

Simone Moraes Raszl

***VIBRIO VULNIFICUS* EM OSTRAS (*CRASSOSTREA GIGAS*) EM
SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E
COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE MÉTODOS
MICROBIOLÓGICOS DE DETECÇÃO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Cleide R. Werneck Vieira.

Coorientadora: Profa. Dra. Rachel T. Noble.

Florianópolis
2016

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

Raszl, Simone Moraes

Vibrio vulnificus em ostras (*Crassostrea gigas*) em Santa Catarina : caracterização genotípica e comparação da eficácia de métodos microbiológicos de detecção / Simone Moraes Raszl ; orientadora, Cleide Rosana Werneck Vieira ; coorientadora, Rachel T. Noble. - Florianópolis, SC, 2016. 199 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. *Vibrio vulnificus*. 3. ostras. 4. diagnóstico. 5. *Vibrio parahaemolyticus*. I. Vieira, Cleide Rosana Werneck. II. Noble, Rachel T.. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

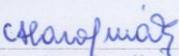
***Vibrio vulnificus* EM OSTRAS (*Crassostrea gigas*) EM SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE DETECÇÃO**

Por

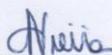
SIMONE MORAES RASZL

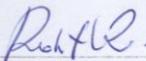
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

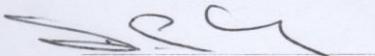
Florianópolis, 09 de agosto de 2016

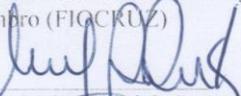

Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

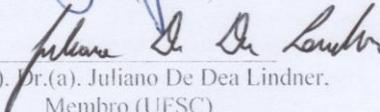
Banca Examinadora:


Prof.(a). Dr.(a). Cleide Rosana Werneck Vieira,
Orientador (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Roberta Juliano Ramos,
Membro (Estacio de Sá)


Prof.(a). Dr.(a). Dália dos Prazeres Rodrigues,
Membro (FIGCCKUZ)


Prof.(a). Dr.(a). Mercedes Gabriela Ratto Reiter,
Membro (FURB)


Prof.(a). Dr.(a). Juliano De Dea Lindner,
Membro (UFSC)


Prof.(a). Dr.(a). Elaine Schwinden Prudêncio,
Membro (UFSC)

Aos meus pais, Edson e Nilza.
Ao meu esposo Luiz, e aos meus
filhos Helena e Otávio.

AGRADECIMENTOS

Faltam palavras, neste momento, para expressar a gratidão a todos aqueles que me apoiaram ao longo deste percurso. Pessoas que contribuíram com seu tempo, com atitudes, com palavras de apoio, e mesmo aquelas que simplesmente acreditaram em mim, que vibraram comigo em cada etapa vencida. Difícil nomear cada pessoa que colaborou, mas quero registrar um especial agradecimento (e quem sabe até um pedido de desculpas), aos meus filhos Helena e Otávio, e ao meu esposo, Luiz, que fez muito mais que incentivar, sempre me apoiando para sempre seguir em frente e vencer cada obstáculo que surgia.

Agradeço a minhas orientadoras Dra. Cleide R. V. Werneck e Dra. Rachel T. Noble, pela confiança e pelas contribuições. Ao Dr. Brett Froelich agradeço especialmente por todos os ensinamentos. Envio um agradecimento especial a toda a equipe do IMS/UNC, que me acolheu com tanto carinho, especialmente Denene e Emelie, sempre prontas a ajudar. Agradeço às minhas colegas do PGCAL: Clarissa, Helen, Marília, Karin, e ao meu colega Norton, pelo companheirismo e apoio. Em especial, agradeço à Bruna, pela ajuda e apoio.

Não posso deixar de citar pessoas como Prof. Sérgio Roberto Arruda e Dra. Gláucia Aragão, pelo apoio e incentivo, à Dr. Teresa Camou, pelas relevantes informações, e ao Dr. Enrique Perez por disponibilizar a rede de contatos para coleta de informações. Agradeço à EPAGRI, pela cessão de amostras e pelo apoio logístico na coleta.

Quero registrar meu muito obrigada à Dra. Roseane Fett e ao querido Sérgio, sempre prontos a auxiliar em cada etapa.

Tenho muito a agradecer à minha família Pimentel, em especial à Da. Glaura, ao Lauro e à Joseane, por tanto carinho e apoio em todos estes anos de estudo.

E, um agradecimento muito especial a meus pais, Edson e Nilza, sempre ao meu lado, mesmo na distância física, e que sempre me ensinaram a correr atrás dos sonhos, por mais complicados que pudessem parecer, por me ensinarem os valores que hoje transmito aos meus filhos. Muito obrigada!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

(Marie Curie, 1921)

RESUMO

Vibrio vulnificus é um habitante natural de ambientes marinhos que pode infectar seres humanos através de ferimentos na pele ou pelo consumo de frutos do mar, especialmente ostras consumidas cruas ou mal cozidas. A bactéria pode atravessar a barreira intestinal e alcançar a corrente sanguínea causando septicemia, que pode levar à morte. A hipótese científica deste estudo foi a de que existem cepas potencialmente patogênicas de *V. vulnificus*, identificadas pelo gene *vcgC*, nas ostras produzidas no litoral de Santa Catarina. Os objetivos desta tese foram verificar a ocorrência cepas de *V. vulnificus* com potencial patogenicidade em ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas em Santa Catarina; realizar estudo retrospectivo inédito sobre presença de *V. vulnificus* e de *V. parahaemolyticus* na América do Sul; e comparar a performance dos meios de cultivo microbiológico mais comuns para detecção de *V. vulnificus* quanto a sua capacidade de isolamento e enumeração. A hipótese foi confirmada na análise das amostras coletadas, com confirmação por PCR, indicando a presença de cepas potencialmente patogênicas de *V. vulnificus*. O estudo de revisão indicou que as infecções causadas por *V. parahaemolyticus* tem sido mais fortemente relacionadas à ingestão de alimentos de origem marinha e mais frequentes na costa do Oceano Pacífico. Por outro lado, *V. vulnificus* é mais frequentemente adquirido por contato de lesões de pele e sua presença é mais comum na costa do Oceano Atlântico. Além disso, o estudo indicou que o fenômeno *El Niño* exerce influência no aumento de casos de *V. parahaemolyticus* na costa do Pacífico. Entretanto, são necessários mais estudos para confirmar a importância de fatores ambientais na presença e virulência da bactéria nesta região. No Brasil, os casos de infecções causadas por *V. vulnificus* são restritos basicamente às regiões sul e sudeste, exceto por um caso recente em 2016, na região nordeste do Brasil. Na análise das amostras coletadas, o estudo revelou uma baixa incidência (4%) de *V. vulnificus* entre as amostras de ostras (*C. gigas*) durante os meses de outubro/2014 a janeiro/2015, confirmadas por PCR através dos genes *vcg*. Esta baixa incidência pode ser explicada pela alta salinidade na região, que ultrapassa os valores de 34‰. Na análise da performance dos meios usando cepas puras de *V. vulnificus* de genótipos conhecidos *vcgC* e *vcgE*, todos os meios analisados apresentaram performance satisfatória. Com relação à avaliação da performance dos meios para isolamento e

enumeração de *V. vulnificus* em amostras ambientais, o meio CPC+ apresentou a melhor performance. Assim, mesmo tendo em conta a ausência de relatos de casos de infecção humana em Santa Catarina e os fatores ambientais citados, é fundamental a criação de um programa de monitoramento contínuo para avaliar a presença da bactéria, assim como a adoção de um procedimento de comunicação para pessoas portadoras de condições predisponentes e para profissionais de saúde, para que possam orientar seus pacientes e que possam realizar o diagnóstico e consequente tratamento de pessoas acometidas, com a adoção de metodologias mais precisas, rápidas e específicas para detecção de cepas patogênicas, como a detecção do gene *vcg* por PCR, especialmente no diagnóstico de casos suspeitos, garantindo maior precisão e eficácia de tratamento.

