andrade MTD, Noronha, Noronha DP, Ferraz MLEF. 2ed. São Paulo: A Biblioteca, 2006.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 199; 19: 6823-6831.

Wagatsuma S. On the medium for haemolytic reaction. Media Circle 1968; 13: 159-162.

Watkins WD, Cabelli VJ. Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. Appl Environ Microbiol, Washington, DC 1985; 50: 1490-1495.

Wong HC, Liu SH, Chiou CS, Nishibuchi M, Lee BK, Suthienkul O, Nair GB, Kaysner CA, Taniguchi H. A pulsed-field gel electrophoresis typing scheme for *Vibrio parahaemolyticus* isolates from fifteen countries. J Food Microbiol 2006; 114(3):280-287.

Wong HC, Chen CH, Chung YJ, Liu SH, Wang TK, Lee CL, Chiou CS, Nishibuchi M, Lee BK. Characterization of new O3:K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. J Appl Microbiol 2005; 98(3):572-580.

Wong HC, Liu CC, Pan TM, Wang TK, Lee CL, Shih DY. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan, by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol 1999b; 37:6 1809-1812.

Wong HC, Lin CH. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers J Clin Microbiol 2001; 39:12 4233-4240.

Yeung PS, Hayes MC, DePaola A, Kaysner CA, Kornstein L, Boor KJ. Comparative Phenotypic, Molecular, and Virulence Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Isolates. Applied and Environ Microbiol 2002; 68(6): 2901-2909.

Y- ishin Chen, Meng –Yi Chen, Hin-Chung Wong. Susceptibility of O3:K6 and environmental strains of *Vibrio parahaemolyticus* to acid inactivation, and survival competition between these strains and *Pseudomonas fluorescens* and indigenous bacteria. J Food Drug Analysis 2003; 11: 226-232.

Zhang XH, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species. Review. J Appl Microb 2005; 98, 1011-1019.

Pesquisa de referências bibliográficas no banco de dados da medline.

Disponível em: <URL <http://research.bmn.com/medline>>.