

Helen Silvestre da Silva

**OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM MOLUSCOS
BIVALVES PRODUZIDOS EM SANTA CATARINA E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO
POR PCR EM TEMPO REAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Helen Silvestre da Silva

OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM MOLUSCOS BIVALVES PRODUZIDOS EM SANTA CATARINA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL / Helen Silvestre da Silva Silva ; orientadora, Cleide Rosana Werneck Vieira Vieira - Florianópolis, SC, 2016.

88 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Moluscos Bivalves. 3. *Vibrio parahaemolyticus*. 4. qPCR. I. Vieira, Cleide Rosana Werneck. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Helen Silvestre da Silva

**OCORRÊNCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* EM MOLUSCOS
BIVALVES PRODUZIDOS EM SANTA CATARINA E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO
POR PCR EM TEMPO REAL**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 14 de março de 2016.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^axxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^axxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Dedico este trabalho ao meu pai, Ricardo, e minha mãe, Iolanda, exemplos de honestidade, dignidade e retidão, e grandes incentivadores do meu gosto pela ciência, com os quais eu aprendi que a humanidade pode ser tão ou mais importante do que a sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me ajudaram a concluir este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos...

... à minha família, meu amor, Anderson, meu filho amado, Ruan, meus pais e incentivadores, Ricardo e Iolanda, por ter me acompanhado por todo o caminho, por compreender a escassez da minha presença, mas sempre incentivando e apoiando todos os meus passos. Vocês são os alicerces sobre os quais construo minha vida...

... à minha orientadora, Professora Doutora Cleide Rosana Werneck Vieira pela confiança em mim depositada, pelos muitos anos de convívio e amizade, pela contribuição ao meu amadurecimento, por sempre manter as portas abertas;

...às minhas companheiras, confidentes e amigas, Marília, Karin e Clarissa, pelo companheirismo nos momentos de tristeza ou dificuldade (foram muitos) e nos momentos de descontração (esses então, incontáveis), vocês fazem parte disso;

...aos colegas de laboratório, Priscila, Simone, Daiane, Norton, pelo apoio;

...a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro através das bolsas concedidas durante o doutorado;

...a CIDASC e EPAGRI pela colaboração no envio de amostras;

...a todos os professores da pós-graduação que contribuíram para minha formação;

... a todos os amigos, por todo o incentivo que me deram, de todas as formas, de perto ou de longe.

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos
é um oceano.

Isaac Newton (1.687)

RESUMO

Vibrio parahaemolyticus é um patógeno veiculado por alimento e sua infecção humana é regularmente associada com o consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos e água contaminada. Esta pesquisa teve como objetivo identificar e quantificar *Vibrio parahaemolyticus* em ostras frescas (*Crassostrea gigas*), mexilhões (*Perna perna*) e água do mar provenientes de diferentes regiões de cultivo de moluscos bivalves no litoral de Santa Catarina, Brasil e otimização de um ensaio rápido de qPCR utilizando tecnologia de sondas TaqMan MGB, visando o gene da hemolisina termolábil (*tl*) de *V. parahaemolyticus* para a detecção e quantificação desta bactéria a partir de frutos do mar e amostras ambientais. As amostras foram coletadas entre outubro de 2012 e Dezembro de 2013. Foram coletadas 130 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*), 215 amostras de mexilhões (*Perna perna*) e 222 amostras de água do mar. A ocorrência de *V. parahaemolyticus* em ostras e mexilhões foi baixa, 10,76% e 11,62% das amostras analisadas. Maior incidência de *V. parahaemolyticus* foram observados na água do mar, 18,%. A densidade de *V. parahaemolyticus* no verão (dezembro a março) foi significativamente maior do que nas outras 3 estações do ano ($P < 0,01$). O ensaio qPCR e os iniciadores utilizados são altamente específicos, quando testado contra outras bactérias. O ensaio também é altamente sensível, e, é capaz de detectar *V. parahaemolyticus* com altos valores de coeficiente em concentrações tão baixas como 10^2 cópias / reação de soluções puras de ADN genômico e 30 células / ml em suspensão de células diluída em série e adicionadas em amostras de tecido de ostras e mexilhões. Recomendamos que medidas de controle devem ser consideradas, incluindo o estabelecimento de uma vigilância intensiva e contínua de *V. parahaemolyticus* potencialmente patogênicos em todas as áreas de cultivo de moluscos bivalves, avaliação dos parâmetros ambientais, bem como a avaliação do risco para a saúde humana associado a ao consumo desses moluscos que é específica de cada região.

Palavras-chave: ostra, *Crassostrea gigas*, *Vibrio parahaemolyticus*, moluscos bivalves, qPCR, quantificação.

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is a food borne pathogen and their human infection is regularly associated with the consumption of raw or undercooked seafood and contaminated water supplies. This research aimed to identify and quantify *Vibrio parahaemolyticus* in fresh oysters (*Crassostrea gigas*), mussels (*Perna perna*) and seawater coming from different regions of cultivation of bivalve shellfishes in the seacoast of Santa Catarina, Brazil and the optimization of a rapid qPCR assay using TaqMan MGB probe technology, targeting the thermo labile (*tl*) gene of *V. parahaemolyticus* for the detection and enumeration of this bacterium from seafood and environmental samples. Samples were collected between October 2012 and December 2013 and there were collected 130 oysters samples (*Crassostrea gigas*), 215 mussels samples (*Perna perna*) and 222 seawater. The occurrence of *V. parahaemolyticus* in oysters and mussels was low, 10,76% and 11,62% of samples tested. Higher incidences of *V. parahaemolyticus* were observed in seawater, 18,%. The density of *V. parahaemolyticus* in summer (December to March) was significantly greater than those in the other 3 seasons ($P < 0.01$). The occurrence of pathogenic *V. parahaemolyticus* in oyster, mussels and seawater was very low (<10%). The qPCR assay and the primers used are highly specific, and only generated the desired amplicons with *V. parahaemolyticus* DNA samples against other bacteria. The assay is also highly sensitive, and, is able to detect *V. parahaemolyticus* with high coefficient values in concentrations as low as 10^2 copies/reaction for pure genomic DNA solutions and 30 cells/ml in serially diluted cell suspension and spiked samples. We recommend that control measures should be considered, including the establishment of an intensive and continuous monitoring of potentially pathogenic *V. parahaemolyticus* from all oyster-growing areas, the environmental parameters, and the assessment of the region-specific human health risk due to consumption of oyster.

Keywords: oyster, *Crassostrea gigas*, *Vibrio parahaemolyticus*, bivalve molluscs, qPCR, quantification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a. Representação do genoma circular de <i>V. parahaemolyticus</i> .	36
Figura 1b. Legenda para representação do genoma circular de <i>V. parahaemolyticus</i>	37
Figura 2. The coastal region which is the cultivation of bivalve molluscs in the Santa Catarina	51
Figura 3. Representação da curva padrão gerada cruzando os valores de Ct contra a concentração logarítmica do gene <i>tl</i> (cópias/reação) para <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . Os valores de Ct são médias das sete repetições.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de virulência conhecidos para <i>V. parahaemolyticus</i> .	33
Tabela 2. Cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> usadas em estudos de efetores derivadas do isolado clínico RimD 2210633.....	35
Tabela 1. Occurrence of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in oyster, mussels and seawater samples.....	53
Tabela 4. Cepas bacterianas utilizadas com respectivas referências	70
Tabela 5. Iniciadores e Sonda usados.....	73
Tabela 6. Especificidade do primer (expresso em valor de Ct) obtido a partir de 10 ng of DNA por reação de PCR. Valores de Ct em negrito indicam os Cts para o DNA alvo.....	75
Tabela 7. Valores de Ct obtidos com a amplificação de amostras de DNA alvo misturadas com DNA não-alvo. O controle positivo, sem DNA não-alvo é apresentado em negrito.	76
Tabela 8. Repetibilidade e reprodutibilidade da qPCR baseado nos valores de Ct em amostras artificialmente contaminadas em três diferentes concentrações	78
Tabela 9. Resultados da quantificação de <i>V. parahaemolyticus</i> em amostras de ostras e mexilhões obtidos pelo isolamento em placas e qPCR.	79

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica	23
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> : o seu papel no risco associado ao consumo de alimentos de origem marinha	25
1. <i>Ocorrência de Vibrio parahaemolyticus</i>	26
1.1. Distribuição nos ambientes marinhos.....	26
1.2. Prevalência em Moluscos.....	27
2. <i>Incidência de Vibrio parahaemolyticus em surtos de gastroenterites</i> 27	
Incidência na Europa.....	27
2.2. Incidência na Ásia	28
2.3. Incidência na América	29
3. <i>Fatores de Virulência</i>	30
3.1. Hemolisina Termoestável Direta (TDH)	31
3.2. Hemolisina Termoestável Relativa (TRH)	34
3.3. Sistema de Secreção do Tipo III de <i>V. parahaemolyticus</i>	34
4. <i>Métodos de identificação ou quantificação de Vibrio parahaemolyticus</i>	38
4.1. Método do Número Mais Provável (NMP)	38
4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	39
4.3. PCR quantitativo (q-PCR)	40
5. <i>Referências</i>	41
CAPÍTULO II: Occurrence of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in oysters (<i>Crassostrea gigas</i>) and mussels (<i>Perna perna</i>) of the seacoast of Santa Catarina, Brazil	47
1. <i>Introduction</i>	49
2. <i>Material and methods</i>	50
2.1. Collection and Preparation of the samples	50
2.2. Isolation and enumeration of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in oyster and mussels samples.....	51
2.3. Multiplex PCR for the detection of rox, tdh and trh genes.	52

2.4. Statistical analysis.....	52
3. <i>Results and Discussion</i>	53
4. <i>Conclusion</i>	56
5. <i>References</i>	56

Capítulo III: Adaptação de método para quantificação de *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos bivalves por PCR em tempo real..... 65

1. <i>Introdução</i>	67
2. <i>Material e métodos</i>	69
2.1. Cepas bacterianas.....	69
2.2. Preparação das culturas.....	69
2.3. Obtenção e preparação das amostras de ostras e mexilhões.....	70
2.4. Preparação dos <i>pellets</i> de células para a curva padrão	71
2.5. Preparação dos <i>pellets</i> de células de ostras e mexilhões	71
2.6. Extração de DNA.....	71
2.7. <i>Iniciadores</i> , sonda e ensaio de qPCR.....	72
2.7.1. Inibidores de amplificação	73
2.7.2. Construção da Curva Padrão	73
2.7.3. Cálculo do número de cópias do gene <i>tl</i>	73
2.8. Ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade.....	74
3. <i>Resultados e Discussão</i>	74
3.1. Especificidade dos iniciadores e influência de inibidores da amplificação	74
3.2. Validação do ensaio de qPCR.....	76
3.3. Quantificação de <i>V. parahaemolyticus</i> em amostras artificialmente contaminadas.....	79
4. <i>Considerações finais</i>	81
5. <i>Referências</i>	82

INTRODUÇÃO

A inocuidade de alimentos é uma questão de saúde pública essencial em todos os países. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são comuns e representam uma séria ameaça à saúde humana, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Dados disponíveis indicam que a frequência de DTA aumentou em todo o mundo nos últimos 20 anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente dois milhões de pessoas vão a óbito devido a doenças diarreicas, enquanto centenas de milhões sofrem de episódios de diarreia e suas consequências debilitantes, com a grande maioria sendo causada por micro-organismos veiculados por alimentos ou água.

As mudanças epidemiológicas das DTAs são resultado de interações complexas e variações entre micro-organismos patogênicos, composição do alimento, distribuição e consumos dos alimentos e imunidade da população. Aspectos do processamento dos alimentos e o sistema de distribuição podem atenuar ou ampliar um perigo potencial a saúde. Embora um entendimento complexo sobre a contaminação, infecção e sobrevivência de um micro-organismo patogênico nos alimentos seja difícil, estudos sistematizados que possibilitem medir as consequências da exposição humana ao patógeno podem melhorar a qualidade das decisões a serem tomadas visando a saúde pública. O acordo da Organização Mundial do Comércio (OMC) sobre medidas sanitárias e fitossanitárias estabelece que a inocuidade de alimentos deve ser baseada em conhecimentos científicos por parte dos países importadores e exportadores.

O papel dos moluscos bivalves na transmissão de agentes bacterianos ao homem está bastante esclarecido e documentado através de estudos realizados em alguns países. Um século atrás, nos Estados Unidos, um agente de origem fecal causador de surtos diarreicos foi identificado como *Salmonella* spp. Os surtos associados ao consumo de moluscos bivalves tornaram-se tão comuns que em 1920 o país deu início ao Programa Nacional de Saneamento. Na década de 1970 novas ameaças foram associadas principalmente a patógenos bacterianos do gênero *Vibrio* sp., sendo que três espécies eram mais comumente associadas aos casos de doenças, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*.

No Brasil, a produção e comercialização de moluscos bivalves vêm crescendo ano após ano, no entanto o *Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário e Moluscos Bivalves* - PNCMB é

relativamente novo e os estudos científicos, como este trabalho, voltados ao conhecimento dos perigos associados ao seu consumo ajudarão no desenvolvimento de novas estratégias a serem adotadas no futuro. Os resultados gerados nesta tese contribuirão para o avanço no conhecimento do aspecto sanitário dos moluscos produzidos no Estado de Santa Catarina e poderão auxiliar nas decisões futuras dos órgãos responsáveis pela garantia da qualidade desse produto.

CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica

***Vibrio parahaemolyticus*: o seu papel no risco associado ao consumo de alimentos de origem marinha**

Vibrio parahaemolyticus é uma bactéria Gram-negativa, halofílica, não esporogênica, de morfologia em forma de bastão reto ou que tem uma única curvatura rígida. Possui um único flagelo polar e é móvel quando cultivada em meio líquido (Baumann e Schubert, 1984). Esta bactéria é um agente patogênico humano que ocorre naturalmente no ambiente marinho e frequentemente isolado a partir de uma grande variedade de alimentos de origem marinha, incluindo bacalhau, sardinha, cavala, marisco, polvo, camarão, caranguejo, lagosta, lagostim, vieira e ostra (Liston, 1990).

Segundo Zamora-Pantoja et al. (2013), a presença de *V. parahaemolyticus* foi relatada no Japão, Coreia do Sul, Tailândia, Indonésia, Vietnã, China, Índia, Irã, Rússia, Austrália, Noruega, Inglaterra, Dinamarca, Alemanha, Itália, Escócia, Espanha, e nos mares Negro, Báltico e Mediterrâneo. Foi descrito também no Togo e Madagascar, na África, enquanto que nas Américas tem sido detectada no Canadá, Panamá, Estados Unidos, México e Chile.

O consumo de alimentos de origem marinha malcozidos, principalmente mariscos, contaminados com *V. parahaemolyticus* pode levar ao desenvolvimento de gastroenterite aguda caracterizada por diarreia, dor de cabeça, vômito, náuseas, cólicas abdominais e febre baixa. Esta bactéria é reconhecida como a principal causa de gastroenterite humana associado com o consumo de alimentos de origem marinha nos Estados Unidos e um importante patógeno de origem alimentar em todo o mundo (Kaysner e DePaola, 2001).

Embora a infecção causada por *V. parahaemolyticus* seja, geralmente, autolimitada, a infecção pode causar septicemia que oferece risco de vida a pessoas com condições médicas específicas, como doença hepática ou distúrbios imunes. Duas mortes foram registradas entre os três casos de infecções de feridas causadas por *V. parahaemolyticus* em Louisiana e Mississippi após o furacão Katrina, em 2005 (CDC, 2005).

Esta revisão traz uma visão geral sobre a doença alimentar causada por *V. parahaemolyticus* e informações sobre o desenvolvimento de métodos para sua detecção e para reduzir o risco de infecções associadas com consumo de moluscos bivalves.

1. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*

1.1. Distribuição nos ambientes marinhos

A distribuição de *V. parahaemolyticus* nos ambientes marinhos é conhecida por se relacionar com as temperaturas da água. Estudos mostram que o organismo é raramente detectado na água do mar em temperaturas abaixo de 15° C. Estudo ecológico realizado na baía de Chesapeake em Maryland descobriu que *V. parahaemolyticus* sobreviveu em sedimentos durante o inverno e foi liberado a partir destes na coluna de água, quando a temperatura da água subiu para 14° C no final da primavera ou início do verão (Kaneko e Colwell, 1973).