Palavras-chave: *Vibrio vulnificus*. *Crassostrea gigas*. Diagnóstico. PCR.

ABSTRACT

Vibrio vulnificus is a natural inhabitant of marine environments that can infect humans through skin wounds or seafood ingestion, especially raw or undercooked shellfish. The bacteria can cross the intestinal barrier and reach the blood stream causing sepsis that can lead to death. The scientific hypothesis of this study was that there are potentially pathogenic strains of *V. vulnificus*, identified by *vcgC* gene, on the oysters produced in the coast of Santa Catarina. The objectives of this thesis were to assess the occurrence of potentially pathogenic *V. vulnificus* strains in oysters (*Crassostrea gigas*) produced in Santa Catarina; to achieve unprecedented retrospective study on the presence of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in South America; and compare the performance of the most common media for microbiological culture used to detect *V. vulnificus* as its isolation and enumeration capacity. The hypothesis was confirmed through the analysis of samples, confirmed by PCR. The review indicated that the infections caused by *V. parahaemolyticus* have been more closely related to the ingestion of seafood and more frequent in the Pacific Ocean. On the other hand, *V. vulnificus* is most often acquired by contact of skin lesions and their presence is more common in the Atlantic Ocean. In addition, the study indicated that the *El Niño Southern Oscillation* influences the increase in cases of *V. parahaemolyticus* on the Pacific coast. However, more studies are needed to confirm the importance of environmental factors in the presence and virulence of the bacteria in this region. In Brazil, cases of infection caused by *V. vulnificus* are basically restricted to the southern and southeastern areas, except for a recent case in 2016, in northeastern Brazil. The study revealed a low incidence (4%) of *V. vulnificus* between oyster samples (*C. gigas*) produced in Santa Catarina during the months of October/2014 to January/2015, confirmed by PCR using *vcg* genes. This low rate can be explained by high salinity in the region, which exceeds 34‰. In the media performance research using *V. vulnificus* pure strains with known *vcgC* and *vcgE* genotypes, when considering the performance for total *V. vulnificus*, all analyzed media showed satisfactory performance. Regarding the assessment of the performance of the media for *V. vulnificus* isolation and enumeration in environmental samples, CPC+ had the best performance. Thus, considering the absence of reported cases of human infection in Santa Catarina and the environmental factors mentioned, the creation of a continuous monitoring program is critical to assess the presence of

bacteria, as well as the adoption of a communication procedure for people with predisposing conditions and health professionals so that they can guide their patients and can make the diagnosis and subsequent treatment of affected people, and to adopt more precise methodologies, for rapid and specific detection of pathogenic strains such as the detection of the *vcg* gene by PCR, especially in the case of diagnosis of suspected cases, ensuring greater accuracy and efficacy of treatment.

Keywords: *Vibrio vulnificus*. *Crassostrea gigas*. Diagnosis. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Aparência externa da ostra do Pacífico (<i>C. gigas</i>).....	30
Figura 1.2 Estruturas anatômicas da ostra.....	32
Figura 1.3 Produção de ostras comercializadas por Santa Catarina entre 1991 e 2014 (t)	34
Figura 1.4 <i>V. vulnificus</i> em microscopia eletrônica de varredura (mag. 26367x)	31
Figura 1.5 Mapas de temperatura (°C) de superfície da água do mar no litoral do estado de Santa Catarina, em janeiro, nos anos de 2012, 2013, 2014 e 2015.....	41
Figura 1.6 Joiner, o paciente descrito com fasciíte necrosante, relatado por John Bell (<i>The principles of surgery</i> , 1801).....	48
Figure 1 Map of <i>V. parahaemolyticus</i> reports in South American environmental samples with tags showing the year of occurrence.	65
Figure 2 Map of <i>V. parahaemolyticus</i> cases and outbreaks in South America, with tags showing the year of occurrence.....	66
Figure 3 Map of <i>V. vulnificus</i> reports from environmental samples (blue tags), and cases and outbreaks (red tags) in SA, with tags showing the year of occurrence.....	84
Figura 3.1 Fluxograma da metodologia de isolamento de <i>V. vulnificus</i> de acordo com o FDA/EUA.....	114
Figura 3.2 Fluxograma da metodologia de isolamento de <i>V. vulnificus</i> de acordo com ISO/TS 21872-2.....	115
Figura 3.3 Placa com meio agar CPC+ e colônias amarelas típicas de <i>V. vulnificus</i> com halo amarelo.....	118
Figura 3.4 Placa com ágar VVX e colônias típicas de <i>V. vulnificus</i> , de coloração azul devido à fermentação do X-Gal	119
Figura 3.5 Placa de ágar SDS com colônias típicas de <i>V. vulnificus</i> em coloração azulada.....	120
Figura 3.6 Concentrações (U/L) de antibióticos colistina e polimixina B nos meios de cultivo CPC, CPCm, CPC+, CC, VVX, SDS e VVM...	121
Figura 3.7 Placas de CAV com colônias típicas de <i>V. parahaemolyticus</i> (púrpura) e <i>V. vulnificus</i> (azul).....	122
Figura 3.8 Método do plaqueamento triplo	126
Figura 3.9 Pontos de coleta de ostras e água na Carolina do Norte, EUA.....	133

Figura 3.10 Performance dos meios de cultivo (log UFC/g) no isolamento e enumeração de cepas <i>vcgC</i> de <i>V. vulnificus</i> (média e erro padrão da média).....	139
Figura 3.11 Performance dos meios de cultivo (log UFC/g) no isolamento e enumeração de cepas <i>vcgE</i> de <i>V. vulnificus</i> (média e erro padrão da média).....	139
Figura 3.12 Performance dos meios de cultivo (log UFC/g) no isolamento e enumeração de <i>V. vulnificus</i> total a partir do plaqueamento de cepas puras (média e erro padrão da média)	141
Figura 3.13 Performance dos meios de cultivo com uso de amostras ambientais, naturalmente contaminadas, com confirmação por PCR (média e erro padrão da média).....	143
Figura 3.14 Resultado percentual da genotipagem das amostras positivas por PCR.....	146
Figura 4.1 Áreas de coleta de ostras para pesquisa de <i>V. vulnificus</i> em ostras, Santa Catarina, Brasil.	157
Figura 4.2 Salinidade (‰) nos pontos de coleta de out/2014 a jan/2015....	163
Figura 4.3 Análise da variação da salinidade (‰), média e erro padrão da média, por pontos de coleta.....	163
Figura 4.4 Acumulado pluviométrico (mm) nos 3 dias anteriores à coleta de amostras entre out/2014 a jan/2015.	164
Figura 4.5 Temperatura superficial da água do mar nos pontos de coleta de out/2014 a jan/2015.....	165
Figura 4.6 Contagem log UFC/g e confirmação por PCR das amostras coletas em Santa Catarina (out/2014 a jan/2015.....	167

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 Números de casos e mortes causadas por <i>V. vulnificus</i> nos Estados Unidos entre 2008 e 2012.....	39
Quadro 3.1 Identificação genotípica e origem das cepas de <i>V. vulnificus</i> utilizadas	132
Quadro 3.2 Primers usados na confirmação genotípica das colônias típicas.....	135
Quadro 4.1 Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de ostras..	158
Quadro 4.2 Protocolos e primers usados nas reações de PCR para identificação de <i>Vibrio</i> sp e identificação de cepas de <i>V. vulnificus</i> nas amostras de ostras.....	153

LISTA DE TABELAS

Table 1 Reports of <i>V. parahaemolyticus</i> in environmental and seafood samples in South America.....	72
Table 2 Reports of <i>V. parahaemolyticus</i> incidence in isolated human cases and outbreaks in South America.....	77
Table 3 Reports of <i>V. vulnificus</i> incidence in environmental and seafood samples in SA.....	85
Table 4 Reports of <i>V. vulnificus</i> incidence in isolated human cases and outbreak in SA.....	87
Tabela 3.1 Comparação de métodos de cultivo microbiológico usados para isolamento e enumeração de <i>V. vulnificus</i>	124
Tabela 3.2 Valor médio e erro padrão da média (SEM) das contagens de cada genótipo de <i>V. vulnificus</i> e de <i>Vibrio</i> total (log UFC/g).....	137
Tabela 3.3 Percentual comparativo de recuperação de cepas <i>vcgC</i> e <i>vcgE</i> de <i>V. vulnificus</i> em TCBS, SDS, VVX, CAV e CPC+ em relação ao meio HI.....	142
Tabela 3.4 Resultados da análise de performance usando amostras ambientais de ostras e água do mar, em todos os meios (log UFC/g em meios e confirmação por PCR), média e erro padrão da média	144
Tabela 3.5 Resultados % de recuperação dos meios analisados.....	145
Tabela 4.1 Valores médios de salinidade e desvio padrão por ponto de coleta.....	164
Tabela 4.2 Resultados das contagens em placa e PCR: valor médio de log UFC/g em cada data de coleta (média \pm erro padrão da média)....	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAV: Meio ChromAgar Vibrio
CDC: *Center for Disease Control and Prevention*
CPC+: Ágar Colistina Plimixina Celobiose
CRP: Sistema Receptor Proteína
DMSO: Dimetil Sulfóxido
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos (dNTPs)
ENSO: *El Nino Southern Oscillation*
EUA: Estados Unidos da América
FAO: *Food and Agriculture Organization*
HI: *Ágar heart infusion*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMS UNC: *Institute of Marine Sciences / University of North Carolina at Chapel Hill*
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia
LPS: lipopolissacarídeo
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura
NCEP/MMAB: *National Center for Environmental Prediction / Marine Modeling and Analysis Branch*
NMP: Número Mais Provável
NOAA: *National Oceanic and Atmospheric Administration*
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PNCMB: Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves
rep-PCR: PCR repetitiva palindrômica extragênica
rRNA: RNA ribossômico
SA: *South America*
TCBS: Ágar Tiosulfato, Citrato, BÍlis e Sacarose
UV: Luz Ultra-Violeta
VBNC: Células Viáveis, Mas Não Cultiváveis
VVX: Ágar *Vibrio vulnificus* X-Gal
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
1. OBJETIVOS	26
Objetivo Geral	26
Objetivos Específicos	26
CAPÍTULO 1: <i>VIBRIO VULNIFICUS</i>: IMPORTÂNCIA PARA A SEGURANÇA DE ALIMENTOS DE ORIGEM MARINHA	29
1.1. INTRODUÇÃO	29
1.2. A OSTRA DO PACÍFICO: <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	29
1.2.1. Anatomia da <i>C. gigas</i>	30
1.2.2. Panorama da produção e consumo da ostra no mundo	32
1.2.3. Importância econômica da <i>C. gigas</i> para o estado de Santa Catarina	33
1.3. A BACTÉRIA <i>VIBRIO VULNIFICUS</i>	35
1.3.1. Células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC)	36
1.3.2. Fatores de virulência	37
1.4. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR <i>V. VULNIFICUS</i>	40
1.4.1. Distribuição mundial de <i>V. vulnificus</i>	40
1.4.2. Etiologia da infecção causada por <i>V. vulnificus</i>	45
1.4.3. Relatos de casos e surtos de <i>V. vulnificus</i>	47
1.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 2: A REVIEW - <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> AND <i>VIBRIO VULNIFICUS</i> IN SOUTH AMERICA: WATER, SEAFOOD, AND HUMAN INFECTIONS	59
CAPÍTULO 3: COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE MEIOS DE CULTIVO PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>V.</i> <i>VULNIFICUS</i>	111
3.1. INTRODUÇÃO	111
3.2. METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE <i>V. VULNIFICUS</i>	112
3.2.1 Metodologias oficiais	112
3.2.2 Metodologia do <i>Bacteriological Analytical Manual</i> (BAM/FDA) (KAYSNER; DEPAOLA, 2004)	113
3.2.3 Metodologia ISO/TS 21872-2: 2007(E) (ISO, 2007).....	115
3.2.4 Meios de cultivo para isolamento e enumeração de <i>V. vulnificus</i> 116	
3.2.5 Método de plaqueamento triplo	126
3.2.6 Confirmação Bioquímica	127
3.2.7 Métodos imunológicos	127
3.2.8 Métodos moleculares	128

3.3	MATERIAL E MÉTODOS	130
3.3.1	Meios de cultivo	130
3.3.2	Preparo das amostras de cepas puras.....	131
3.3.3	Preparo das amostras ambientais	133
3.3.4	Confirmação genotípica das amostras ambientais	135
3.4	RESULTADOS.....	136
3.4.1	Resultados da análise de performance usando cepas puras de <i>V. vulnificus</i> 136	
3.4.2	Resultados da análise de performance usando amostras ambientais de ostras e água do mar	142
3.5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	147
3.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
	REFERÊNCIAS.....	150

CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *V. VULNIFICUS* COLETADOS DE OSTRAS (*C. GIGAS*) CULTIVADAS EM SANTA CATARINA..... 155