Outra pesquisa realizada em nove estados costeiros dos EUA realizada entre 1984 e 1985, informou uma baixa densidade média de *V. parahaemolyticus* (4 células /100 ml) em água do mar, quando a temperatura da água caiu abaixo de 16° C (DePaola et al., 1990). No entanto, as densidades de *V. parahaemolyticus* em água do mar podem aumentar para 1000 cel/100 ml quando as temperaturas da água aumentam para cerca de 25° C (DePaola et al., 1990; Kaneko e Colwell, 1973). Um estudo de ocorrência de *V. parahaemolyticus* em ambientes de cultivo de ostras em Oregon entre novembro de 2002 e outubro de 2003, também encontrou uma correlação positiva entre o número de *V. parahaemolyticus* na água do mar e temperaturas de água, com as maiores populações sendo detectadas nos meses de verão (Duan e Su, 2005a).

No Brasil, um estudo realizado por Costa Sobrinho (2010) no Estado de São Paulo entre os meses de fevereiro de 2006 e janeiro de 2007 demonstrou que o registro da densidade média de *V. parahaemolyticus*, nos meses de inverno foi 1,2 mais baixo do que nos meses de verão. Ramos (2014), realizou um estudo de diferentes espécies do gênero *Vibrio* sp. em amostras de águas de cultivos provenientes da Baía Sul de Florianópolis no estado de Santa Catarina e constatou que as maiores densidades encontradas para as diferentes espécies foram nos meses de verão, quando a temperatura da água apresentou média de 24° C.

Segundo a FAO (2012), as mudanças climáticas deverão acelerar o ciclo da água com o aumento da precipitação nos trópicos e em maiores altitudes, condições mais secas em regiões subtropicais e aumento da frequência de secas e inundações extremas. Eventos como as inundações são capazes de perturbar a infraestrutura sanitária em torno dos locais de colheita e da aquicultura de peixes, afetando a

segurança de alimentos dos mesmos. Surtos da doença causada por *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos no Chile têm sido relacionados com a chegada de água equatorial quente durante eventos do El Niño.

1.2. Prevalência em Moluscos

O grau de contaminação por *V. parahaemolyticus* em moluscos bivalves também é conhecido por se relacionar com as temperaturas da água. Portanto, é mais provável que se detecte *V. parahaemolyticus* em ostras colhidas na primavera e no verão do que no inverno. Embora a densidade de *V. parahaemolyticus* em ostras contaminadas seja geralmente menor que 10^3 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /g (Kaysner e DePaola, 2000), esse grau de contaminação poderia aumentar bastante em ostras colhidas a partir de água do mar com temperaturas maiores (DePaola et al., 2000) e o micro-organismo pode se multiplicar rapidamente em ostras após exposição a temperaturas elevadas. Poucos estudos sobre a taxa de multiplicação *V. parahaemolyticus* têm sido publicados, a maioria dos dados conhecidos estão concentrados em um trabalho que avaliou a densidade de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras não refrigeradas, sendo que os resultados demonstraram que a densidade pode aumentar rapidamente a 50-790 vezes o seu nível original dentro de 24 h de colheita se estas ostras forem expostas a temperatura média de 26° C (Gooch et al., 2002). Um levantamento de 370 lotes de ostras amostradas de restaurantes, bares, mercados de varejo e atacado nos EUA entre junho de 1998 e julho de 1999 encontrou uma distribuição sazonal de *V. parahaemolyticus* com altas densidades (alguns excedendo 1000 MPN/g) sendo detectada nos meses de verão (Cook et al., 2002).

2. Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em surtos de gastroenterites

Incidência na Europa

Em contraste com os países asiáticos, infecções causadas por *V. parahaemolyticus* são raramente relatadas em países europeus. No entanto, surtos esporádicos foram relatados em países como Espanha e França. Oito casos de gastroenterite relacionado com o consumo de peixes e mariscos foram notificados na Espanha em 1989 (Molero et al.,

1989). Um surto de 64 pessoas doentes associadas ao consumo de ostras ocorreu em 1999, na Galícia, Espanha (Lozano-Leo'n et al., 2003). Em 1997 ocorreu um grave surto que afetou 44 pacientes na França. Esse surto foi associado ao consumo de camarões que haviam sido importados da Ásia (Robert-Pillot et al., 2004). Um outro surto envolvendo 80 pessoas entre os convidados presentes em um casamento em um restaurante foi relatado na Espanha em julho de 2004, a investigação constatou que a fonte da contaminação foi a carne de caranguejo processada em condições insalubres (Martinez-Urtaza et al., 2005).

Um grande surto de casos de infecção por *Vibrio parahaemolyticus* associada a frutos do mar ocorreu em Galicia, Espanha, em 18 de agosto de 2012. Foram afetados 100 dos 114 passageiros que viajam em um barco de cruzeiro e o surto foi associado ao consumo de camarão. Todas as nove cepas isoladas de amostras de fezes foram identificados como *V. parahaemolyticus*, sete foram positivas para ambos os marcadores de virulência TDH e TRH, uma única cepa foi positiva para TRH apenas e uma cepa apresentou resultados negativos tanto para TRH quanto TDH. Este é o maior surto de *Vibrio* com origem alimentar relatado na Europa ligado a alimentos de origem marinha internamente processados (Martinez-Urtaza et al., 2016).

2.2. Incidência na Ásia

O local de isolamento e identificação da primeira cepa de *V. parahaemolyticus* foi o Japão. No outono de 1950 nos subúrbios ao sul de Osaka, um surto de gastroenterite aguda acometeu 272 indivíduos, sendo que vinte dessas pessoas acabaram morrendo. Enquanto se acreditava que a fonte da doença era Shirasu, uma pequena sardinha parcialmente seca, o agente etiológico era desconhecido. Uma intensa investigação começou utilizando-se homogenatos filtrados de Shirasu passados através de um modelo suíno de cobaia para eliminar uma possível intoxicação por produtos químicos como causa da doença. Quando os animais de teste desenvolveram peritonite, os homogenatos foram inoculados em diversos meios de cultura. Junto com outros organismos bacterianos já conhecidos, também foram isoladas duas espécies de bastonetes gram-negativos não identificados. Uma vez que estes organismos não poderiam ser separados por estriamento, eles foram inoculados por via intraperitoneal em ratos. Quando os sintomas

da doença se desenvolveram várias horas depois, o líquido da ascite foi recolhido e estriado em ágar-sangue. Um dos organismos foi identificado como *Proteus morgani*. O outro organismo, ainda não classificado, foi nomeado como *Pasteurella parahaemolytica*. Outros testes mostraram que somente este organismo foi patogênico para os ratos e pôde ser isolado a partir de amostras de fezes de indivíduos afetados do surto original. *P. parahaemolytica* foi reclassificada como *Vibrio parahaemolyticus*, quando estudos posteriores demonstraram que sua multiplicação acontece preferencialmente em níveis elevados de salinidade (Broberg et al., 2011).

A partir daí, *V. parahaemolyticus* tem sido reportado como responsável por 20-30% dos casos de gastroenterites no Japão (Alam et al., 2002) e identificado como uma causa comum de doença associado a alimentos de origem marinha em muitos países asiáticos (Wong et al., 2000; Chen et al., 1991; Deepanjali et al., 2005).

V. parahaemolyticus foi a principal causa de gastroenterite alimentar (1.710 surtos, com 24.373 casos) no Japão entre 1996 e 1998 (IDSC, 1999) e foi responsável por 69% (1.028 casos) do total de bactérias causadoras de surtos (1.495 casos) relatados em Taiwan entre 1981 e 2003 (Anon, 2005) e 31,1% de 5.770 surtos ocorridos na China entre 1991 e 2001 (Liu et al., 2004).

2.3. Incidência na América

V. parahaemolyticus foi identificado pela primeira vez como um agente etiológico nos EUA em 1971, após três surtos com 425 casos de gastroenterite associados com o consumo de caranguejos cozidos, que ocorreu em Maryland (Molenda et al., 1972). Desde então, surtos esporádicos de infecções relacionadas com o consumo de mariscos crus ou cozido foram notificados em toda a região do litoral dos EUA. Entre 1973 e 1998, cerca de 40 focos de infecções por *V. parahaemolyticus* foram relatados nos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (DANIELS et al., 2000a). Entre eles, quatro grandes surtos envolvendo mais de 700 casos associadas ao consumo de ostras ocorreu na Costa do Golfo, Pacífico Noroeste e Atlântico Nordeste, entre 1997 e 1998. Em 2004, 14 passageiros a bordo de um navio de cruzeiro em Alasca desenvolveram gastroenterite depois de comer ostras (Mc Laughlin et al., 2005). Dois anos depois, um surto de *V. parahaemolyticus* envolvendo 177 casos ocorreu no verão de 2006 estando ligado a ostras contaminadas colhidas em Washington e British Columbia (CDC 2006). Durante o ano de 2011 o CDC recebeu a notificação de 75 casos de

infecções causadas por *V. parahaemolyticus* em todo o país (CDC 2011). A ocorrência destes surtos indica que a contaminação por *Vibrio parahaemolyticus* em ostras é uma preocupação de segurança nos EUA.

Em meados de janeiro 2005, o número de casos de diarreia aguda causados por *V. parahaemolyticus* tornou-se muito elevado em Puerto Montt, uma grande cidade na região de Los Lagos no Chile. A epidemia, posteriormente, atingiu o pico em fevereiro e, em seguida, diminuiu com casos isolados em março e abril. Um total de 3.725 casos de diarreia aguda foram detectados durante os meses de verão entre janeiro e abril de 2005 em toda a região de Los Lagos. Esta epidemia se espalhou rapidamente para outras áreas urbanas da região de Los Lagos e para o resto do Chile porque esta região é responsável pela produção de 75% dos alimentos de origem marinha consumidos no Chile. Até o final de março de 2005, o número total de casos no Chile foi de 10.783, tornando este o maior registro documentado de casos de gastroenterite causada por *V. parahaemolyticus* no mundo (Cabello et al., 2007).

Já no Peru, quatro cepas pandêmicas de *V. parahaemolyticus* foram isoladas em 1997, duas em Lima e duas em Arequipa. Trinta e cinco cepas pandêmicas foram isoladas em 1998, 31 em Lima e quatro em Trujillo. E outras dez foram isoladas nos anos seguintes: 1999 (4), 2000 (1) e 2002 (5), todos em Lima (Gilet al., 2007).

Em relação ao Brasil, há poucas referências a *V. parahaemolyticus* em infecções intestinais e na colonização de feridas cutâneas. Tem havido uma série de investigações sobre *V. parahaemolyticus* nos ecossistemas marinhos de estuários e em alimentos de origem marinha em diversas áreas do país, no entanto, poucos estudos incluem a avaliação de patogenicidade das cepas isoladas (Leal ET AL. 2008). Como não existe um sistema eficiente de notificação de casos, acredita-se que o número de casos no nosso país seja subestimado. Hoje, o monitoramento de *V. parahaemolyticus* não está incluído no Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), instituído pela Instrução Normativa Interministerial N° 7, de 8 de maio de 2012 do Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012).

3. Fatores de Virulência

Vibrio parahaemolyticus cresce a temperaturas entre 10 e 48°C, com uma temperatura ótima de 35-37°C. Valores de pH entre 5 e 11

suportam o crescimento da bactéria, sendo o intervalo ótimo na faixa de 7,5-8,6. O tempo significativo de geração é de 10-12 min. Condições extremas não são compatíveis com funções fisiológicas ideais, e *V. parahaemolyticus* entra em um estado viável, mas não cultivável. *V. parahaemolyticus* é classificado com base em antígenos O (somático) e K (capsular), sendo que 12 grupos de antígenos O e 65 grupos de antígenos K foram identificados até o momento (Zamora-Pantoja, 2013).

As manifestações clínicas mais comuns causadas por *V. parahaemolyticus* incluem diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos, dor de cabeça, febre e calafrios. O período de incubação varia de 4 a 96 horas, e a dose infectante é de 10^5 a 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC). Os sintomas geralmente são autolimitados e desaparecem após um período de uma semana ou menos, e não é necessário o tratamento com antibióticos (Bates et al., 2004).

3.1. Hemolisina Termoestável Direta (TDH)

Cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* diferenciam-se de cepas ambientais por sua capacidade de produzir uma hemolisina termoestável direta (TDH), uma enzima que pode provocar lise de glóbulos vermelhos em placas de Ágar Sangue Wagatsuma. A atividade hemolítica de TDH, chamada de fenômeno de Kanagawa (KP+), tem sido relatada em associação com cepas isoladas de seres humanos com gastroenterite, mas raramente é observada em isolados ambientais (Yi-Cheng e Chengchu, 2007). O teste de KP é comumente utilizado para identificar cepas patogênicas em alimentos de origem marinha, bem como nas amostras clínicas. A reprodutibilidade do teste de KP é dependente do pH, da salinidade e do tipo de eritrócitos dos meios preparados. Como tal, a identificação de sorovares patogênicos por este método nem sempre é preciso. A identificação do gene *tdh*, que codifica a TDH, em cepas ambientais ou clínicas demonstrou prever com mais precisão a virulência, já que este é um teste genético e não um ensaio fenotípico (Broberg et al., 2011).

A TDH é uma proteína com um tamanho molecular de 46 kDa. Cada peptídeo é composto por 165 aminoácidos e é codificado por duas cópias do gene *tdh*: *tdh1* e *tdh2* (Fabbriet al., 1999). O produto do gene *tdh2* é responsável por mais de 90% da produção de hemolisina em cepas KP+, enquanto que as cepas KP- ou KP+ fracas possuem apenas uma cópia do gene *tdh1*. Portanto, a TDH foi reconhecida como o maior fator de virulência de *V. parahaemolyticus* (Yi-Cheng e Chengchu, 2007).

A atividade biológica do TDH inclui alta atividade hemolítica em rato, coelho e eritrócitos humanos, efeitos cardiotóxicos, acúmulo de líquido ileal em coelho e aumento da permeabilidade vascular na pele de coelho (Heitmannel et al., 2005). A TDH atua como uma porina da membrana plasmática dos eritrócitos e permite a entrada de íons como Ca_2 , Na , e Mn_2 , o que desencadeia uma diarreia secretora. Altas concentrações de TDH tendem a aumentar o número de canais porina, e este, por sua vez, produz entrada excessiva de íons, culminando na morte celular devido ao desequilíbrio osmótico (Raimondi et al., 2000). A estrutura cristalográfica de raios-x da TDH mostrou que esta proteína forma um homotetrâmero com um poro central 23 Å de diâmetro. Este tamanho relativamente grande dos poros ajuda a explicar a baixa seletividade iônica observada, permitindo que a água e os íons fluam através da membrana com pouca impedância (Yanagihara et al., 2010).

Enquanto a TDH é considerada um dos principais fatores de virulência da patogênese causada por *V. parahaemolyticus*, em um experimento em que houve a exclusão dos dois genes relacionados (tdh1 e tdh2) a citotoxicidade em relação a células cultivadas não foi afetada e só mostrou acúmulo parcial de líquido peritoneal em cobaia (Park et al., 2004a). Isso indica a existência de outros fatores de virulência, como os apresentados na tabela 1 (Liverman et al., 2007; Park et al., 2004b).

Tabela 2. Fatores de virulência conhecidos para *V. parahaemolyticus*

Nome	Domínio	Atividade	Função
<i>Adesinas e Toxinas</i>			
TDH	Hemolisina Termossensível Direta	Toxina formadora de poros	Enterotoxicidade e citotoxicidade
TRH	Hemolisina Relacionada a TDH	Toxina formadora de poros	Enterotoxicidade e citotoxicidade
Efetores do T3SS1			
Vops (VP1686)	Domínio fic	Família das AMPylases, Rho e GTPases	Rompimento do citoesqueleto de actina
VP.A0450	Inositol polifosfato 5-Fosfatase	Hidrolisa PI (4,5) P2 a P14P	Rompimento da integridade da membrana celular
Efetores do T3SS2			
VopC (VPA1321)	Fator necrosante citotóxico	Desamina Rac and CDC42 em sua região-2 de troca	Perturba a rede de actina e permite a invasão bacteriana
VopA/P (VPA1346)	Acetiltransferase	Inibidor da sinalização MAPK	Suprime a resposta imune
VopV (VPA1357)	Não conservado	Ligação e agregação de actina	Causa enterotoxicidade e citotoxicidade
VopL (VPA1370)	Domínio WH2	Nucleação da actina	Induz estresse nas fibras de actina

Adaptado de Zhang e Orth, 2013.