4.1.	INTRODUÇÃO	155
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS	156
4.2.1.	Área de estudo	156
4.2.2.	Coleta de ostras	158
4.2.3.	Coleta de dados de temperatura e salinidade da água do mar 158	
4.2.4.	Preparo dos meios de cultivo.....	159
4.2.5.	Preparo das amostras.....	159
4.2.6.	Metodologia de PCR	160
4.2.7.	Análise estatística	162
4.2.8.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	162
4.3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	170
	REFERÊNCIAS.....	171
	CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE.....	177
	RECOMENDAÇÕES.....	181
	ANEXO A.....	183

INTRODUÇÃO

Vibrio vulnificus é um habitante natural de ambientes marinhos que pode infectar seres humanos através de ferimentos na pele ou pelo consumo de frutos do mar, especialmente ostras consumidas cruas ou mal cozidas. Apesar da infecção estar associada a indivíduos do sexo masculino, com doenças crônicas pré-existentes ou imunocomprometidos, acometendo um número relativamente baixo de casos, a bactéria pode atravessar a barreira intestinal e alcançar a corrente sanguínea causando septicemia que pode levar à morte. Mesmo sendo responsável por um reduzido número de casos, sua importância se deve ao fato de apresentar uma taxa de mortalidade de 50%, que é uma das maiores entre as doenças de transmissão alimentar (WHO/FAO, 2005).

A importância desta bactéria não pode ser ignorada no Estado de Santa Catarina, que é responsável por 98% da produção nacional de moluscos bivalves (ostras, mexilhões e vieiras) cultivados, sendo comercializados e consumidos em todo o território nacional (IBGE, 2014). O monitoramento dos moluscos bivalves é realizado através do Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), desde 2013. Entretanto, o programa não inclui a análise de *Vibrio* spp nas ações de monitoramento previstas. O programa foi implementado recente e os estudos dele derivados aliados a outras ações, como as do grupo de monitoramento de moluscos bivalves de Santa Catarina com certeza trarão mais informações relevantes para o desenvolvimento da atividade de maricultura no estado e especialmente para a segurança dos consumidores e produtores.

Também é importante destacar que as mudanças climáticas têm causado, entre outras alterações, um aumento da temperatura da água do mar e variações na salinidade, que podem afetar diretamente o desenvolvimento de microbiota antes limitada pela temperatura mais baixas, como é o caso do *V. vulnificus*, com possível aumento de casos e surtos (MARQUES et al., 2010; MARTINEZ-URTAZA et al., 2010; TIRADO et al., 2010).

Estudos anteriores já isolaram *V. vulnificus* em ostras produzidas no litoral de Santa Catarina (RAMOS, 2007; RAMOS, 2013; SILVA, 2003). O estudo realizado por Silva (2003) identificou várias espécies de vibrios no litoral catarinense, sendo que *V. vulnificus* foi a espécie encontrada em maior número. Entretanto os estudos citados, assim como outros realizados no Brasil (MATTE et al., 1994; MENDES et al.,

2009; OLIVA, 2012; COSTA, ARAUJO e VIEIRA, 2013) e em outros países da América do Sul (MUNOZ et al.; 2008; LOPEZ et al., 2010) não realizaram a identificação genotípica de cepas patogênicas de *V. vulnificus* entre as amostras, sendo assim, este estudo é o primeiro relato de identificação genotípica de cepas de *V. vulnificus* em ostras em Santa Catarina, e inclusive na América do Sul.

Os resultados gerados por este estudo contribuirão para o avanço do conhecimento do aspecto sanitário dos moluscos, pois a identificação da incidência de cepas potencialmente patogênicas de *V. vulnificus* nas ostras produzidas no estado de Santa Catarina poderá auxiliar nas decisões futuras dos órgãos responsáveis pela garantia da qualidade e sanidade deste alimento. Além disso, o estudo indica a necessidade de alertar consumidores suscetíveis sobre o cuidado com este tipo de alimento, para que evitem o consumo de ostras cruas ou mal passadas, prevenindo o aparecimento de infecções e mortes causadas por *V. vulnificus*.

A hipótese científica proposta neste estudo foi a de que existem cepas potencialmente patogênicas de *V. vulnificus*, identificadas pelo gene *vcgC*, nas ostras produzidas no litoral de Santa Catarina.

1. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral foi verificar a ocorrência de cepas de *V. vulnificus* com potencial patogenicidade em ostras (*C. gigas*) produzidas no litoral de Santa Catarina.

Objetivos Específicos

- a) Realizar estudo retrospectivo inédito sobre presença de *V. vulnificus* e de *V. parahaemolyticus* na América do Sul;
- b) Avaliar a presença de cepas potencialmente patogênicas e não patogênicas de *V. vulnificus* em ostras (*C. gigas*) produzidas no litoral de Santa Catarina, através da caracterização genética pelos genes *vcgC* e *vcgE*, respectivamente;
- c) Comparar a performance dos meios de cultivo microbiológico mais comuns para detecção de *V. vulnificus* quanto a sua capacidade de isolamento e enumeração.

Este trabalho está dividido em quatro capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre *V. vulnificus* em ostras e sua importância para a segurança de alimentos. No segundo capítulo é

demonstrado um estudo retrospectivo inédito de todos os registros de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* na América do Sul, em amostras ambientais, casos isolados e surtos registrados. O terceiro capítulo relata o estudo de performance realizado com cinco diferentes meios de cultivo seletivos para isolamento e enumeração de *V. vulnificus*. No quarto capítulo é apresentado o estudo realizado no litoral de Santa Catarina para pesquisa de *V. vulnificus* em moluscos bivalves – ostras (*C. gigas*), com caracterização genética pela análise da presença do gene *vcg*. Finalmente, são apresentadas as considerações finais deste estudo e recomendações.

CAPÍTULO 1: *VIBRIO VULNIFICUS*: IMPORTÂNCIA PARA A SEGURANÇA DE ALIMENTOS DE ORIGEM MARINHA

1.1. INTRODUÇÃO

Vibrio vulnificus é um bacilo halofílico, móvel, Gram-negativo, não formador de esporos e capaz de causar uma infecção muito grave em indivíduos suscetíveis. Os sintomas da doença podem variar desde uma gastroenterite até uma septicemia primária e fasciíte necrosante, com uma taxa de mortalidade superior a 50%. A infecção resulta do consumo ou manipulação de frutos do mar contaminados ou pela exposição de ferimentos ou lesões de pele à água do mar contaminada (IGBINOSA e OKOH 2008; HORSEMAN e SURANI 2011). A bactéria apresenta cepas potencialmente patogênicas e não patogênicas, diferenciadas geneticamente pelos genes *vcgC* (*clinical*) e *vcgE* (*environmental*), respectivamente. Entretanto, os mecanismos envolvidos com a patogenicidade não estão bem claros, e parece que há uma inter-relação entre mais de um fator. Esta variação gênica relacionada à patogênese se reflete na variedade de métodos de cultivo, bioquímicos e moleculares de identificação da bactéria.