3.2. Hemolisina Termoestável Relativa (TRH)

A TRH age de semelhante à TDH, provocando lise celular. Em um estudo recente, TRH e TDH demonstraram causar níveis similares de hemólise *in vitro* e, a análise de cristalografia revelou que a TRH também forma um complexo homotetrâmero (Ohnishi et al., 2011). TRH é geralmente associada a isolados KP- e também pode ser encontrada esporadicamente em infecções de feridas e alguns surtos de intoxicação alimentar (Wong et al., 2000).

Assim como os genes *tdh*, os genes *trh* mostram um único quadro de leitura de 567 pb. Existe uma elevada homologia sequencial 72,5 e 80% entre os genes *trh* e *tdh* e a sequência de aminoácidos de ambas as toxinas é semelhante, com dois resíduos conservados de cisteína. Isto sugere que os genes *trh* e *tdh* provavelmente evoluíram de um ancestral comum (Nishibuchi et al., 1992).

3.3. Sistema de Secreção do Tipo III de *V. parahaemolyticus*

O T3SS é uma organela bacteriana que evoluiu para entregar proteínas, denominada efetores, diretamente para o citoplasma de uma célula eucariótica (Galan e Wolf-Watz, 2006). Composto de 20 a 30 proteínas, o sistema de secreção é constituído por um corpo básico, que abrange ambas as membranas bacterianas, interior e exterior, uma agulha que atua como um condutor entre as células bacteriana e eucariótica, e um complexo de ponta que é inserido na membrana da célula eucariótica (Izore e Job, 2011). Estruturalmente, o sistema tem semelhança a um sistema flagelar do qual ele pode ter evoluído. Algumas proteínas do sistema de secreção têm homologia com proteínas flagelares de exportação e com proteínas transmembranares o que mostra que os genes possuem um núcleo com nível mais elevado de conservação (Cornelis, 2011).

O T3SS permite as bactérias translocar efetores do seu citoplasma diretamente para o citoplasma do hospedeiro, ou para a face citoplasmática da membrana da célula hospedeira, sem libertação de efetores para o espaço extracelular (Cornelis, 2011).

A composição específica de efetores num patógeno determina não só o seu estilo de vida, mas também a doença que provoca. Existem mais de 100 diferentes proteínas efetoras caracterizadas (Cornelis, 2011). Enquanto suas atividades variam, efetores identificados até o momento tendem a manipular um conjunto limitado de sistemas eucarióticos. Alvos comuns de efetores T3SS incluem o citoesqueleto de

actina, sinalização imunológica inata e autofagia. Estes sistemas podem ser regulados para cima ou para baixo dependendo das necessidades específicas do patógeno (Liverman et al., 200; Brudette e Seemann, 2009; Yarbrough et al., 2009).

V. parahaemolyticus RimD 2210633 foi isolado de um paciente com quadro de diarreia que foi mantido na estação de quarentena do aeroporto de Kansai, no Japão. Essa cepa foi identificada como pertencente ao sorotipo O3:K6, que está associado a vários surtos de grande escala em várias regiões do planeta e foi adotada como modelo de estudo de virulência de *V. parahaemolyticus*. O sequenciamento genômico de RimD 2210633 revelou que o seu genoma consiste de dois cromossomos circulares, com um teor de G/C de 45,4% em cada. Foram identificadas 4.832 sequências codificantes. Características gerais do genoma *V. parahaemolyticus* são apresentados na figura 1.

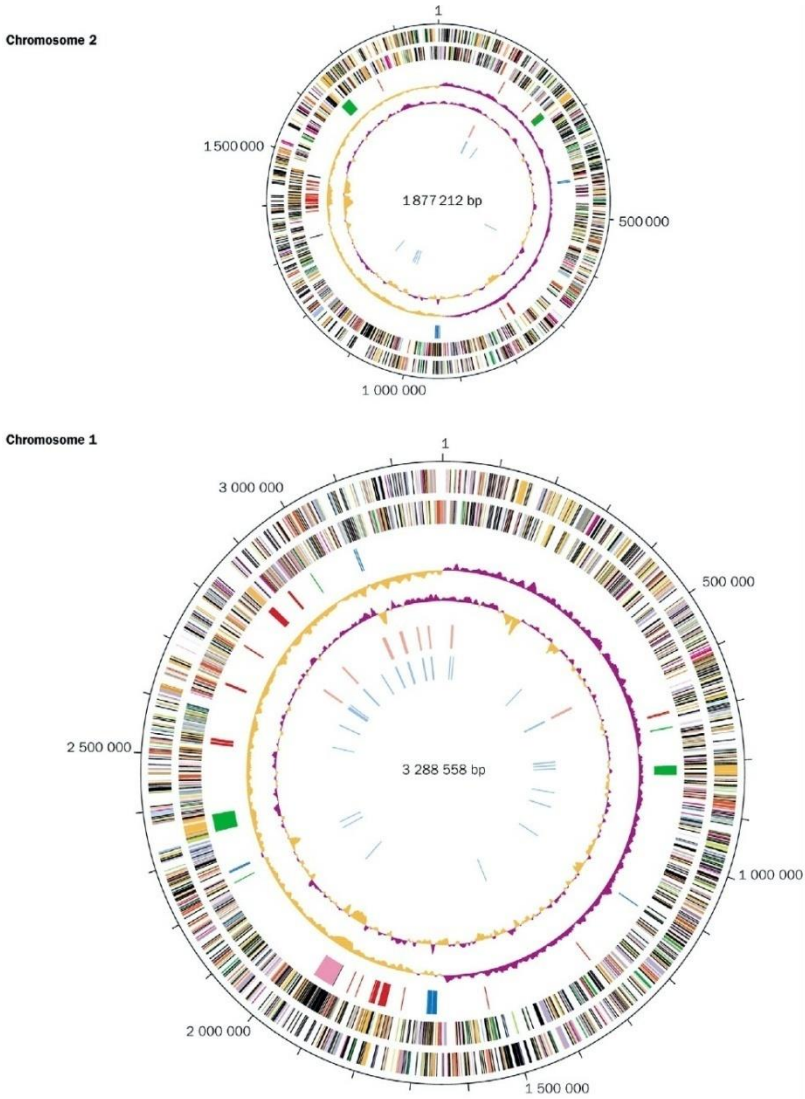
Nestes cromossomos foram encontradas duas ilhas de patogenicidade, uma em cada um dos cromossomos (Makino et al., 2003). Várias cepas de *V. parahaemolyticus* foram criadas a partir da modificação genética de RimD 2210633, para permitir o estudo de cada T3SS e a caracterização dessas proteínas hipotéticas (Tabela 2). Nestas cepas foi estudada a interação entre T3SS1 e T3SS2 e a interação de ambos com TDH. Para isto, em cada cepa, os genes relacionados a um dos sistemas ou o *tdh* foram silenciados (Broberg et al., 2011).

Tabela 3. Cepas de *V. parahaemolyticus* usadas em estudos de efetores derivadas do isolado clínico RimD 2210633.

	TDH	T3SS1	T3SS2
RimD 2210633	+	+	+
POR1	-	+	+
POR2	-	-	+
POR3	-	+	-

Adaptado de Broberg et al., 2011

Figura 1a. Representação do genoma circular de *V. parahaemolyticus*








Adaptado de Makino et al., 2003.

Figura 1b. Legenda para representação do genoma circular de *V. parahaemolyticus* (veja figura 1a)





Primeiro e Segundo círculos

	J (Tradução, biogênese e estrutura ribossomal)
	K (Transcrição)
	L (Replicação, recombinação e reparo do DNA)
	D (Divisão celular, separação cromossomal)
	O (Modificação pós-translacional, conformação de proteínas, chaperonas)
	M (Biogênese de envoltório celular, outras membranas)
	N (Mitilidade celular e secreção)
	P (Transporte e metabolismo de íons inorgânicos)
	T (Mecanismo de transdução de sinais)
	G (Transporte e metabolismo de carboidratos)
	C (Produção e conversão de energia)
	E (Transporte e metabolismo de aminoácidos)
	F (Transporte e metabolismo de nucleotídeos)
	H (Metabolismo de coenzimas)
	I (Metabolismo de lipídeos)
	Q (Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários)
	R (Manutenção de funções gerais)
	S (Função desconhecida)
	Não relacionadas com a COG
	Proteínas hipotéticas ou hipoteticamente conservadas

Terceiro círculo

	Relacionadas a fago
	Adesão, virulência, pili
	Super-integron
	Flagelar
	Sequências de inserção, transposons

Quarto e quinto círculos

	Conteúdo de GC ou linhas superiores a media do genoma
	Sexto e sétimo círculos
	rRNA
	tRNA

4. Métodos de identificação ou quantificação de *Vibrio parahaemolyticus*

4.1. Método do Número Mais Provável (NMP)

O método do número mais provável (MPN) descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) do *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA, 2004) é geralmente utilizado para a enumeração de *V. parahaemolyticus* em alimentos. No entanto, o método de NMP é trabalhoso e demorado. Uma grande desvantagem do método é que o ágar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (TCBS) não pode diferenciar *V. parahaemolyticus* de algumas cepas de *Vibrio vulnificus* ou *Vibrio mimicus*. As colônias de *V. parahaemolyticus*, bem como algumas cepas de *V. vulnificus* e *V. mimicus* que não fermentam sacarose apresentam-se redondas (2-3mm de diâmetro) e verdes ou azul-verdeadas em TCBS. Portanto, várias colônias positivas presuntivas são geralmente formadas numa placa de TCBS e precisam ser analisadas com testes bioquímicos longos para confirmação e os resultados podem não estar disponíveis antes de 5 dias. Em adição ao método de NMP, um método dependente de cultivo da Organização Internacional de Normalização (ISO) também é amplamente utilizado para a detecção de *V. parahaemolyticus* especialmente em países europeus (ISO/TS 21872-1, 2007). No método da norma ISO, as amostras de ensaio são incubadas em dois meios de enriquecimento (caldo de polimixina B e água peptonada salina alcalina ou glicose dodecilsulfato de sódio) a 35°C por 7-8 h (18 h para produtos congelados). As amostras enriquecidas são então semeadas em dois meios seletivos, TCBS e ágar triptona de soja trifeniltetrazólio (TSAT) e incubadas a 35-37° C durante 18h (TCBS) e 20-24 h (TSAT). As colônias que são lisas, verde e com 2-3mm de diâmetro em TCBS ou são planas, vermelho escuro e com 2-3mm de diâmetro em TSAT são considerados colônias características e necessitam ser confirmadas por meio de testes bioquímicos. A incubação deve ser prorrogada até 24 h para TCBS e 48 h para TSAT se ocorre um desenvolvimento lento das colônias no meio.

Para facilitar a identificação dos isolados suspeitos, vários kits comerciais de testes bioquímicos, como Api 20E[®] e Api NE[®] (BioMérieux), RapID[™] System NF PLUS (Remel Inc.), e BBL[™] Crystal[™] EntericNonfermenter kit (Becton, Dickinson and Company), estão disponíveis para a rápida identificação de membros da família *Enterobacteriaceae*. Estes kits são bastante fáceis de utilizar e podem

identificar *V. parahaemolyticus* em 4 h (Api NE e RapID™ NF PLUS), 18 h (BBL™ Crystal) e 1-2 dias (Api 20E). Além disso, um certo número de sistemas automatizados de identificação bacteriana como VITEK® 2 (BioMérieux) e OmniLog® (Biolog) ou o sistema semiautomatizado como MicroStation® (Biolog) tem sido desenvolvido para identificar membros da família *Enterobacteriaceae*. Estes sistemas, totalmente ou semiautomatizado fornecem uma melhor eficiência do fluxo de trabalho no laboratório e aumentam a precisão dos relatórios. No entanto, o investimento inicial desses equipamentos pode variar desde US\$ 30.000 a US\$ 150.000 dependendo da capacidade e dos acessórios incluídos em um sistema.

4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Tecnologias moleculares baseiam-se principalmente na amplificação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) através da reação em cadeia da polimerase (PCR), e podem ser utilizadas para complementar ou substituir as abordagens baseadas em métodos culturais. A detecção de agentes patogênicos usando a PCR é considerada um método sensível para ser aplicado em amostras ambientais e produtos alimentares (Thompson et al., 2005). Vários estudos têm sido realizados baseando-se em ensaios de detecção de um único gene alvo, fornecendo informações sobre a presença de virulência e genes regulatórios. Os ensaios de Multiplex PCR (m-PCR), que permitem a detecção simultânea de múltiplos alvos num único ensaio, foram aplicadas com sucesso para detectar rapidamente diferentes patógenos bacterianos em água do mar e moluscos como os ensaios de m-PCR desenvolvidos para a detecção de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* em moluscos bivalves (Gugliandolo, 2010).

Para superar as desvantagens do método de NMP para detecção de *V. parahaemolyticus*, reações de PCR utilizando iniciadores de DNA direcionados para os genes *tdh* e *trh*, que codificam as hemolisinas termoestáveis direta e relatada (TDH e TRH), respectivamente, foram desenvolvidas para detecção de cepas virulentas de *V. parahaemolyticus*. Tada et al., (1992) desenvolveram um procedimento de PCR para detecção específica de *tdh* e *trh* e relataram que o procedimento foi capaz de detectar de 400 fg de DNA. No entanto, este ensaio não pode ser usado para detectar cepas ambientais de *V. parahaemolyticus* que não carregam os genes *tdh* ou *trh*, e sua sensibilidade foi reduzido por inibidores presentes nas amostras fecais

de indivíduos normais. Os autores sugerem que se faça um enriquecimento das amostras em água peptonada alcalina por 4 h antes de qualquer protocolo de extração de DNA ao analisarem-se amostras de fezes.

A identificação de um gene único (tlh) que codifica para uma hemolisina termolábil (TLH) em *V. parahaemolyticus* permitiu o desenvolvimento de um protocolo de m-PCR para a detecção simultânea de cepas de *V. parahaemolyticus* total e virulentas. Embora, a TLH não seja considerada um fator de virulência de *V. parahaemolyticus*, o gene tlh foi relatado como um marcador confiável para essa espécie. Bej et al., (1999) relataram um protocolo de m-PCR para amplificação de tlh, tdh e trh, que pode ser utilizado para detecção de *V. parahaemolyticus* total e virulenta em alimentos de origem marinha. Este m-PCR detecta o gene tlh em todas as 111 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de alimentos de origem marinha, ambientais, plantas de processamento de ostras e isolados clínicos com uma sensibilidade para a detecção de todos os três genes de pelo menos 1-10 células por grama de homogeneizado da amostra enriquecido em água peptonada alcalina (8 h). Esse protocolo é atualmente recomendado pelo BAM (FDA, 2004), como método alternativo para confirmação dos isolados suspeitos.

Embora os métodos de PCR tenham sido desenvolvidos para detecção específica de *Vibrio parahaemolyticus*, eles estão limitados à determinação qualitativa do organismo a menos que eles sejam usados em conjunção com o método NMP.

4.3. PCR quantitativo (q-PCR)

Nas últimas duas décadas, as abordagens moleculares independentes de técnicas de cultivo foram submetidas a um desenvolvimento considerável em ecologia microbiana. Técnicas que permitem análises de comunidades microbianas totais têm melhorado muito a nossa compreensão da sua composição, dinâmica e atividade (Wilmes e Bond, 2009; Zoetendal et al., 2008). Há alguns anos, um sistema baseado em PCR quantitativo (q-PCR) com amplificação de sequências específicas foi desenvolvido para quantificar rapidamente bactérias intestinais humanas (sistema de propriedade de Yif -Scan, Yakult Honsha Co, Ltda). Em microbiologia de alimentos, uma das primeiras aplicações de métodos moleculares independentes de cultura para uma matriz de alimento fermentado foi descrita em 1999 (Ampe et al., 1999). Desde então, métodos baseados em PCR, em particular q-PCR,

são utilizados predominantemente para detectar, identificar e quantificar tanto patógenos ou populações benéficas tais como micro-organismos fermentadores ou probióticos (LeDréan et al., 2010; Malorny et al., 2008).

No entanto, em comparação com microbiologia ambiental, a utilização de ferramentas moleculares aplicadas para o estudo da dinâmica e da expressão de genes da população em alimentos iniciou-se a poucos anos e ainda está em desenvolvimento (Postollec et al., 2011).

Wang e Levin (2004) desenvolveram um procedimento de PCR, realizado em termociclador convencional, para determinação quantitativa de *V. parahaemolyticus* total através da análise da intensidade de fluorescência dos produtos de PCR no gel de agarose. Ao comparar a intensidade de fluorescência do DNA alvo (tlh) contra o número de células de *V. parahaemolyticus* nas amostras, os autores relataram uma relação linear entre a intensidade de fluorescência do DNA e o valor em log das populações bacterianas.

Os avanços recentes na tecnologia de PCR levaram ao desenvolvimento do PCR em tempo real para a determinação rápida e quantitativa de *V. parahaemolyticus* em amostras de alimentos. Kaufman et al. (2004) desenvolveram um ensaio de q-PCR, visando o gene tlh para enumeração de *V. parahaemolyticus* total. Segundo os autores, o protocolo pode ser utilizado para quantificar *V. parahaemolyticus* em tecidos de ostras e fluidos do manto interno em um tempo de até 1 h após amostragem.

Garrido et al., (2012) desenvolveram um método de q-PCR para quantificação de *V. parahaemolyticus* total e patogênico em amostras de água e alimentos de origem marinha. Esse método baseou-se na detecção dos genes tlh para quantificação total e, dos genes tdh e trh para quantificação de cepas patogênicas. Segundo os autores o método é uma alternativa rápida e fácil que pode substituir com segurança os métodos culturais clássicos.

5. Referências

AMPE, F.; BEN, O.N.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J.P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrate stheneed for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Appl. Environ. Microbiol.** v.65, p.5464-5473, 1999.

BATES, T.C.; OLIVER, J.D. The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. **J Microbiol**, v.42, p.74–79, 2004.

BURDETTE, D.L.; SEEMANN, J.; ORTH, K. *Vibrio* VopQ induces PI3-kinase independent autophagy and antagonizes phagocytosis. **Mol. Microbiol.**, v.73, p.639-649, 2009.

CABELLO, F.C.; ESPEJO, R.; HERNANDEZ, M.C.; RIOSECO, M.R.; ULLOA, J.; VERGARA, J.A. *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. **Emerg Infect Dis**. 2007.

CORNELIS, G.R. The type III secretion injectisome. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.4, p.811-825, 2006.

FABBRI, A.; FALZANO, L.; FRANK, C.; DONELLI, G.; MATARRESE, P.; RAIMONDI, F. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct haemolysin modulates cytoskeleton organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. **Infect Immun**, v.67, p1139–1148, 1999.

GALAN, J.E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v.444, p 567-573, 2006.

GARRIDO, A.; CHAPELA, M.; FERREIRA, M.; ATANASSOVA, M.; FAJARDO, P.; LAGO, J.; CABADO, A.G. Development of a multiplex real-time PCR method for pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* detection (tdh+ and trh+). **Food Control**, v. 24(1-2), p 128-135, 2012.

GIL, A.I.; MIRANDA, H.; LANATA, C.F.; PRADA, A.; HALL, E.R.; BARRENO, C.M.; BUSRIN, S.; BHUIYAN, N.A.; SACK, D.A.; NAIR, G.B. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. **Int J Infect Dis**, v. 11, p 324-328, 2007.

HEITMANN, I.; JOFRE, L.; HORMAZABAL, J.C.; OLEA, A.; VALLEBUONA, C.; VALDES, C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Rev Chilena Infectol**, v. 22, p 131-140, 2005.

ISO. 2007. Microbiology of food and animal feed ingredients-horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.-Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*, v. 21872-1, First ed. 19.

IZORE, T.; JOB, V.; DESSEN, A. Biogenesis, regulation, and targeting of type III secretion system. **Structure**, v. 19, p 603-612, 2011.

KAUFMAN, G.E.; BOWEN, M.D.; MEYER, R.F.; DEPAOLA, A.; BOWERS, J.; BLACKSTONE, G.M.; VICKERY, M.C.L.; BEJ, A.K. Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix. **J Food Prot**, v. 67, p 2424-2429, 2004.

LE DRÉAN, G.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V.; ARZUR, D.; HABRYLO, O.; BARBIER, G. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **Int J Food Microbiol**, 138, 100e107, 2010.

LEAL, N.C.; DA SILVA, S.C.; CAVALCANTI, V.O.; FIGUEIROA, Â.C.T.; NUNES, V.V.F.; MIRALLES, I.S.; HOFER, E. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. **J Appl Microbiol**, v.105, p 691-697, 2008.

LIVERMAN, A.D.; CHENG, H.C.; TROSKY, J.E.; LEUNG, D.W.; YARBROUGH, M.L.; BURDETTE, D.L.; ROSEN, M.K.; ORTH, K. Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL, Proc. **Natl Acad Sci**, v. 104, p 17117-17122, 2007.

MAKINO, K.; OSHIMA, K.; KUROKAWA, K.; YOKOYAMA, K.; UDA, T.; TAGOMORI, K.; IJIMA, Y.; NAJIMA, M.; NAKANO, M.; YAMASHITA, A.; KUBOTA, Y.; KIMURA, S.; YASUNAGA, T.; HONDA, T.; SHINAGAWA, H.; HATTORI, M.; IIDA, T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. **Lancet**, v. 361, p 743e749, 2003.

MALORNY, B.; LOFSTROM, C.; WAGNER, M.; KRAMER, N.; HOORFAR, J. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, p 1299-1304, 2008.

MARTINEZ-URTAZA, J.; HUAPAVA, B.; GAVILAN, R.G.; BLANCO-ABAD, V.; ANSEDE-BERMEJO, J.; CADARSO-SUAREZ, C.; FIGUEIRAS, A.; TRINANES, J. Emergence of asiatic *Vibrio* diseases in south America in phase with El Niño. **Epidemiology**, v. 19, p 829-837, 2008.

MARTINEZ-URTAZA, J., POWELL, A., JANSA, J., REY, J. L. C., MONTERO, O. P., CAMPELLO, M. G., BAKER-AUSTIN, C. Epidemiological investigation of a foodborne outbreak in Spain associated with U.S. west coast genotypes of *Vibrio parahaemolyticus*. **SpringerPlus**, 5(1), 1-8, 2016. doi:10.1186/s40064-016-1728-1

NISHIBUCHI, M.; FASANO, A.; RUSSELL, R.G.; KAPER, J.B. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct haemolysin. **Infect Immun**, v. 60, p 3539-3545, 1992.

OHNISHI, K.; NAKAHIRA, K.; UNZAI, S.; MAYANAGI, K.; HASHIMOTO, H.; SHIRAKI, K.; HONDA, T. Y. Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 318, p 10-17, 2011.

PARK, K.S.; ONO, T.; ROKUDA, M.; JANG, M.H.; IIDA, T.; HONDA, T. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiol Immunol**, v. 48, p 313-318, 2004.

PARK, K.S.; ONO, T.; ROKUDA, M.; JANG, M.H.; OKADA, K.; IIDA, T.; HONDA, T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. **Infect Immun**, v. 72, p 6659-6665, 2004.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiol**, v. 28(5), p 848-861, 2011.

RAIMONDI, F.; KAO, J.P.; FIORENTINI, C.; FABBRI, A.; DONELLI, G.; GASPARINI, N. Enterotoxigenicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct haemolysin in in vitro systems. **Infect Immun**, v. 68, p 3180-3185, 2000.

RAMOS, R.J.; MIOTTO, L.A.; MIOTTO, M; SILVEIRA JUNIOR, N.; CIROLINI, A.; SILVA, H.S.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, C.R.W. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, p. 327-333, 2014.

TADA, J.; OHASHI, T.; NISHIMURA, N.; SHIRASAKI, Y.; OZAKI, H.; FUKUSHIMA, S.; TAKANO, J.; NISHIBUCHI, M.; TAKEDA, Y. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (tdh) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. **Mol Cell Sondas**, v. 6, 477-487, 1992.

THOMPSON, J.R.; MARCELINO, L.A.; POLZ, M.F. Diversity, sources and detection of human bacterial pathogens in the marine environment. In: Belkin, S. and Colwell, R.R. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. ed. New York: Springer, 2005. p. 29-68.

WANG, S.; LEVIN, R.E. Quantitative determination of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. **Food Biotechnol**, v. 18, p 279-287, 2004.

WILMES, P.; BOND, P.L. Microbial community proteomics: elucidating the catalysts and metabolic mechanisms that drive the Earth's biogeochemical cycles. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, p 310-317, 2009.

WONG, H.C.; LIU, S.H.; KU, L.W.; LEE, I.Y.; WANG, T.K.; LEE, Y.S. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from food borne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. **J Food Prot**, v. 63, p 900-906, 2000.

YANAGIHARA, I.; NAKAHIRA, K.; YAMANE, T.; KAIEDA, S.; MAYANAGI, K.; HAMADA, D.; FUKUI, T.; OHNISHI, K.; KAJIYAMA, S.; SHIMIZU, T.; SATO, M.; IKEGAMI, T.; IKEGUCHI, M.; HONDA, T.; HASHIMOTO, H. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin, **J Biol Chem**, v. 285, p 16267-16274, 2010.

YARBROUGH, M.L.; LI, Y.; KINCH, L.N.; GRISHIN, N.V.; BALL, H.L.; ORTH, K. AMPylation of RhoGTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. **Science**, v. 323, p 269-272, 2009.

ZHANG, L.; ORTH, K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 16(1), p 70-77, 2013.

ZOETENDAL, E.G.; RAJILIC-STOJANOVIC, M.; DE VOS, W.M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**, v. 57, p 1605-1615, 2008.

**CAPÍTULO II: Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters
(*Crassostrea gigas*) and mussels (*Perna perna*) of the seacoast of
Santa Catarina, Brazil**

1. Introduction

Seafood is recognized as a nutritious food choice, and is liked by increasing numbers of consumers worldwide (Hellberg, DeWitt, & Morrissey, 2012). For the last two decades, there has been a fourfold growth in commercial aquaculture worldwide (Cabello, 2006). In Brazil, the production of bivalve shellfishes occurs mainly in the state of Santa Catarina, in the southern region of Brazil, due to the excellent geographical conditions of this area for the cultivation of marine organisms, such as the presence of a large number of bays, which facilitates the establishment of marine farms (Coelho et al, 2003; Correa et al, 2007).

Despite the increase, the main obstacles in the consumption of seafood they are its high perishability and risk to health due to contamination by pathogens (Reyhana & Kutty, 2014). In addition to the indicators of faecal contamination, which are used to assess the microbiological quality of bivalve molluscs in Brazil, different species of the *Vibrio* genus occur naturally in marine, coastal and estuary environments, being that some species such as *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* are potentially pathogenic for men, and may be present in fishes and raw shellfishes or partially subjected to cooking (Thompson et al, 2004). The possibility of seafood consumers to be infected by pathogenic vibrios by eating oysters depends on the microbiological quality of the marine habitat, as well as on the practices of handling and processing of these shellfish (Vieira et al, 2011). The occurrence of these bacteria is not related to the counts of *Escherichia coli* or thermotolerant coliforms, therefore the specific constant monitoring is required. (Pereira, 2002; Oliver 2006; Suffredini et al., 2014).

Infections caused by *Vibrio parahaemolyticus* have been reported in several countries in Asia (Chiou et al., 2000; Chowdhury et al., 2013; Kubota et al., 2008; Ma et al., 2014; Okuda et al., 1997; Tuyet et al., 2002; Vuddhakul et al., 2006), United States (Haendiges et al., 2014; Sims et al., 2011), in Europe only a few outbreaks or sporadic cases were reported in the last decade as a consequence of the consumption of local or imported seafood (Martinez-Urtaza et al., 2005; Ottaviani et al., 2008, 2010b, 2012; Quilici et al., 2005; Sala et al., 2009), and some South American countries like Chile (Fuenzalida et al., 2006; Cabello et al., 2007; Harth et al., 2009), Peru (Gil et al., 2007; Martinez-Urtaza et al., 2008) and Brazil (Leal et al., 2008) have also reported outbreaks.

Pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus* can be differentiated from non-pathogenic strains from its ability to produce thermostable hemolysin (TDH), which production is called as the Kanagawa phenomenon. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* is associated with the presence of the *tdh* and *trh* gene in oysters (Nishibuchi; Kaper, 1995).

The concentration of *Vibrio parahaemolyticus*, in oysters and mussels is directly related to water temperature, with a higher concentration being present when the bivalve molluscs are in warm water. Because of this, these microorganisms are rarely isolated when the water temperature is below 15 ° C. (Pruzzo et al, 2005; Su e Liu, 2007). In Brazil, the temperature of sea waters is above 20 ° C in most of the year, favouring the occurrence of these microorganisms in the different stations.

This research aimed to identify and quantify *Vibrio parahaemolyticus* in fresh oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels coming from different regions of cultivation of bivalve shellfishes in the seacoast of Santa Catarina, Brazil.

2. Material and methods

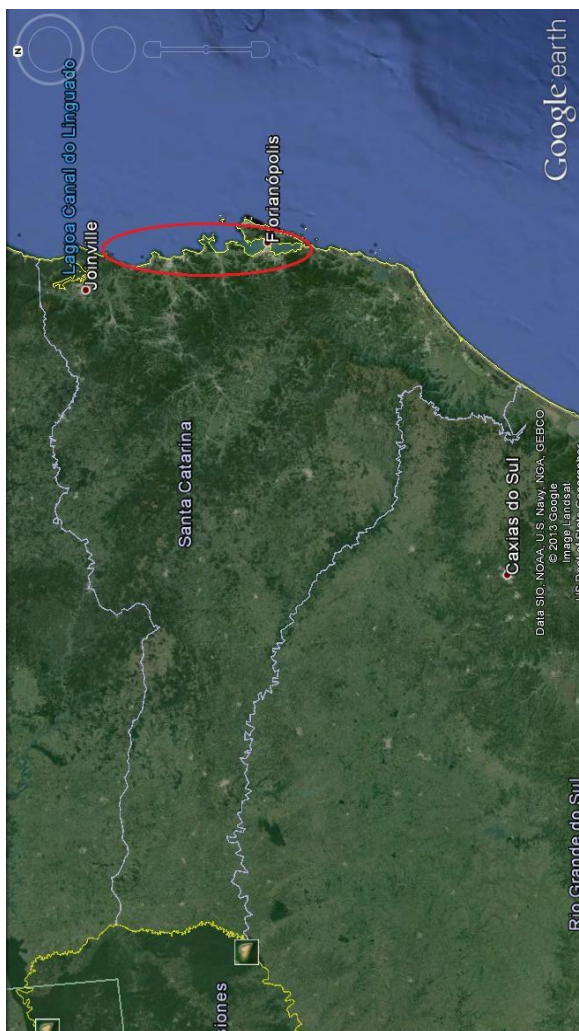
2.1. Collection and Preparation of the samples

Between October of 2012 and December of 2013, there were collected 130 oysters samples (*Crassostrea gigas*), 215 mussels samples (*Perna perna*) and 222 seawater samples directly from three geographical regions in Santa Catarina where is the shellfish farming , Brazil (Figure 2).

Each oysters and mussels sample consisted of 12 units. The oysters and mussels were transported to the laboratory in an isothermal box with packaged potable ice, and analyzed within 6 hours of sampling.

The oysters and mussels were scrubbed under tap water to remove debris, allowed to dry, disinfected with 70% ethanol, and opened aseptically using a sterilized knife. The flesh and intervalve liquid were aseptically transferred to sterile bags and were homogenized for 1 min, forming the pool of 12 units.