O objetivo deste capítulo foi apresentar um estudo sobre o micro-organismo *V. vulnificus* e o alimento mais comumente envolvido nos surtos e casos relatados – a ostra (*Crassostrea gigas*), além de fazer um levantamento geral da incidência no mundo, a epidemiologia da doença e relatos de casos.

1.2. A OSTRA DO PACÍFICO: *CRASSOSTREA GIGAS*

A classificação do gênero *Crassostrea* segue a seguinte ordem filogenética (ANGELL, 1986):

- Reino – Animalia
- Filo – Mollusca
- Classe – Bivalvia
- Ordem – Ostreoida
- Família – Ostreidae
- Gênero: *Crassostrea*

Figura 1.1 Aparência externa da ostra do Pacífico (*C. gigas*)



Fonte: http://fr.wikipedia.org/wiki/Crassostrea_gigas

A espécie *C. gigas* é originária do leste da Ásia, especificamente China e Coreia, além de ser endêmica no Japão. Atualmente apresenta-se distribuída mundialmente, podendo ser encontrada desde os Estados Unidos da América (EUA) e Canadá até América do Sul, no Brasil, Chile e Argentina; na Europa, também desde a Noruega até Portugal e em países mediterrâneos (HELM, 2005; AREIAS, 2012). Seu habitat natural inclui zonas costeiras protegidas e estuarinas, podendo também ser encontrada em regiões de mar aberto (HELM, 2005).

A espécie *C. gigas* desenvolve-se em condições de salinidade que podem variar entre 2 até 41‰, mas preferem valores em torno de 20 a 25‰. O intervalo de temperatura para seu desenvolvimento é muito amplo, de -1,8°C a 35°C, tendo como intervalo ideal de temperatura entre 11°C e 25°C (ANGELL, 1986).

1.2.1. Anatomia da *C. gigas*

A ostra possui duas valvas cujo formato pode variar conforme o ambiente onde se encontre. Possui um sistema digestivo completo e um sistema nervoso formado por um gânglio cefálico e outro visceral, além de cordões nervosos ventrais. O sistema circulatório é aberto, com o coração constituído por um ventrículo e duas aurículas, veias, artérias e hemolinfa (MIOSSEC et al., 2009).

A valva direita ou superior é mais plana; a esquerda ou inferior é mais côncava e é através desta que o animal se fixa no substrato. A concha possui quatro camadas, descritas a seguir:

Periostracum: fina camada externa membranosa de constituição proteica que se desgasta muito rapidamente (Figura 1.1).

Camada prismática: é formada por cristais de calcita.

Camada subnacrada: capa interna dura e brilhante que fica em contato com a parte mole do corpo do indivíduo.

Hipostracum: fica na região de implantação do músculo adutor.

O músculo adutor é responsável pela união das valvas, atuando contra a pressão exercida pelo ligamento, ou seja, é responsável pelo fechamento da concha quando está contraído e abertura das valvas quando o músculo relaxa.

As brânquias são estruturas compostas por filamentos e são responsáveis pela respiração e pela filtração do alimento. As partículas de alimento em suspensão na água do mar são capturadas por esses filamentos e em seguida são levadas até os palpos labiais onde é feita uma seleção, para posteriormente serem levadas à boca.

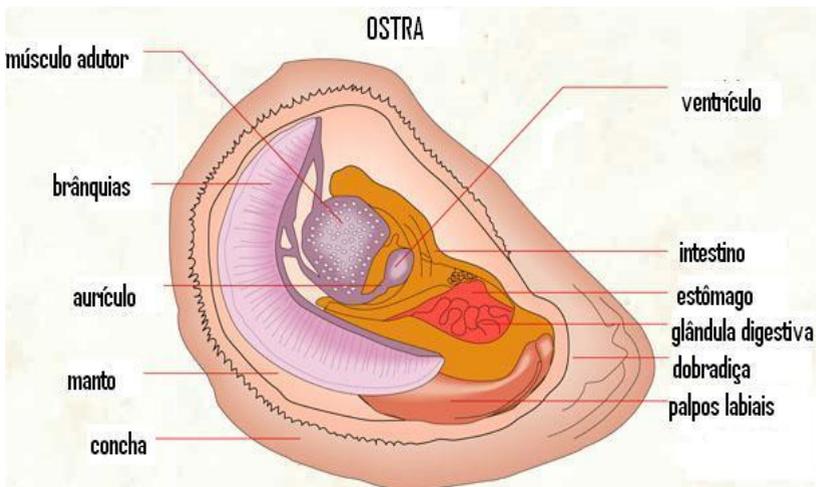
A camada de tecido que recobre as partes moles de ambos os lados do corpo, exceto na região do músculo adutor, é o manto. Localiza-se abaixo da concha e contém células responsáveis pela deposição de carbonato de cálcio e formação da concha, bem como células com função sensorial. A borda do manto é também responsável pelo controle do fluxo de água que passa pelo interior do organismo.

Assim como as demais espécies de moluscos bivalves, as ostras são organismos filtradores e alimentam-se de partículas em suspensão na coluna de água, que tanto podem ser orgânicas como inorgânicas. Estas partículas são basicamente compostas por fitoplâncton, mas também podem conter micro-organismos e outras substâncias dissolvidas, como aminoácidos e açúcares, entre outros (DUPUY et al., 2000; MIZUTA, 2010). Esta forma de alimentação por filtração faz com que a ostra retenha partículas de eventuais contaminantes presentes na água, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. A taxa de filtração chega a 10 litros/hora/grama de tecido seco (FROELICH e NOBLE, 2014). As partículas muito grandes e o excesso de alimento são eliminados como pseudo-fezes e as partículas adequadas são levadas a boca. Em seguida o alimento é ingerido no estômago e absorvido pelo intestino, sendo que o alimento não aproveitado é eliminado através do ânus.

Quanto ao sistema reprodutivo, é constituído pelas gônadas, onde são produzidas e armazenadas as células sexuais (espermatozoides ou ovócitos) e pelos gonodutos, por onde os gametas são liberados para o

meio externo. As ostras do gênero *Crassostrea* são hermafroditas rítmicas sequenciais com fecundação externa. Primeiramente desenvolvem-se como macho e depois como fêmea, que podem voltar a ser machos dependendo de fatores ambientais (ANGELL, 1986; MIOSSEC et al., 2009). A Figura 1.2 apresenta um esquema das estruturas anatômicas da ostra citadas anteriormente.

Figura 1.2 Estruturas anatômicas da ostra



Fonte: <http://www.neema.ufc.br/Biologia%20da%20ostra.html>

A taxa de crescimento das espécies do gênero *Crassostrea* depende, além da espécie, de diversos fatores, como a distribuição geográfica, o clima, a localização na zona subtidal ou intertidal e as diferenças genéticas entre indivíduos (HELM e BOURNE, 2004). O tamanho comercial da espécie *C. gigas* é de 8 cm, que é atingido em cerca de 7 a 8 meses de cultivo no estado de Santa Catarina no Brasil, devido às condições encontradas no Estado, enquanto na França, para a mesma espécie, o tempo necessário para alcançar o tamanho comercial é de aproximadamente dois anos (MIZUTA, 2010).