Figura 2. The coastal region which is the cultivation of bivalve molluscs in the Santa Catarina



2.2. Isolation and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and mussels samples

Enumeration of *V. parahaemolyticus* was performed using Most Probable Number (MPN) technique (Kaysner and DePaola, 2004).

Approximately 25 g of the homogenate was added to 225 ml of phosphate buffered saline (PBS). Serial 10-fold dilutions were prepared up to 1:106 and three aliquots of each dilution were inoculated into alkaline peptone water tubes and incubated overnight at 37 °C. After incubation, a loopful from the top 1 cm, approximately, of each broth tube with turbid growth was streaked onto thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar plates (Oxoid, UK) and incubated at 37 °C for 24 h. Five to

ten typical colonies from each plate were selected and isolated for identification. Sucrose-negative (blue-green on TCBS agar) colonies were submitted to confirmation as Gram-negative and oxidase-positive. Further biochemical differentiation for identification and confirmation of isolated items were performed using the API 20E system (bioMérieux, France). Total populations of *V. parahaemolyticus* in oysters and mussels were determined by converting numbers of APW tubes that were positive for *V. parahaemolyticus* to MPN g⁻¹ using the MPN table.

All strains of *V. parahaemolyticus* were confirmed genotypically through the detection of the *tlh* gene by multiplex qPCR.

2.3. Multiplex PCR for the detection of *rox*, *tdh* and *trh* genes.

The extraction of bacterial DNA was made in QiaCube equipment (Qiagen) using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) with specific protocol for the equipment. Real time multiplex PCR was performed using the kit *Vibrio parahaemolyticus* multiplex kit (Biotecon). The target genes were the *Rox* to confirm the species, and *tdh* and *trh* genes of pathogenicity. The protocol used was indicated in the kit manual.

2.4. Statistical analysis

Results of microbiological tests were transformed into log values and were assumed to be normally distributed; statistical analyses were performed in the Statistica 7.0[®] software (Stat-Soft, Inc., USA). To facilitate statistical analyses of quantitative data obtained by most probable number for counts *V. parahaemolyticus* when levels were below the limit of detection was substituted for 2 MPN g⁻¹ and. A test of significance of observed differences in *V. parahaemolyticus* levels, environmental parameters in oysters and mussels across the 22 samplings sites was conducted using a one-way analysis of variance

(ANOVA), an alpha level of 0.05 was considered using the minimum level for statistical significance.

3. Results and Discussion

The occurrence of *V. parahaemolyticus* in oysters and mussels was low, 10,76% and 11,62% of samples tested (Table 1). Higher incidences of *V. parahaemolyticus* were observed in seawater, 18, %.

Tabela 4. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster, mussels and seawater samples.

Sample	Season	Number of samples tested	Number of positive samples (%)	Level of <i>V. parahaemolyticus</i> (MPN/g)		
				< 100	10^2-10^3	10^3-10^4
Oyster	summer	50	10 (20%)		6	4
Oyster	autumn	25	1 (4%)	1		
Oyster	winter	25	ND			
Oyster	spring	30	3 (10%)	2	1	
Mussel	summer	120	21 (17,5%)	4	8	9
Mussel	autumn	25	1(4%)	1		
Mussel	winter	25	ND			
Mussel	spring	45	3 (6,6%)	2	1	
Seawater	summer	120	37 (30,8%)	10	18	9
Seawater	autumn	30	9(30%)	9		
Seawater	winter	30	2(6,6%)	2		
Seawater	spring	42	12 (28,5)	10	2	

ND: Not detected

The densities of *V. parahaemolyticus* in oyster, mussels and seawater samples are listed in Table 1. They were higher in the summer months, especially in february and march. The density of *V. parahaemolyticus* in summer (December to March) was significantly greater than those in the other 3 seasons ($P < 0.01$). The occurrence of pathogenic *V. parahaemolyticus* in oyster, mussels and seawater was very low ($<10\%$). Only 4 of 130 oysters, 5 of 215 and 5 of 220 seawater samples contained detectable levels of pathogenic strains. These results indicated that most *V. parahaemolyticus* in the environment were nonpathogenic to humans. Although the levels of *V. parahaemolyticus* in oysters reported in this study were much lower, postharvest processing conditions and storage temperatures could allow contaminated *V. parahaemolyticus* to multiply to a higher level in market oysters. Studies have shown that the populations of *V. parahaemolyticus* in unrefrigerated oysters could increase rapidly to reach 50-fold to 790-fold its original level within 24 h after harvest if oysters were exposed to an elevated temperature (Gooch et al. , 2002).

Epidemiological data from CDC on association of *V. parahaemolyticus* gastroenteritis with tdh-carrying strains in the period 2001–2004 and US risk assessment studies on oysters (FDA, 2005), support the assumption that *V. parahaemolyticus* risk is proportional to exposure to different levels of pathogenic *V. parahaemolyticus* (WHO, 2011). According to some studies, pathogenic *V. parahaemolyticus* levels may be reliably estimated from total *V. parahaemolyticus* levels (Miwa et al., 2003; Nordstrom et al., 2007). On the other side, other studies showed that the ratio between total and pathogenic *V. parahaemolyticus* in the environment may be quite variable over time, as in the case of the monitoring performed in Alaskan waters, where percentage of potentially pathogenic strains in two consecutive summers (2004 and 2005) changed from 74% to 30% (WHO, 2011). Such variability, together with the limited number of quantitative data on *V. parahaemolyticus* levels in the environment and in shellfish harvested in regions as Europe (Cantet et al., 2013), Asia (Deepanjali et al., 2005), South America (Garcia et al., 2009), which are occasionally involved in outbreaks, underline the need for analytical assays which allow the enumeration of both total and potentially pathogenic (tdh and/or trh positive) *V. parahaemolyticus* strains.

Trouble variables for the presence of *V. parahaemolyticus* in seafood have been shown in studies by many researchers around the world, using conventional bacteriological methods. The results found in this study are in agreement with the results reported by Nordstrom et al. (2007), a

study conducted in Alaska (USA), Cabello et al. (2007) in Chile, Gil et al. (2006) in Peru, and Porteen Pramanik (2007), India.

Higher incidence of *V. parahaemolyticus*, however, was found using conventional methods of wild mullet in Italy (Serracca et al., 2011), cockles in Indonesia (Zulkifli et al., 2009), various seafood in India (Chakraborty et al., 2008) and in the USA mussels (Lu et al., 2006). Furthermore, the lower incidence of 8% (Hassan et al., 2012), were reported in the Netherlands seafood.

Ramos et al. (2014) found an incidence of *V. parahaemolyticus* 30.0% in samples of oysters and 33.3% in water samples from cultivation sites in Bahia Sul in Florianopolis, this area, this between the study region of this work.

Several factors are involved in the distribution and survival of microorganisms in estuarine ecosystems such as biotic and abiotic parameters of water, such as temperature, salinity, pH and turbidity (Ristori et al., 2007; Strom and Paranjpye, 2000). The concentration of *V. parahaemolyticus* in seawater increases with increasing temperature and is correlated with the seasonal increase in the occurrence of sporadic cases of infections in months with higher temperature (Hlady and Klontz 1996).

The presence of *V. parahaemolyticus* seems to be constant where the sea water temperature is $>10^{\circ}\text{C}$, unlike what occurs in Europe, where isolation of this pathogen decreases during the winter months (Baker-Austin et al., 2013). Hence, *V. parahaemolyticus* can be considered ubiquitous in the marine environment. The World Health Organization (WHO, 2011) listed the optimum temperature for *V. parahaemolyticus* growth as 37°C , with a wide growth range of $5\text{--}43^{\circ}\text{C}$. Several studies have shown a positive correlation between contamination of raw shellfish by *V. parahaemolyticus* and water temperature with higher frequencies being detected during warmer months in spring and summer seasons than in winter (DePaola et al., 2003; Parveen et al., 2008; Johnson et al., 2012; Ceccarelli et al., 2013).

The data provided in this study on contamination levels of total and potentially pathogenic *V. parahaemolyticus* and seasonal distribution, will help in defining appropriate monitoring programs and post-harvest policies for this hazard. The acquisition of further quantitative information on *V. parahaemolyticus* distribution in production areas and marketed products (exposure assessment), together with studies on the effectiveness of post-harvest treatments, will help in the definition of codes of practice for vibrios in shellfish and improve the safety of products.

4. Conclusion

In conclusion, these results demonstrate greater seasonal variations in total and pathogenic *V. parahaemolyticus* densities in oysters. Hence, there may be more uncertainty in the use of densities of total *V. parahaemolyticus* organisms as alternate for risk predictions as was previously recognized. Our findings can provide a reference for the comprehensive management and control of the harvesting areas. Therefore, we recommend that control measures should be considered, including the establishment of an intensive and continuous monitoring of potentially pathogenic *V. parahaemolyticus* from all oyster-growing areas, the environmental parameters, and the assessment of the region-specific human health risk due to consumption of oyster. Thus, more research is needed to assess differences in virulence among various toxigenic strains and to assess and manage the risk of illness due to human exposure to oysters harvested in contaminated environments under the light of the climate change.

5. References

BAKER-AUSTIN, C.; TRINANES, J.A.; TAYLOR, N.G.H.; HARTNELL, R.; SIITONEN, A.; et al. 2013. Emerging Vibrio risk at high latitudes in response to ocean warming. **Nat. Clim. Chang.** 3: 73–77. doi: 10.1038/nclimate1628

CABELLO, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environ Microbiol**, 8(7), 1137e1144. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x

CABELLO, F.C.; ESPEJO, R.; HERNANDEZ, M.C.; RIOSECO, M.R.; ULLOA, J.; VERGARA, J.A. 2007. Vibrio parahaemolyticus O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. **Emerg Infect Dis.** 13(4): 655–656. doi: 10.3201/eid1304.06-1152

CANTET, F.; HERVIO-HEATH, D.; CARO, A.; LE MENNEC, C.; MONTEIL, C.; QUEMERE, C.; JOLIVET-GOUGEON, A.; COLWELL, R.R.; MONFORT, P., 2013. Quantification of Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus and Vibrio cholerae in French

Mediterranean coastal lagoons. **Res. Microbiol.** 164, 867–874. doi:10.1016/j.resmic.2013.06.005

CECCARELLI D.; HASAN N. A.; HUG A.; COLWELL R. R. 2013. Distribution, and dynamics of epidemic, and pandemic *Vibrio*. (parahaemolyticus) virulence factors. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 3:97. doi: 10.3389/fcimb.2013.00097

CHAKRABORTY, R.D.; SURENDRAN, P.K.; JOSEPH, T.C. 2008. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from seafoods along the southwest coast of India. **World J Microb Biot**, v. 24(10), 2045-2054. doi: 10.1007/s11274-008-9708-4

CHIOU, C.S.; HSU, S.-Y.; CHIU, S.I.; WANG, T.K.; CHAO, C.S., 2000. *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.** 38, 4621–4625. doi: 0095-1137/00/\$04.0010

CHOWDHURY, G.; GHOSH, S.; PAZHANI, G.P.; PAUL, B.K.; MAJI, D.; MUKHOPADHYAY, A.K.; RAMAMURTHY, T. 2013. Isolation and characterization of pandemic and nonpandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak of diarrhea in North 24 Parganas, West Bengal. India. **Foodborne Pathog. Dis.** 10, 338–342. doi:10.1089/fpd.2012.1340

COELHO, C., HEINERT, A.P., SIMÕES, C.M., BARARDI, C.R. 2003. A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Food Protct.** 66:507-511.

CORRÊA, A.A., ALBARNAZ, J.D., MORESCO, V., POLI, C.R., TEIXEIRA, A.L., SIMÕES, C.M. 2007. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Mar Environ Res.** 63:479-489. doi:10.1016/j.marenvres.2006.12.002

DEEPANJALI, A., KUMAR, H.S., KARUNASAGAR, I., 2005. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of

India. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 3575–3580. doi: 10.1128/AEM.71.7.3575-3580.2005

DEPAOLA, A., NORDSTROM, J.L., BOWERS, J.C., WELLS, J.G., COOK, D.W., 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 1521–1526. doi: 10.1128/AEM.69.3.1521-1526.2003

EPAGRI. 2008. **Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhão, ostras e vieiras) no Estado de Santa Catarina em 2014.** Available at <http://www.epagri.sc.gov.br/>. Accessed october 2015.

FDA, 2005. **Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters.** U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration.

FUENZALIDA, L., HERNANDEZ, C., TORO, J., RIOSECO, M.L., ROMERO, J., ESPEJO, R.T., 2006. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. **Environ. Microbiol.** 8, 675–683. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00946.x

GARCIA, K., TORRES, R., URIBE, P., HERNANDEZ, C., RIOSECO, M.L., ROMERO, J., ESPEJO, R.T., 2009. Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile. **Appl. Environ. Microbiol.** 75, 7482–7487. doi:10.1128/AEM.01662-09

GIL, A.I., MIRANDA, H., LANATA, C.F., PRADA, A., HALL, E.R., BARRENO, C.M., NUSRIN, S., BHUIYAN, N.A., SACK, D.A., NAIR, G.B., 2007. O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. **Int. J. Infect. Dis.** 11, 324–328. doi:10.1016/j.ijid.2006.08.003

GOOCH, J.A., DEPAOLA, A., BOWERS, J., MARSHALL, D.L., 2002. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. **J. Food Prot.** 65, 970–974.

HAENDIGES, J., ROCK, M., MYERS, R.A., BROWN, E.W., EVANS, P., GONZALEZ-ESCALONA, N., 2014. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus*, Maryland, USA, 2012. **Emerg. Infect. Dis.** 20, 718–720. doi: 10.3201/eid2004.130818

HARTH, E., MATSUDA, L., HERNÁNDEZ, C. et al. 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks, Southern Chile. **Emerg Infect Dis.** 15(2):163-168. doi:10.3201/eid1502.071269.

HASSAN, Z.H., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M., DE BOER, E. 2012. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in retailed seafood in the netherlands. **Food Res Int.** 19(1), p. 39-43

HELLBERG, R. S., DEWITT, C. A. M., & MORRISSEY, M. T. 2012. Risk-Benefit analysis of seafood consumption: a review. **Compr Rev Food Sci F**, 11(5): 490-517. doi: 10.1111/j.1541-4337.2012.00200.x

HLADY, W., KLONTZ, K. 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. **J Infect Dis.** 173:1176-83. doi: 10.1093/infdis/173.5.1176

JOHNSON, C.N., BOWERS, J.C., GRIFFITT, K.J., MOLINA, V., CLOSTIO, R.W., PEI, S., LAWS, E., PARANJPYE, R.N., STROM, M.S., CHEN, A., HASAN, N.A., HUQ, A., NORIEA III, N.F., GRIMES, D.J., COLWELL, R.R., 2012. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). **Appl. Environ. Microbiol.** 78, 7249–7257. doi:10.1128/AEM.01296-12

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, J.R.A. 2004. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and Other *Vibrio* spp. in US Food and Drug Administration/ Center for Food Safety & Applied Nutrition (US FDA/CFSAN). Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 9.

KUBOTA, K., IWASAKI, E., INAGAKI, S., NOKUBO, T., SAKURAI, Y., KOMATSU, M., TOYOFUKU, H., KASUGA, F., ANGULO, F.J., MORIKAWA, K., 2008. The human health burden

of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. **Foodborne Pathog. Dis.** 5, 641–648. doi:10.1089/fpd.2008.0092

LEAL, N.C., DA SILVA, S.C., CAVALCANTI, V.O., FIGUEIROA, A.C., NUNES, V.V., MIRALLES, I.S., HOFER, E., 2008. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. **J. Appl. Microbiol.** 105, 691–697. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03782.x

LU, S., LIU, B., CAO, J., ZHOU, B., LEVIN, R. 2006. Incidence and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from two retail sources and the genetic diversity of isolates as determined by RAPD-PCR analysis. **Food Biotechnol.** 20(2), p. 193-209. doi: 10.1080/08905430600709644

MA, C., DENG, X., KE, C., HE, D., LIANG, Z., LI, W., KE, B., LI, B., ZHANG, Y., NG, L., CUI, Z., 2014. Epidemiology and etiology characteristics of foodborne outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* during 2008–2010 in Guangdong province, China. **Foodborne Pathog. Dis.** 11, 21–29. doi:10.1089/fpd.2013.1522

MARTINEZ-URTAZA, J., LOZANO-LEON, A., VARELA-PET, J., TRINANES, J., PAZOS, Y., GARCIA-MARTIN, O., 2008. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Rias of Galicia, Spain. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 265–274. doi:10.1128/AEM.01307-07

MARTINEZ-URTAZA, J., SIMENTAL, L., VELASCO, D., DEPAOLA, A., ISHIBASHI, M., NAKAGUCHI, Y., NISHIBUCHI, M., CARRERA-FLORES, D., REY-ALVAREZ, C., POUSA, A., 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. **Emerg. Infect. Dis.** 11, 1319–1320. doi: 10.3201/eid1108.050322

MIWA, N., NISHIO, T., ARITA, Y., KAWAMORI, F., MASUDA, T., AKIYAMA, M., 2003. Evaluation of MPN method combined with PCR procedure for detection and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. **Food Hyg Safe Sci.** 44, 289–293. doi: 10.3358/shokueishi.44.289

NISHIBUCHI, M., KAPER, J.B., 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. **Infect. Immun.** 63, 2093–2099. doi: 0019-9567/95/\$04.0010

NORDSTROM, J.L., VICKERY, M.C., BLACKSTONE, G.M., MURRAY, S.L., DEPAOLA, A., 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. **Appl. Environ. Microbiol.** 73, 5840–5847. doi:10.1128/AEM.00460-07

OKUDA, J., ISHIBASHI, M., HAYAKAWA, E., NISHINO, T., TAKEDA, Y., MUKHOPADHYAY, A.K., GARG, S., BHATTACHARYA, S.K., NAIR, G.B., NISHIBUCHI, M., 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. **J. Clin. Microbiol.** 35, 3150–3155. doi: 0095-1137/97/\$04.0010

OLIVER, J.D. 2005. Viable but nonculturable state in bacteria. **J Microbiol.** 43, 93-100.

OTTAVIANI, D., LEONI, F., ROCCHEGIANI, E., CANONICO, C., POTENZIANI, S., SANTARELLI, S., MASINI, L., SCUOTA, S., CARRATURO, A., 2010B. *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1: KUT serotype. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 66, 452–455. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.015

OTTAVIANI, D., LEONI, F., ROCCHEGIANI, E., SANTARELLI, S., CANONICO, C., MASINI, L., DITRANI, V., CARRATURO, A., 2008. First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy. **J. Clin. Microbiol.** 46, 2144–2145. doi:10.1128/JCM.00683-08

OTTAVIANI, D., LEONI, F., SERRA, R., SERRACCA, L., DECASTELLI, L., ROCCHEGIANI, E., MASINI, L., CANONICO, C., TALEVI, G., CARRATURO, A., 2012. Nontoxigenic *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute gastroenteritis. **J. Clin. Microbiol.** 50, 4141–4143. doi:10.1128/JCM.01993-12

PARANJPYE, R.N., STROM, M.S., 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes Infect.** 2:1, 77-88. doi:10.1016/S1286-4579(00)00270-7

PARVEEN, S., HETTIARACHCHI, K.A., BOWERS, J.C., JONES, J.L., TAMPLIN, M.L., MCKAY, R., BEATTY, W., BROHAWN, K., DASILVA, L.V., DEPAOLA, A., 2008. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. **Int. J. Food Microbiol.** 128, 354–361. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.019

PEREIRA, F. S. 2002. **Methodologies to assess *Vibrio spp.* Virulence.** Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002. SPVC, Oeiras, p. 281-286.

PORTEEN, K. AND PRAMANIK, A.K. 2007. Studies on occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in fin fishes and shellfishes from different ecosystem of West Bengal. **Livestock Research for Rural Development.** 19(1).

PRUZZO C, HUQ A, COLWELL RR, DONELLI G. 2005. **Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment.** In: Belkin S, Colwell RR (eds). Ocean and Health Pathogens in the Marine Environment. Springer-Verlag: New York, pp 217–252.

QUILICI, M.L., ROBERT-PILLOT, A., PICART, J., FOURNIER, J.M., 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. **Emerg. Infect. Dis.** 11, 1148–1149. doi: 10.3201/eid1107.041008

RAMOS, R. J., MIOTTO, L. A., MIOTTO, M., SILVEIRA, J. N., CIROLINI, A., SILVA, H. S., ET AL, 2014. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 47(3), 327-333. doi: 10.1590/0037-8682-0069-2014

RISTORI, C.A. ET AL. 2007. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south

coast of Brazil. **Int. J. Environ. Health Res.** 17(4), 259-269. doi: 10.1080/09603120701372169

RUPP, G.S. **Introdução à biologia das ostras**. In: FERREIRA, J.F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Florianópolis 1999. p. 15-24.

SALA, M.R., ARIAS, C., DOMINGUEZ, A., BARTOLOME, R., MUNTADA, J.M., 2009. Foodborne outbreak of gastroenteritis due to Norovirus and *Vibrio parahaemolyticus*. **Epidemiol. Infect.** 137, 626–629. doi:10.1017/S0950268808001040

SERRACCA, L., BATTISTINI, R., ROSSINI, I., PREARO, M., OTTAVIANI, D., LEONI, F., ERCOLINI, C. 2011. *Vibrio* virulence genes in fishes collected from estuarine waters in Italy. *Lett Appl Microbiol*, 53(4), 403-408. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03119.x

SIMS, J.N., ISOKPEHI, R.D., COOPER, G.A., BASS, M.P., BROWN, S.D., ST JOHN, A.L., GULIG, P.A., COHLY, H.H., 2011. Visual analytics of surveillance data on foodborne vibriosis, United States, 1973–2010. **Environ. Health Insights** 5, 71–85. doi: 10.4137/EHL.S7806

SU, C. Y. AND LIU, C., 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of sea food safety. **Res. Microbiol.** 24, 549–558. doi: 10.1016/j.fm.2007.01.005

SUFFREDINI, E., COZZI, L., CICCAGLIONI, G., CROCI, L., 2014. Development of a colony hybridization method for the enumeration of total and potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish. **Int. J. Food Microbiol.** 186, 22-31. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.009

THOMPSON, F.L., IIDA, T., SWINGS, J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. **Microbiol Mol Biol Rev.** 68:403-431. doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004

TUYET, D.T., THIEM, V.D., VON SEIDLEIN, L., CHOWDHURY, A., PARK, E., CANH, D.G., CHIEN, B.T., VAN TUNG, T., NAFICY, A., RAO, M.R., ALI, M., LEE, H., SY, T.H., NICHIBUCHI, M., CLEMENS, J., TRACH, D.D., 2002. Clinical,

epidemiological, and socioeconomic analysis of an outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in Khanh Hoa Province, Vietnam. **J. Infect. Dis.** 186, 1615–1620. doi: 10.1086/345731

VIEIRA, R.H.S.F., COSTA, R.A., MENEZES, F.G.R., SILVA, G.C. 2011. Kanagawa-Negative, tdh- and trh-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Fresh Oysters Marketed in Fortaleza, Brazil. **Curr Microbiol**; 63:126-130. doi: 10.1007/s00284-011-9945-x

VUDDHAKUL, V., SOBOON, S., SUNGHIRAN, W., KAEWPIBOON, S., CHOWDHURY, A., ISHIBASHI, M., NAKAGUCHI, Y., NISHIBUCHI, M., 2006. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species (*Meretrix meretrix*, *Perna viridis*, and *Anadara granosa*) and their association with foodborne disease in southern Thailand. **J. Food Prot.** 69, 2615–2620.

WHO, 2011. **Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood.** In:WHO (Ed.), MRA Series, Joint FAO/WHO expert meetings on microbiological risk assessment.

ZULKIFLI, Y., ALITHEEN, N.B., SON, R., YEAP, S.K., LESLEY, M.B. AND RAHA, A.R. 2009. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes. **Food Res Int.** 16(3), 289-296.

Capítulo III: Adaptação de método para quantificação de *Vibrio parahaemolyticus* em moluscos bivalves por PCR em tempo real

1. Introdução

Vibrio parahaemolyticus, é uma bactéria halofílica Gram-negativa, membro da família Vibrionaceae, que é amplamente disseminada nos ambientes estuarinos, marinhos e costeiros (Nelapati et al, 2012; Ceccarelli et al, 2013; Zhang e Orth, 2013). *V. parahaemolyticus* é normalmente encontrado em um estado de livre natação, com a sua mobilidade conferida por um único flagelo polar, ou em estado inerte e fixado em superfícies, incluindo zooplâncton, peixes, mariscos ou qualquer material em suspensão na água (Gode Potratz et al., 2011). A classificação de *V. parahaemolyticus* depende das propriedades dos antígenos somático (O) e capsular (K) produzidos em várias condições ambientais (Nair et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define doenças transmitidas por alimentos (DTA) como uma doença que é causada pelo consumo de alimentos contaminados (Velusamy et al., 2010). Patógenos, como espécies de *Vibrio*, foram relacionados a grandes surtos de origem alimentar em todo o mundo (Apun et al, 1999; Velusamy et al., 2010). Na região asiática, espécies de *Vibrio* têm sido reconhecidos como a principal causa de surtos de origem alimentar em muitos países, incluindo Japão, Índia, China, Taiwan (Hara-Kudo et al., 2003), Coreia (Lee et al., 2008), e Malásia (Tunung et al., 2010). Surtos na Ásia foram relatados como sendo causados principalmente pelo consumo de alimentos de origem marinha contaminados (Jacxsens et al., 2009).

Vibrio parahaemolyticus foi reconhecido pela primeira vez como um patógeno alimentar no ano de 1951 em Osaka, onde os hábitos alimentares incluem uma ampla gama de alimentos de origem marinha *in natura* ou malcozidos (Daniels et al., 2000). *Cepas virulentas de V. parahaemolyticus* são transmitidas pelo consumo de alimentos de origem marinha crus ou malcozidos, causando uma gastroenterite (Newton et al, 2012; Zarei et al, 2012). Em casos raros, *V. parahaemolyticus* causa infecção de feridas, infecção de ouvido ou septicemia, que, geralmente está associada a indivíduos imunocomprometidos (Zhang e Orth, 2013). Desde a sua descoberta, *V. parahaemolyticus* tem sido reportado como responsável por 20-30% dos casos de intoxicação alimentar no Japão e doenças transmitidas por alimentos marinhos em muitos países asiáticos (Alam et al., 2002). *V. parahaemolyticus* também é reconhecido como a principal causa de gastroenterite humana associada ao consumo de alimentos de

origem marinha nos Estados Unidos e na América Latina (Kaysner e DePaola, 2001; Newton et al., 2012.).

V. parahaemolyticus pode crescer a temperaturas abaixo de 10 °C, no entanto, a temperatura mínima da água do mar associada com doenças é de 15 °C (McLaughlin et al., 2005). *V. parahaemolyticus* pode hibernar nos sedimentos quando a temperatura da água cai e emerge para a coluna d'água quando as condições se tornam favoráveis (Kaneko & Colwell 1975, 1978). A melhor salinidade para *V. parahaemolyticus* em é em torno de 23 ppm embora sua presença tenha sido relatada em locais com salinidades variando de 10 a 34 ppm, sendo que, quando presente em moluscos bivalves é capaz suportar níveis de salinidade relativamente altos.

Os métodos oficiais de detecção usando ensaios bioquímicos e microbiológicos utilizados em todo o mundo, são muitas vezes limitados e não determinantes (Bej et al., 1999). As técnicas de fenotipagem e de identificação bioquímica convencionais de *V. parahaemolyticus* são complicadas quando as cepas são isoladas a partir de alimentos de origem marinha e ambientes aquáticos (Nishibuchi, 2006). Como resultado, o ensaio baseado em PCR, tornou-se uma técnica molecular popular para a identificação e detecção de *V. parahaemolyticus* (Drake et al., 2007). A introdução subsequente da PCR em tempo real que confere uma vantagem adicional em relação PCR convencional, uma vez que a visualização dos produtos de PCR por eletroforese em gel não é necessária, e os resultados obtidos em tempo real, o que facilita a detecção rápida de *V. parahaemolyticus* em uma amostra não clínica (Nordstorm et al., 2007). O gene da hemolisina termolábil (TL) em *V. parahaemolyticus* é específico para essa espécie, e pode ser usado como um marcador de amplificação por PCR para a detecção do patógeno.

Métodos baseados em biologia molecular, tais como ensaios de hibridação com sondas de DNA e PCR foram desenvolvidos para detecção de *V. parahaemolyticus* e produziram resultados rápidos e específicos (Bej et al., 1999; Kim et al., 1999). No entanto, o processo de hibridação da sonda e a técnica de eletroforese em gel utilizada para analisar produtos de amplificação por PCR são tediosos e consomem muito tempo.

A técnica de PCR em tempo real tem sido demonstrada útil na detecção rápida e precisa de bactérias patogênicas nos produtos alimentares (Malorny et al, 2008; Mace et al, 2013.). Além disso, a progressão da reação de PCR em tempo real pode ser monitorada após cada ciclo, ao contrário da PCR convencional que só analisa o produto

final da amplificação, proporcionando assim, um monitoramento de todo o processo de amplificação, proporcionando resultados mais confiáveis para a quantificação. Este método não requer manipulação da amostra após o processamento, evitando assim o potencial de contaminações por produtos de PCR ou reagentes como corantes para DNA, bem como economia de tempo (Tyagi et al., 2009). Recentemente, vários ensaios de PCR em tempo real, têm sido desenvolvidos para a detecção de *V. parahaemolyticus* com o aumento da velocidade e sensibilidade. No entanto, poucos são os trabalhos que têm como objetivo a quantificação desta bactéria em amostras de alimentos (Takahashi et al., 2005; Nordstrom et al., 2007; Ward e Bej, 2006).

Neste estudo, realizou-se a adaptação de método de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para quantificação de DNA de *V. parahaemolyticus*, utilizando uma sonda TaqMan MGB e iniciadores desenvolvidos inicialmente por Park et al., (2003) para detecção em sistema multiplex com outras espécies.

2. Material e métodos

2.1. Cepas bacterianas

As cepas bacterianas de cultura pura utilizados nos ensaios foram obtidos a partir da coleção de culturas do INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Fundação de Saúde e do Instituto Oswaldo Cruz) e NUMICAL (Laboratório de Análise Microbiológica de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e estão descritas na tabela 4. As cepas foram mantidas em ágar estoque, sendo ágar tripona de soja com 3% de NaCl (TSA 3%NaCl) para *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus* e TSA para as demais espécies. No dia anterior a utilização, cada cepa foi reativada em caldo triptona de soja (TSB) com 3% de NaCl ou sem respectivamente, e incubada *overnight*.

2.2. Preparação das culturas

Para a inoculação das amostras e para realização dos ensaios preliminares com *Vibrio parahaemolyticus*, a turbidez de uma cultura *overnight* foi ajustada para 0,5 McFarland, que corresponde a 10^7 UFC/mL (determinada experimentalmente) e realizadas diluições seriadas em tampão PBS (NaCl 80 g/L, KCl 2 g/L, Na_2HPO_4 14,4 g/L e KH_2PO_4 2,4 g/L) para alcançar a concentração de microrganismos

necessários para inoculação. Ao mesmo tempo, estas diluições foram inoculadas em agar TSA-3%NaCl e incubou-se a 37° C por 48 h, para se obter o valor de referência.

Tabela 5. Cepas bacterianas utilizadas com respectivas referências

Espécies/subspécies	Nome /origem da cepa
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 64	NUMICAL-UFSC ^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 02	NUMICAL-UFSC ^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 99H	NUMICAL-UFSC ^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 93H	NUMICAL-UFSC ^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 103	NUMICAL-UFSC ^a
<i>Vibrio vulnificus</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Vibrio cholerae</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Vibrio alginolyticus</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028
<i>Proteus vulgaris</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12924
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6533
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Salmonella enteritidis</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Listeria monocytogenes</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Citrobacter freundii</i>	NUMICAL-UFSC
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

^a Cepas isoladas por Ramos et al., 2012 and Silva et al., 2016.