1.2.2. Panorama da produção e consumo da ostra no mundo

A produção anual de bivalves é cerca de 4,6 milhões de toneladas de ostras. A China é o maior produtor e consumidor do mundo, com

cerca de 80% do total produzido, seguida por Japão, Coreia do Sul e França (FAO, 2010).

A maioria da produção é absorvida pelos mercados locais e é suplementada por importação de países vizinhos e parceiros comerciais. A preferência do consumidor pela ostra fresca, e sua vida útil curta limitam a comercialização global de produto fresco em larga escala. Produtos processados como ostras enlatadas, congeladas e embaladas à vácuo existem, mas representam uma parcela muito pequena do comércio deste alimento (FAO, 2010).

1.2.3. Importância econômica da C. gigas para o Estado de Santa Catarina

A maricultura refere-se à atividade de cultivo de moluscos, algas, camarões, crustáceos e peixes. Sua importância tem aumentado em países com amplas faixas litorâneas, sendo uma fonte de proteína animal em países como China, Espanha, Nova Zelândia, Chile, Japão, Coreia, Itália e Brasil (SOUZA FILHO, 2003).

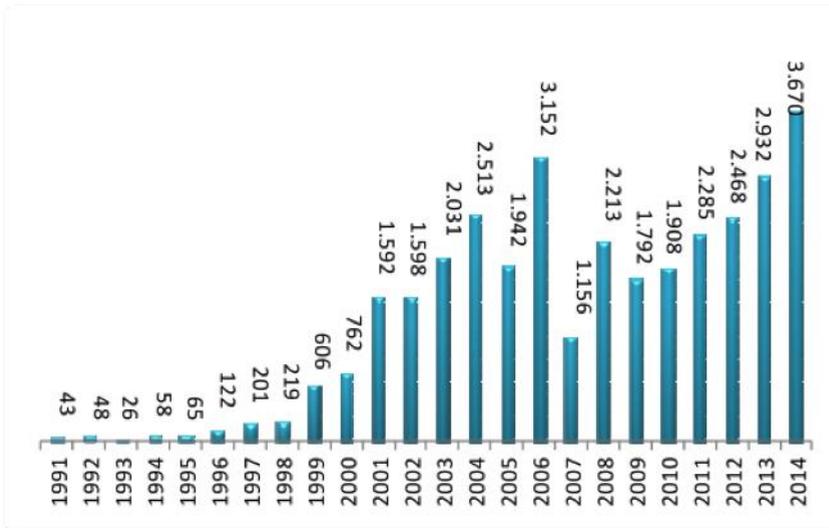
No Brasil, o cultivo de moluscos marinhos (ostras e mexilhões), a malacocultura destaca-se nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Santa Catarina, que lidera a produção nacional. Isso se dá pelas condições favoráveis ao cultivo, como as baías, enseadas e estuários protegidos pela geografia costeira de Santa Catarina, além da qualidade da água nos pontos de produção (SOUZA FILHO, 2003)

A produção de ostras e mexilhões em no litoral catarinense concentra-se em uma faixa que inclui 12 municípios, estendendo-se desde São Francisco do Sul (norte do estado) até Palhoça (região centro-leste) (IBGE 2013; SANTOS et al., 2013).

O surgimento da malacocultura em Santa Catarina surgiu como alternativa à pesca artesanal que se encontrava em declínio depois do crescimento da pesca industrial. Segundo dados do IBGE (2013), a ostreicultura em Santa Catarina responde por 98% da produção nacional. E de acordo com os dados de 2014, a produção total de moluscos, incluindo mexilhões, ostras e vieiras, que foram comercializados em Santa Catarina, foi de 21.553,6 toneladas. Este dado representa um aumento de 12,95% em relação a 2013. A comercialização de ostras no estado chegou a 3,670 toneladas, com aumento de 25,17% em relação a 2013, ultrapassando a produção de 2006 que era a maior registrada (Fig. 1.3). Considerando o total de ostras produzidas, 2.707,46 toneladas foram produzidas em Florianópolis. Observa-se, entretanto, que o potencial de produção de moluscos ainda é maior, uma vez apenas cerca de 30% da capacidade

aquícola tem sido explorada, o que significa que o potencial produtivo pode alcançar 71.256,9 toneladas por ano (SANTOS e COSTA, 2014).

Figura 1.3 Produção de ostras comercializadas por Santa Catarina entre 1991 e 2014 (t)



Fonte: Santos e Costa, 2014.

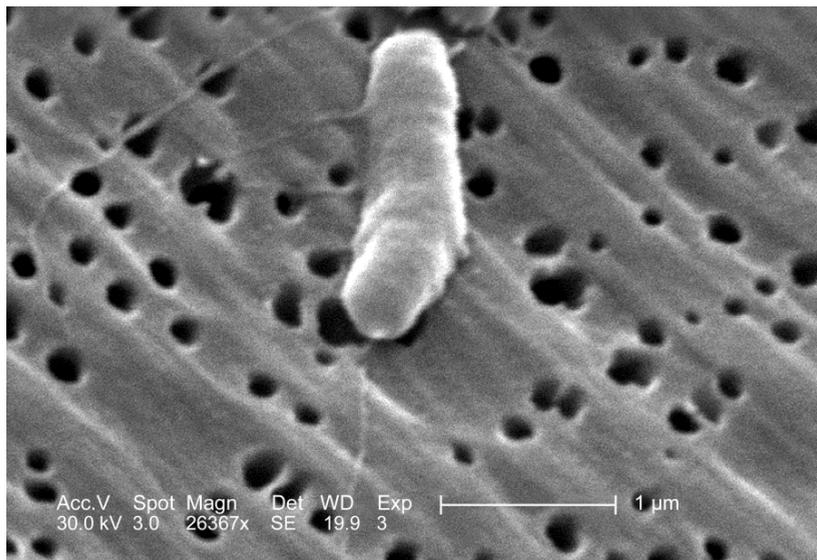
Segundo Santos e Costa (2014), os municípios que mais contribuíram para a produção total do Estado, em 2014, foram Florianópolis, com 2.707,46 toneladas; Palhoça, com 576 toneladas e São José, com 180,5 toneladas. Somados, estes municípios são responsáveis por cerca de 89% da produção estadual de ostras cultivadas. Em Florianópolis, o destaque da produção de ostras cabe à comunidade do Ribeirão da Ilha, com 83,4% da produção do município.

A maior parte das ostras produzidas é comercializada *in natura*, caracterizadas por alta perecibilidade e curta vida de prateleira, além de meio propício para desenvolvimento de patógenos. A vida de prateleira para moluscos frescos ou resfriados é de apenas três a cinco dias (PORTELLA, 2005), entretanto é comum observar a venda do molusco sem o resfriamento necessário.

1.3. A BACTÉRIA *VIBRIO VULNIFICUS*

O gênero *Vibrio* pertence à família Vibrionaceae, que possui várias espécies reconhecidamente patogênicas ao homem e entre as quais se destacam *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. As bactérias do gênero são bacilos halofílicos, Gram-negativos (Figura 1.4), com ou sem curvatura axial (Fig. 1.4), não formadores de esporos e facultativos quanto à presença de oxigênio (ALMEIDA et al., 2005), possuem motilidade em meio líquido devido a um único flagelo polar (IGBINOSA e OKOH, 2008; HORSEMAN e SURANI, 2011).