2.3. Obtenção e preparação das amostras de ostras e mexilhões

O método de q-PCR adaptado neste trabalho foi aplicado a amostras de ostras e mexilhões artificialmente contaminadas. Todas as amostras utilizadas foram mantidas em refrigeração (7 ° C) até o processamento. As amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*) foram coletadas na praia de Sambaqui, Florianópolis, SC, Brazil, na fazenda marinha do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, UFSC. As ostras e mexilhões foram depurados em 30 L de

água do mar que foi recirculada a 100 mL/min durante 3 horas através de uma série de filtros com tamanhos de poros de 20 μM , 5 μM (filtros de cartucho de polipropileno), e 0,2 μm (membrana de nitrocelulose), respectivamente. Ostras e mexilhões foram esfregadas em água corrente para remover detritos, desinfetados com 70% de etanol, e abertos assepticamente utilizando uma faca esterilizada. A carne e o líquido intervalvar foram assepticamente transferidos para sacos estéreis e foram homogeneizadas durante 1 min em Stomacher (Interscience, Saint-nom-La-Breteche, França).

2.4. Preparação dos *pellets* de células para a curva padrão

Os *pellets* de células para a curva padrão foram obtidos a partir da cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. A cepa foi cultivada a 37 °C em caldo TSB-3%NaCl por 12 horas. As células foram separadas a partir do caldo de crescimento (2 mL) por centrifugação a 8600 g durante 10 min. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 4 mL de tampão PBS e 1 ml da suspensão de células foi amostrada para a enumeração de bactérias tal como descrito na Secção 2.2. Em seguida, 1 mL da suspensão foi centrifugada a 8600 g durante 10 min, o sobrenadante foi removido e o sedimento resultante foi armazenado a -20 °C até a realização da extração de DNA.

2.5. Preparação dos *pellets* de células de ostras e mexilhões

Para obtenção dos *pellets* de células de ostras e mexilhões, 10 gr de tecido intervalvar foram pesados com 10 ml de PBS em um saco de homogeneização com filtro e depois misturados em Stomacher (Interscience, Saint-nom-La-Breteche, França) durante 2 min à temperatura ambiente. A mistura resultante foi amostrada a partir da lateral do filtro e dividida em amostras de 1 mL sendo que uma delas foi utilizada para a enumeração de bactérias tal como descrito na seção 2.2. Além disso, alíquotas de 1 ml foram centrifugadas a 9700 g durante 15 min, o sobrenadante foi removido e o sedimento resultante foi armazenado a -20 °C até a realização da extração de DNA.

2.6. Extração de DNA

O DNA foi extraído usando o Kit de extração de ácidos nucleicos DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, MD, EUA). O processo de extração seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante para execução em

equipamento automatizado de extração QiaCube (Qiagen, MD, EUA). O DNA foi, em seguida, armazenado a -20°C até a utilização. As concentrações de DNA foram medidas por absorvância utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e a pureza foi avaliada com base na sua absorvância a 260 e 280 nm. As amostras de DNA foram utilizadas quando apresentaram uma razão A260/A280 entre 1,8 e 2,0.

2.7. Iniciadores, sonda e ensaio de qPCR

Os iniciadores e a sonda utilizados foram desenhados e descritos inicialmente por Park et al. (2003), cujo objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de um método de PCR multiplex para a detecção simultânea de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*. Estes iniciadores e sonda foram adaptados neste estudo, para realização dos ensaios para a quantificação de *V. parahaemolyticus* e são apresentados na tabela 5. Para cada primer, diferentes concentrações de iniciadores, que variam entre 50 e 600 nM foram testadas para determinar as condições mais eficazes de amplificação por PCR. Os melhores resultados foram obtidos com uma concentração de 300 nM para ambos os iniciadores direto e inverso. As reações de qPCR foram realizadas no equipamento rotor Gene Q (Qiagen, MD, EUA). Todas as amplificações por PCR foram realizadas num volume final de 25 μL contendo 12,5 μL de Rotor Gene Sonda Kit (Qiagen, MD, EUA), 1,5 μL de H_2O livre de nuclease, 2 μL de DNA molde, 4 μL (300 nM) de cada iniciador e 1 μL (100 nM) de sonda. As condições de ciclos térmicos consistiram de um ciclo de ativação da enzima taq polimerase: 95°C durante 5 min; seguido de 40 ciclos de amplificação do DNA alvo: 95°C durante 15 s, seguido de 60°C durante 60 s.

O valor limiar de ciclo (Cycle threshold - Ct) foi definido como o ciclo de no qual o sinal de fluorescência excedeu o nível de fundo. A quantificação absoluta de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras foi realizada pela interpolação sobre uma curva de regressão padrão dos valores de Ct gerados a partir de DNA genômico extraído a partir da cultura de referência.

Tabela 6. Iniciadores e Sonda usados

Iniciador/sonda)	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto
<i>tl</i> forward	AACCGTGGCGTTCCAGAA	58pb
<i>tl</i> Reverse	CCGTCAAACGAATCAGTGCTT	
<i>tl</i> Sonda	VIC-TGAAAGCGGATTATGC-MGB	

2.7.1. Inibidores de amplificação

A possível presença de substâncias nas amostras de DNA que poderiam inibir a amplificação do DNA foi verificada através adição de DNA-alvo com o extraído a partir de ostras e mexilhões. Um nanograma de DNA da cepa de referência de *Vibrio parahaemolyticus* foi adicionado a quatro amostras de DNA de ostra e quatro amostras de DNA de mexilhão em diluições decrescentes e realizada a reação de qPCR.

2.7.2. Construção da Curva Padrão

Foram obtidas diluições em série, na gama de 10^0 a 10^6 cópias/mL, do DNA extraído a partir de células de *Vibrio parahaemolyticus* (seção 2.4.) e o DNA diluído foi amplificado. As curvas padrão foram obtidas através da representação gráfica dos valores de Ct contra o número de cópias do gene *tl*/μL. A curva padrão foi feita em sete repetições. Os critérios de confiabilidade foram os coeficientes de correlação e de eficiência de amplificação. O limite de quantificação foi definida como a menor concentração em que foi mantida a linearidade.

2.7.3. Cálculo do número de cópias do gene *tl*

O número de cópias gene *tl* na amostra de DNA referência de *Vibrio parahaemolyticus* foi calculado com base no tamanho do genoma (cromossomo 1 - número de acesso GenBank NZ_CP007004.1 e cromossomo 2 - número de acesso GenBank NZ_CP007005.1) cujo tamanho é de 1,042 Mb (Kalburg et al., 2014), usando a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$) e o peso molecular de ADN (660 Da/pb) e o número de cópias do gene no genoma (1). Através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{tamanho do genoma} \times \text{constante de Avogadro}}{\text{peso molecular do DNA}} \times \text{número de cópias no DNA}$$

Os resultados da PCR em tempo real foram então expressos como células bacterianas por grama de ostra ou mexilhão, considerando o volume amostrado.

2.8. Ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade

Ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados com três níveis de contaminação de DNA alvo em amostras preparadas com um mix de tecido de ostra e mexilhão. Os ensaios de repetibilidade foram realizados com a quantificação do DNA alvo pela reação de qPCR em triplicata das amostras com cada nível de contaminação. As condições de repetitividade foram caracterizadas utilizando o mesmo procedimento, mesmos instrumentos utilizados sob mesmas condições, mesmo local, e realizado em um único ensaio. Os ensaios de reprodutibilidade foram realizados com a quantificação do DNA alvo pela reação de qPCR em cinco diferentes ensaios para cada nível de contaminação. Os valores de Ct foram tratados em programa Exel[®] (Microsoft) para a obtenção do coeficiente de variação (CV%).

3. Resultados e Discussão

3.1. Especificidade dos iniciadores e influência de inibidores da amplificação

A especificidade do conjunto de iniciadores foi avaliada pela amplificação de amostras de DNA a partir de um total de 23 espécies bacterianas, incluindo bactérias que são filogeneticamente relacionadas ou comumente encontrados em ambiente marinho (Tabela 6). Os valores de Ct observados variaram entre 17,91 e sem Ct sob as condições de reação ótimas com 50 nm de DNA alvo. Para a maioria das espécies testadas não foi possível obter um valor de Ct porque o valor de fluorescência não ultrapassou a linha de ruído até o último ciclo de amplificação.

Tabela 7. Especificidade do primer (expresso em valor de Ct) obtido a partir de 10 ng of DNA por reação de PCR. Valores de Ct em negrito indicam os Cts para o DNA alvo.

Espécies/subspecies	Ct
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17,91
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 64	18,25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 02	18,04
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 99H	17,96
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 93H	18,32
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 103	18,97
<i>Vibrio vulnificus</i>	35,87
<i>Vibrio cholerae</i>	37,07
<i>Vibrio alginolyticus</i>	No Ct
<i>Enterococcus faecalis</i>	No Ct
<i>Salmonella</i> Typhimurium	No Ct
<i>Proteus vulgaris</i>	No Ct
<i>Clostridium perfringens</i>	No Ct
<i>Bacillus subtilis</i>	No Ct
<i>Bacillus cereus</i>	No Ct
<i>Salmonella enteritidis</i>	No Ct
<i>Listeria monocytogenes</i>	No Ct
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No Ct
<i>Citrobacter freundii</i>	No Ct
<i>Yersinia enterocolitica</i>	No Ct
<i>Aeromonas hydrophila</i>	No Ct
<i>Staphylococcus aureus</i>	No Ct
<i>Escherichia coli</i>	No Ct

Já os valores de Ct para o DNA de *V. parahaemolyticus* ficaram abaixo de 20,0 enquanto que os valores para outras espécies ficaram acima e 35,0 o que demonstra uma alta especificidade dos iniciadores. Esse resultado é bastante relevante quando se prevê que em muitos casos a qPCR é aplicada ao DNA extraído a partir de uma matriz alimentar complexa, na qual a espécie-alvo não é necessariamente a dominante, como é o caso de *V. parahaemolyticus* em amostras de alimentos de origem marinha.

A especificidade do conjunto de iniciadores também foi verificada quando o DNA alvo foi misturado com o DNA não alvo. A amplificação do DNA alvo de *V. parahaemolyticus* não foi afectada por até mesmo

grandes quantidades de DNA não alvo da matriz. Os resultados do teste com possíveis inibidores da amplificação são apresentados na tabela 6.

Tabela 8. Valores de Ct obtidos com a amplificação de amostras de DNA alvo misturadas com DNA não-alvo. O controle positivo, sem DNA não-alvo é apresentado em negrito.

Referência	1:1 ^a	1:50 ^b	1:100 ^c	1:150 ^d	0,1:300 ^e
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	20,32				30,54
<i>Crassostrea gigas</i> matrix	21,07	21,54	21,87	21,45	30,97
<i>Perna perna</i> matrix	20,98	21,12	20,76	21,34	29,42

^a 1ng DNA alvo com 1 ng do DNA não-alvo no tubo de PCR

^b 1ng DNA alvo com 50 ng do DNA não-alvo no tubo de PCR

^c 1ng DNA alvo com 100 ng do DNA não-alvo no tubo de PCR

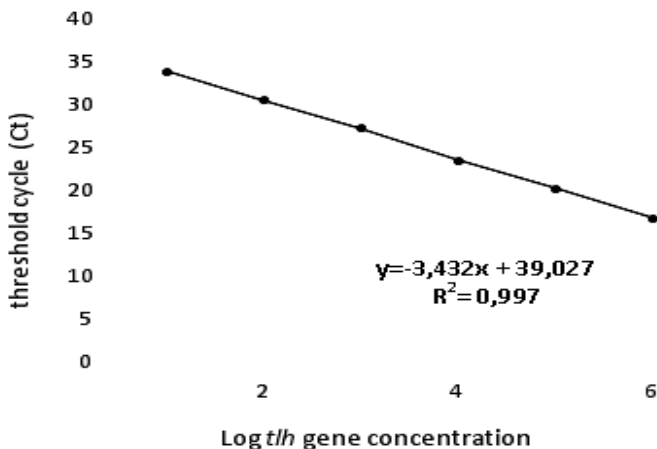
^d 1ng DNA alvo com 150 ng do DNA não-alvo no tubo de PCR

^e 0,1ng DNA alvo com 300 ng do DNA não-alvo no tubo de PCR

3.2. Validação do ensaio de qPCR

A curva padrão para a quantificação de *V. parahaemolyticus* foi obtida a partir das repetições da quantificação do DNA alvo diluído. Uma boa correlação linear entre os valores de Ct e o número de cópias do gene *tl*/μL foi obtido pela curva padrão com valor de coeficiente de relação (R^2) de 0,997.

Figura 3. Representação da curva padrão gerada cruzando os valores de Ct contra a concentração logarítmica do gene *tl* (cópias/reacção) para *Vibrio parahaemolyticus*. Os valores de Ct são médias das sete repetições



Este coeficiente de correlação demonstra que os ensaios de qPCR foram lineares em uma faixa de 1 unidade logarítmica. De acordo com os volumes e as diluições utilizadas no ensaio de qPCR, um mínimo de 100 cópias do gene *tl*/reacção pode ser quantificada, o que corresponde a 3×10^1 células de *Vibrio parahaemolyticus* /g de ostra ou mexilhão. Esse resultado demonstra uma alta sensibilidade do método, mesmo quando aplicado a matrizes complexas, permitindo a sua aplicação em programas de monitoramento com o objetivo de garantir a segurança do consumidor. De acordo com a curva, a média de eficiência da qPCR foi de 96%.

Os resultados dos ensaios de repetibilidade e de reprodutibilidade para o conjunto de iniciadores encontram-se resumidos na Tabela 7. Os valores de coeficiente de variação (CV%) para os ensaios e repetibilidade foram baixos, apresentando valores entre 0,74% e 1,09%, enquanto que os valores de CV% para a reprodutibilidade foram levemente superiores, com valores entre 0,67% e 1,70%. Esses valores demonstram alta precisão do método.

Tabela 9. Repetibilidade e reprodutibilidade da qPCR baseado nos valores de Ct em amostras artificialmente contaminadas em três diferentes concentrações

Gene	Concentração (cópia/reacção)	Repetibilidade (Ct)			Reprodutibilidade (Ct)				
		N amostras	Média	SD ^a	CV% ^b	Reações	Média	SD	CV%
<i>tl</i>	1x10 ⁶	3	16,76	0,16	0,95	5	16,46	0,23	1,41
	1x10 ⁵	3	20,27	0,15	0,74	5	20,39	0,13	0,67
	1x10 ⁴	3	23,56	0,25	1,09	5	23,36	0,39	1,70

^aSD = Desvio padrão

^bCV = Coeficiente de variação

3.3. Quantificação de *V. parahaemolyticus* em amostras artificialmente contaminadas

Os resultados de valores gerados a partir quantificação de *V. parahaemolyticus* realizada pelos dois métodos nas amostras artificialmente contaminadas são apresentados na tabela 8. Houve pouca diferença entre os resultados para quantificação obtidos pelos dois métodos. No entanto, o método cultural utilizado neste trabalho é um método experimental cujo objetivo foi fornecer parâmetros para comparação com o método de qPCR proposto. Ainda assim, o método de qPCR proposto neste estudo apresentou contagens ligeiramente mais altas, sugerindo maior sensibilidade em relação ao método cultural utilizado para comparação.

Tabela 10. Resultados da quantificação de *V. parahaemolyticus* em amostras de ostras e mexilhões obtidos pelo isolamento em placas e qPCR.

Sample	Culture Isolation Log CFU g-1	qPCR Log CFU g-1
Oyster 1	4,40 ± 0,04	4,84 ± 0,00
Oyster2	3,14 ± 0,06	3,82 ± 0,15
Oyster 3	2,56 ± 0,17	2,59 ± 0,14
Mussel 4	4,41 ± 0,02	4,83 ± 0,01
Mussel 5	3,19 ± 0,07	3,84 ± 0,02
Mussel 6	2,64 ± 0,02	2,68 ± 0,02

Os valores são médias de triplicatas ± o desvio padrão em três amostras independentes.

Não existem métodos culturais *standard* que forneçam resultados em UFC g-1 para *V. parahaemolyticus* e o único método de quantificação oficial é o recomendado pelo Bacterial Analytical Manual (FDA) que utiliza a técnica de Número Mais Provável. Ainda, temos também o método de detecção estabelecido pela International Organization for Standardization, ISO/TS 21872-1:2007. Ambos os métodos se baseiam na identificação bioquímica de colônias selecionadas a partir do isolamento seletivo em placas com ágar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose (TCBS). Métodos BAM são recomendados para análise oficial, mas podem não refletir as tecnologias mais recentes ou metodologia ideal para a detecção de *V.*

parahaemolyticus em moluscos naturalmente contaminados. Pesquisadores compararam uma variedade de alternativas metodológicas para a diferenciação de espécies de *Vibrio sp.* (Alam et al., 2002), incluindo diferentes meios de diluição, de enriquecimento (Hagan et al., 1994; Azanza et al., 1996) e meios de plaqueamento (Oliver et al., 1992; Hoi et al., 1998a, 1998b; Cerda-Cuellar et al., 2000). O Plaqueamento direto continua a ser difícil por causa da grande quantidade da microflora natural que também podem crescer em meios selectivos. Embora, tenha sido utilizado extensivamente para o isolamento seletivo de *V. parahaemolyticus* a partir de alimentos, o ágar TCBS apresenta dificuldades para o reconhecimento das colônias, uma vez que favorece o crescimento de outras espécies levando ao surgimento de uma cor amarelada devido a fermentação da sacarose. Esse tipo de interferência foi minimizado neste estudo, já que as amostras de ostras e mexilhões passaram por processo de depuração para reduzir a presença de microbiota natural. O estudo realizado por Hara-Kudo et al. (2001) já relata esta mesma dificuldade para detecção de *V. parahaemolyticus* e propõe o desenvolvimento de um ágar mais seletivo para este fim. Meios cromogénicos como o Bio-cromo Vibrio (Biomedix, Pomona, Calif., EUA) foram desenvolvidos para diferenciar *V. parahaemolyticus* a partir de outras espécies de *Vibrio* (Hara-Kudo et al., 2001) e a sua eficácia já foi validada (Duan e SU 2005; Su et al., 2005). Canizalez-Roman et al. (2011) também reportam problemas com o isolamento de *V. parahaemolyticus* em ágar TCBS e alertam que o maior problema é o grande número de amostras falso-negativas. Ambos, autores discutem o fato de o método convencional utilizado no mundo todo ser bastante trabalhoso e demorado, e sugerem o desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficazes para quantificação de *V. parahaemolyticus*.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é altamente recomendado na detecção e enumeração de bactérias específicas de comunidades microbianas altamente complexas sem a realização de enriquecimento de amostras, a fim de economizar tempo, esforço e custo diretamente, além de fornecer um resultado que corresponde ao real nível de contaminação da amostra (Sakata et al., 2012).

Neste estudo, demonstramos que o protocolo de qPCR adaptado pode quantificar com precisão *V. parahaemolyticus* em amostras de moluscos bivalves. Além disso, PCR em tempo real usando sondas do tipo TaqMan tem sido amplamente utilizada na identificação e quantificação de agentes patogénicos nos alimentos (Mandal et al., 2011). Estas sondas fazem uma ligação específica com o DNA alvo, diferente das técnicas mais antigas que utilizavam intercalantes de

DNA, como o SYBR Green, por exemplo. Este protocolo de qPCR utiliza uma sonda TaqMan ligada a um composto MGB que aumenta a afinidade desta pelo DNA alvo. Isto permite que o fragmento alvo a ser amplificado seja bem pequeno, aumentando ainda mais a especificidade da reação. O limite mínimo de quantificação foi inferior a 30 células de *V. parahaemolyticus*/g de tecido do molusco, o que demonstra a elevada sensibilidade do método. As curvas padrão foram estabelecidas e foram obtidos excelentes correlações lineares.

O protocolo de qPCR foi desenvolvido para amplificar o gene alvo *tl* da hemolisina termolábil. De acordo com Zhang e Orth. (2013), este tipo de hemolisina é uma exotoxina que ataca as membranas celulares do sangue vermelho e provoca a ruptura de células. No entanto, o papel do gene de *tl* na patogenicidade de *V. parahaemolyticus* ainda é pouco claro (Shinoda et al., 1991). De acordo com estudos realizados por Taniguchi et al. (1985) e Rizvi e Bej (2010), este gene mostrou-se presente em todas as cepas de *V. parahaemolyticus* testadas. Enquanto que, outros genes marcadores utilizados tais como *tdh*, *trh* e *toxR* só estão presentes em cepas que apresentam patogenicidade, tornando-os inadequados para quantificação de *V. parahaemolyticus* não patogênico e população ambiental total (Rosec et al, 2009;.. Theethakaew et al, 2013). Assim, o protocolo é aplicável não só para o diagnóstico clínico, mas também para o monitoramento ambiental.

4. Considerações finais

Apesar dos reconhecidos benefícios nutricionais do consumo de alimentos de origem marinha, os riscos potenciais de comer alimentos de origem marinha contaminados são consideráveis. Alimentos de origem marinha são conhecidos em todo o mundo como um veículo de transporte de bactérias de origem alimentar que podem causar doença. Em face à provável mudança nas concentrações de *Vibrio parahaemolyticus*, relacionada com iminentes alterações climáticas e aquecimento das águas costeiras e estuarinas, ficamos com obstáculos para melhorar regulamentos que visam reduzir infecções de origem alimentar. Os atual Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) prevê apenas o monitoramento contante de *Escherichia coli*, com medidas cautelares de fechamento de cultivo quando as contagens ultrapassam o limite estabelecido. Enquanto, a maioria dos estudos ao redor do mundo afirmam que *V. parahaemolyticus* é o patógeno de maior importância relacionado ao consumo de moluscos bivalves, no Brasil a sua importância enquanto

risco para a saúde pública é ignorada. Infelizmente, dados epidemiológicos são escassos e a sua prevalência em regiões de cultivo e nos moluscos produzidos no Brasil é estudada em iniciativas independentes por pesquisadores nas universidades brasileiras. Nos resta esperar que dados levantados em estudos como este, sirvam de subsídio para o melhoramento das políticas nacionais de segurança de alimentos e que, com o desenvolvimento de métodos mais eficientes, o monitoramento de *V. parahaemolyticus* possa fazer parte do PNCMB.

5. Referências

- Alam, M. J., Tomochika, K. I., Miyoshi, S. I., Shinoda, S., 2002. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 83–87. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11064.x
- Apun, K., Asiah, M. Y., Jugang, K., 1999. Distribution of bacteria in tropical fresh water fish and ponds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 285–292. doi: 10.1080/09603129973083
- Azanza, P. V., Buckle, K. A., Fleet, G. H., 1996. Effect of diluents on the enumeration of *Vibrio vulnificus*, *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 385-390.
- Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., & Karlsson, A. H., 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science* 83, 165–174. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.06.003
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C., Jones, D. D., Kaysner, C. A., 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* 36, 215–225. doi:10.1016/S0167-7012(99)00037-8
- Canizalez-Roman, A., Flores-Villasenor, H., Zazueta-Beltran, J., Muro-Amador, S., Leon-Sicairos, N., 2011. Avaliação comparativa de um agar protocolo de médio PCR cromogênico com um método convencional para o isolamento de cepas *Vibrio parahaemolyticus* a partir de amostras ambientais e clínicas. *Cân. J. Microbiol.*, 57, 136-142.

- Ceccarelli, D., Hasan, N. A., Hug, A., Colwell, R. R., 2013. Distribution, and dynamics of epidemic, and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 97. doi:10.3389/fcimb.2013.00097
- Cerda-Cuellar, M., Jofre, J., Blanch, A. R., 2000. A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol.*, 66, 855–9.
- Daniels, N. A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A. L. et al., 2000. Emergence of a new O3:K6 *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. *JAMA* 284, 1541–1545. doi:10.1001/jama.284.12.1541
- Deepanjali, A., Kumar, H. S., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2005. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the south west coast of India. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3575–3580. doi:10.1128/AEM.71.7.3575-3580.2005
- Drake, S. L., DePaola, A., Jaykus, L. A., 2007. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 6, 120–144. doi: 10.1111/j.1541-4337.2007.00022.x
- Duan, J., Su, Y. C., 2005. Comparison of a chromogenic medium with thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Sci.*, **70**, 125–8.
- Elhadi, N., Radu, S., Chen, C. H., Nishibuchi, M., 2004. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *J. Food Prot.* 67, 1469–1475.
- Gode-Potratz, C. J., Kustus, R. J., Breheny, P. J., Weiss, D. S., McCarter, L. L., 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a program me of gene expression that promotes colonization and virulence. *Mol. Microbiol.* 79, 240–263. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07445.x
- Gode-Potratz, C. J., Kustus, R. J., Breheny, P. J., Weiss, D. S., McCarter, L. L., 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus*

triggers a program *meof* gene expression that promotes colonization and virulence. *Mol. Microbiol.*, 79, 240–263. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07445.x

Hagan, C. J., Sloan, E. M., Lancette, G. A., Peeler, J. T., Sofos, J. N., 1994. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various seafoods with two enrichment broths. *J Food Prot.*, 57, 403–9.

Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., Kumagai, S., 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Appl Environ Microbiol.* 67(12), 5819–23. doi:10.1128/AEM.67.12.5819-5823.2001

Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y. et al., 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3883–3891. doi:10.1128/AEM.69.7.3883-3891.2003

Hoi, L., Larsen, J. L., Dalsgaard, I., Dalsgaard, A., 1998a. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Appl Environ Microbiol.*, 64, 7–13.

Hoi, L., Dalsgaard, I., Dalsgaard, A., 1998b. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. *Appl Environ Microbiol.*, 64, 1721–4.

Jacxsens, L., Kasuga, J., Luning, P. A., Vander Spiegel, M., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., 2009. A microbial assessment scheme to measure microbial performance of food safety management systems. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 113–125. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.018

Kaneko, T., Colwell, R. R., 1978. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Microbial Ecology*, 4, 135–155.

Kaysner, C. A., DePaola, A., 2001. “*Vibrio*,” in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th Edn, eds F. P.

- Downes and K. Ito (Washington, DC: American Public Health Association),405–420.
- Kalburge, S. S., Polson, S. W., Crotty, K. B., Katz, L , Turnsek, M., Tarr, C. L. et al., 2014. Complete Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Genome A*. 2, 8–9. doi: 10.1128/genomeA.00159-14
- Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M., 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1173–1177.
- Lee, J., Jung, D., Eom, S., Oh, S., Kim, Y., Kwak, H. et al., 2008. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. *Food Control* 19, 990–994. doi:10.1016/j.foodcont.2007.10.006
- Macé, S., Mamlouk, K., Chipchakova, S., Prévost, H., Joffraud. J. J., Dalgaard, P., Pilet, M. F. and Dousset, X., 2013. Development of a rapid Real-Time PCR method as a tool to quantify viable *Photobacterium phosphoreum* bacteria in salmon (*Salmo salar*) steaks. *Appl. Environ. Microbiol* 79: 2612-2619. doi: 10.1128/AEM.03677-12
- Malorny, B., Löfström, C., Wagner, M., Krämer, N. and Hoorfar, J., 2008. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by Real-Time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1299-1304. doi: 10.1128/AEM.02489-07
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., Pal, U.K., 2011. Methods for rapid detection of foodborn pathogens: an overview. *Am. J. Food Technol.* 6(2), 87-102. doi: 10.3923/ajft.2011.87.102
- McLaughlin, J. B., DePaola, A., Bopp, C. A., Martinek, K. A., Napol, N. P., 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New Engl. J. Med.*, 353,1463–1470. doi:10.1056/NEJMoa051594
- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., Sack, D. A., 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus*

serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 39–48. doi:10.1128/CMR.00025-06

Nelapati, S., Nelapati, K., Chinnam, B. K., 2012. *Vibrio parahaemolyticus* an emerging food borne pathogen - A Review. *Vet. World* 5, 48–62. doi: 10.5455/vetworld. 2012.48-63

Newton, A., Kendall, M., Vugia, D. J., Henao, O. L., Mahon, B. E., 2012. Increasing rates of vibrios is in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clin. Infect. Dis.* 54, S391–S395. doi:10.1093/cid/cis243

Nishibuchi, M., 2006 “*Molecular identification*” in *The Biology of Vibrios*, F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings, Eds. (American Society for Microbiology) 4, 44–64.

Nordstrom, J. L., Vickery, M. C., Blackstone, G. M., Murray, S. L., DePaola, A., 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5840–5847. doi: 10.1128/AEM.00460-07

Oliver, J. D., Guthrie, K., Preyer, J., Wright, A., Simpson, L. M., Siebeling, R., Morris, J. G., 1992. Use of colistin-polymyxin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. *Appl Environ Microbiol.*, 58, 737–9.

Park, C.H., Kim, H.J., Hixon, D.L., Bubert, A., 2003. Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2650–2653. doi:10.1128/JCM.41.6.2650-2653.2003

Ramos, R. J., Miotto, L. A., Miotto, M., Silveira, J. N., Cirolini, A., Silva, H. S., et al, 2014. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47(3), 327-333. doi: 10.1590/0037-8682-0069-2014.

Rizvi, A. V., Bej, A. K., 2010. Multiplexed real-time PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and its rapid

- detection in shellfish and Gulf of Mexico water. *A Van Leeuw J Microb.* 98(3), 279–90. doi: 10.1007/s10482-010-9436-2
- Rosec, J. P., Simon, M., Causse, V. and Boudjemaa, M., 2009. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: Comparison of PCR protocols using *pR72H* or *toxR* targets with a culture method. *Int. J. Food Microbiol.* 129: 136–145. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.017
- Sakata, J., Kawatsu, K., Iwasaki, T., Tanaka, K., Takenaka, S., Kumeda, Y. and Kodama, H. 2012. Production and characterization of a novel monoclonal antibody against *Vibrio parahaemolyticus* F0F1 ATP synthase's delta subunit and its application for rapid identification of the pathogen. *J. Microbiol. Methods* 88: 77–82. doi: 10.1016/j.mimet.2011.10.014
- Shinoda, S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi S, Yamamoto, S., Taniguchi, H. and Mizuguchi, Y. 1991. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2705–2711.
- Su, Y. C., Duan, J., Wu, W. H., 2005. Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot.*, 68, 1454–6.
- Su, C. Y. and Liu, C., 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of sea food safety. *Res. Microbiol. Elsevier.* 24, 549–558. doi: 10.1016/j.fm.2007.01.005
- Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., 2005. Development of a quantitative real-time PCR method for estimation of the total number of *Vibrio parahaemolyticus* in contaminated shellfish and seawater. *J Food Prot.* 68(5), 1083–1088.
- Taniguchi, H., Ohta, H., Ogawa, M. and Mizuguchi, Y., 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J. Bacteriol.* 162, 510-515.
- Theethakaew, C., Feil, E. J., Castillo-Ramírez, S., Aanensen, D. M., Suthienkul, O., Neil, D. M. and Davies, R. L., 2013. Genetic

relationships of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier, and environmental sources in Thailand, determined by multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2358–2370. doi: 10.1128/AEM.03067-12

Tyagi, A., Saravanan, V. and Karunasagar, I., 2008. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYBR green real-time PCR and evaluation of three enrichment media. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 124-130. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.006

Tunung, R., Margaret, S. P., Jeyaletchumi, P., Chai, L. C., Zainazor, T. C., Ghazali, F. M. et al., 2010. Prevalence and quantification of *Vibrio* in raw salad vegetables at retail level. *J. Microbiol. Biotech.* 20, 391–396. doi: 10.4014/jmb.0908.08009

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C., 2010. An Overview of food borne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotech. Adv.* 28, 232–254. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.

Ward, L. N., Bej, A. K., 2006. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl Environ Microbiol.* 72(3), 2031–2042. doi: 10.1128/AEM.72.3.2031-2042.2006

Zarei, M., Borujeni, M. P., Jamnejad, A., Khezzadeh, M., 2012. Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control* 25, 107–109. doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.024

Zhang, L., and Orth, K., 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 70–77. doi:10.1016/j.mib.2013.02.002