Figura 1.4 *V. vulnificus* em microscopia eletrônica de varredura (mag. 26367x)



Fonte: CDC. Foto de Janice Carr, 2005.
<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>.

A bactéria pode ser encontrada em ambientes marinhos costeiros ou estuários onde a temperatura varia entre 9 a 31°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento é de 18°C, e salinidade entre 15 a 25‰. A salinidade acima de 30‰ reduz a incidência de *V. vulnificus* independentemente da temperatura da água (HORSEMAN e SURANI,

2011). Wetz et al. (2013) realizaram um estudo na Carolina do Norte, nos EUA, durante quatro anos coletando água de superfície e de áreas mais profundas e somente detectaram a presença de *V. vulnificus* quando a temperatura estava acima de 20°C, além disso, observaram uma importante diminuição da incidência da bactéria nas amostras de água estuarina após um período de seca prolongada na região que levou a um aumento expressivo da salinidade da água aproximando-se de 30‰.

Com base em características bioquímicas, são conhecidos 3 biotipos de *V. vulnificus* responsáveis por causar doenças em seres humanos. O biotipo 1 é encontrado no mundo todo, em água salgada ou salobra; o biotipo 2 é mais restrito à criação de enguias (*Anguilla*) no Oriente e na Europa Ocidental; e o biotipo 3 foi associado ao cultivo de pescados frescos em Israel e é considerado um híbrido dos biotipos 1 e 2 (JONES e OLIVER, 2009; HORSEMAN e SURANI, 2011).

O biotipo 1 pode ser classificado geneticamente em duas cepas, aquelas isoladas geralmente de casos clínicos, conhecidas tipo C, e as relacionadas ao meio ambiente, tipo E, identificadas genotipicamente com base na presença dos genes *vcgC* e *vcgE*, respectivamente (JONES; OLIVER, 2009; ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005).

As espécies de *Vibrio* e outras muito próximas apresentam aspectos fenotípicos de difícil separação bioquímica. Muitos pesquisadores tem usado o sequenciamento do 16S rRNA para estudar relações filogenéticas em *Vibrionacea*. Entretanto, dentro do gênero *Vibrio*, muitas espécies possuem sequências de 16S rRNA quase idênticas, o que torna este método pouco útil na sua diferenciação (HOFFMAN *et al.*, 2010).

1.3.1. Células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC)

V. vulnificus, quando em baixas temperaturas (abaixo de 13°C), podem assumir um estado de dormência, o que faz com que adquiram maior resistência enquanto durarem estas condições. Este estado é conhecido como células viáveis mas não cultiváveis, cuja sigla em inglês é VBNC – *Viable But Non Cultivable*. Nesta condição as bactérias estão vivas, em menor tamanho e não crescem nos meios de cultivo normais sem um prévio enriquecimento para que retornem à condição normal (OLIVER, 2003; SILVA, 2003; OLIVER 2005).

As bactérias da espécie *V. vulnificus* são as mais conhecidas e estudadas no que se refere ao estado VBNC. Este fenômeno foi demonstrado experimentalmente e *in situ* por Oliver (1995; 2003;

2005). É importante destacar que as células em estado VBNC recuperam sua capacidade de virulência quando retornam à condição normal (OLIVER, 2005).

1.3.2. Fatores de virulência

V. vulnificus possui vários fatores de virulência que incluem estratégias de defesa como a neutralização de ácidos estomacais do hospedeiro além de mecanismos como a expressão de polissacarídeos capsulares, aquisição de ferro, citotoxicidade, motilidade e expressão de proteínas envolvidas em ataque e adesão (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009).

As cepas de *V. vulnificus* do tipo 1 possuem uma ilha genômica de 33kb, encontrada apenas nesta cepa, na qual estão muitos dos genes aparentemente relacionados com a patogenicidade em outros organismos, o que sugere que as cepas que possuem esta ilha genômica tenham um maior potencial patogênico (JONES; OLIVER, 2009).

Para que se entenda a patogenicidade de *V. vulnificus*, é importante destacar que indivíduos com distúrbios como doença hepática crônica, diabetes, hemocromatose, AIDS, imunocomprometidas, possuem maior suscetibilidade à infecção. Estima-se que pessoas com doença hepática crônica ou imunocomprometidas possuem 80 vezes maior chance de desenvolver a septicemia primária quando comparados àqueles sem as condições predisponentes (JONES; OLIVER, 2009; ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005).

Além dos mecanismos bacterianos citados, uma outra característica do hospedeiro, altamente relacionada com a infecção causada por *V. vulnificus*, é o alto teor de ferro sérico em indivíduos infectados. Não se sabe ao certo a quantidade de ferro necessária para a sobrevivência da bactéria (HORSEMAN; SURANI, 2011), mas um estudo realizado por Starks et al. (2006) demonstrou que roedores com excesso de ferro sérico apresentaram elevado crescimento das cepas *vcgC* enquanto Hor et al. (2000) encontraram uma diminuição da atividade de neutrófilos em animais com a mesma condição, resultando numa menor defesa do organismo infectado.

Entre os mecanismos de resistência do *V. vulnificus* podem ser destacados os seguintes:

Resistência ao ácido estomacal: O rápido aparecimento dos sintomas (1 a 7 horas após o consumo de ostras cruas) e a evolução da infecção indicam que *V. vulnificus* é capaz de driblar rapidamente a

resposta imune em organismos infectados. A primeira barreira encontrada pela bactéria é a acidez estomacal e a estratégia adotada por *V. vulnificus* parece ser a mesma adotada por outras bactérias Gram negativas, que neutralizam o baixo pH quebrando aminoácidos em aminas e CO₂ (JONES; OLIVER, 2009).

Resposta imune do hospedeiro: Assim que *V. vulnificus* passa pelo trato digestório e entra na corrente sanguínea encontra um dos primeiros fatores imunológicos inatos, o sistema complemento (HORSEMAN; SURANI, 2011). A ativação do sistema complemento pelo organismo infectado eleva o número de leucócitos e neutrófilos que atuam na fagocitose do invasor. Portadores de doença hepática crônica possuem menor atividade neutrofílica que pessoas saudáveis, e esta menor atividade possui relação inversamente proporcional à capacidade de fagocitose pelos neutrófilos, o que pode determinar a maior gravidade da infecção nesses pacientes. Além disso, os macrófagos também possuem papel fundamental no sistema de defesa, sem os quais não seria possível a resistência do organismo frente à bactéria, além da aparente capacidade desta de eliminar leucócitos (JONES; OLIVER, 2009).

Polissacarídeo capsular (CPS): *V. vulnificus* também apresenta sistemas de evasão dos mecanismos de defesa, o que se dá principalmente pela expressão superficial de CPS, que evita a fagocitose por macrófagos, além de conferir à bactéria resistência aos efeitos bactericidas do soro e de esconder estruturas bacterianas que poderiam ativar mecanismos imunológicos não específicos no hospedeiro. A cápsula é o fator de virulência reconhecido como essencial para a patogenicidade (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009).

Entre os mecanismos bacterianos diretamente relacionados ao dano celular e à citotoxicidade podem ser citados:

a) *vvhA*: é uma hemolisina extracelular que auxilia na liberação de ferro pela atividade hemolítica (HORSEMAN; SURANI, 2011) e responde, em parte, pela atividade citotóxica da bactéria, mas não é um fator obrigatório de virulência. A *vvhA* causa morte celular pela formação de poros na membrana celular, que leva à aumento de permeabilidade vascular e hipotensão, características da infecção causada por *V. vulnificus*. Entretanto estudos revelam que esta toxina parece ter maior impacto na sobrevivência de cepas “tipo E” que na infecção humana (JONES; OLIVER, 2009; KIM et al., 2006). O provável papel da *vvhA* na virulência parece ser o de facilitar a invasão da corrente sanguínea após a ingestão de alimentos contaminados

(HORSEMAN; SURANI, 2011). Este gene é espécie-específico, sendo, portanto, usado como marcador de isolamento de *V. vulnificus* total em ensaios de detecção genética, entretanto não diferencia cepas potencialmente patogênicas de cepas não patogênicas.

b) vvpE: esta enzima é uma metaloprotease extracelular que também parece estar relacionada com a virulência do *V. vulnificus*. A enzima não é específica para nenhum substrato, pode causar necrose de tecidos e lesões cutâneas, assim como aumento de permeabilidade vascular que leva a edema. Todas estas lesões são características das lesões bolhosas causadas pela doença sistêmica, entretanto a produção de *vvpE* por cepas potencialmente patogênicas como não patogênicas indicam que esta enzima não esteja envolvida na letalidade (HORSEMAN; SURANI, 2011;).

c) rtxA1: o gene *rtxA1* do *V. vulnificus* é um gene homólogo ao gene *rtxA* do *V. cholerae*. As toxinas RTX formam poros em membranas celulares e são encontradas em diversas bactérias Gram negativas. Estudos indicam que *rtxA1* pode ser a principal toxina envolvida na citotoxicidade e virulência de *V. vulnificus* (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009).

d) LPS: além da necrose tissular, o choque endotóxico é um sintoma característico da infecção causada por *V. vulnificus*. Este sintoma parece estar relacionado com a presença de uma citocina de lipopolissacarídeo, a LPS (HORSEMAN; SURANI, 2011). Os efeitos desta citocina são reduzidos pela presença de colesterol LDL, a lipoproteína de baixa densidade, e pelo estrogênio, o que poderia explicar a maior incidência e maior mortalidade em homens que em mulheres (JONES; OLIVER, 2009).

Além dos fatores de defesa e virulência, a bactéria possui ainda mecanismos específicos de ataque às células do hospedeiro e de motilidade, que são:

a) Pili: são receptores de superfície necessários para a virulência, uma vez que são usados pela bactéria para adesão e invasão às células do hospedeiro. Não há dúvidas do papel da adesão na patogênese de *V. vulnificus*, que requer o contato entre as células para a expressão da toxicidade (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009).

b) Proteínas externas de membrana: existem duas proteínas que podem estar relacionadas à adesão de *V. vulnificus*: OmpU e IipA. Elas parecem estar relacionadas à lesão local, mas não são essenciais para a letalidade (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009).

c) **Flagelo:** a motilidade dada pelo flagelo é importante para vários processos bacterianos, como a formação de biofilme e a patogênese. A redução na motilidade, na capacidade de adesão e na citotoxicidade reduzem a virulência. A diminuição da motilidade, por si só, afeta a adesão e a diminuição na liberação de citotoxinas (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009).

V. vulnificus possui ainda alguns mecanismos de regulação para controlar a virulência e a patogênese. Entre eles, destaca-se o *Quorum sensing* que através de sistemas próprios influencia a transcrição de *vvhA* e *vvpE*. Outro fator de regulação é o sistema receptor proteína (CRP) cAMP-cAMP que tem influência na hemolisina, metaloprotease e no sistema de aquisição de ferro. A proteína HlyU também regula os fatores de virulência de *V. vulnificus* (JONES; OLIVER, 2009).

V. vulnificus é um micro-organismos complexo, que requer uma regulação coordenada da expressão dos fatores de virulência para a patogênese. Além disso, segundo Jones e Oliver (2009), muitos dos fatores já mencionados como a CPS, a hemolisina, os polissacarídeos extra-celulares, possuem principalmente função na sobrevivência da cepa no ambiente, mas auxiliam na patogênese.

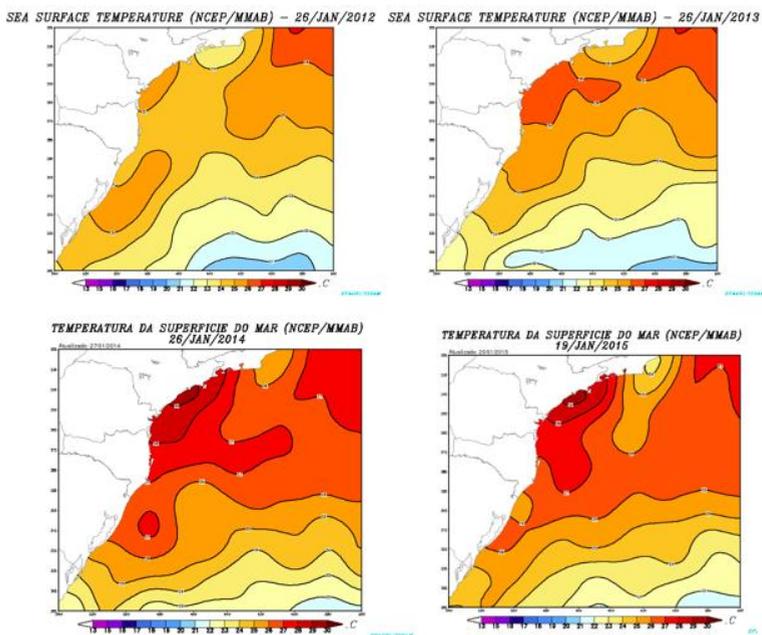
1.4. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *V. VULNIFICUS*

1.4.1. Distribuição mundial de *V. vulnificus*

A distribuição mundial de *V. vulnificus* é determinada por fatores como a temperatura da água do mar e pela salinidade. As mudanças climáticas recentes têm demonstrado uma tendência de aumento de temperatura da água do mar, influenciada por possíveis resultados de um processo de aquecimento global e também por fenômenos climáticos periódicos como o *El Niño* que impactam diretamente no fluxo e temperatura de correntes oceânicas na região do Pacífico, além de afetar índices de precipitação em outras áreas, que por sua vez podem influenciar na salinidade das regiões costeiras. Segundo estudos da *Food and Agriculture Organization* (FAO) (FAO, 2010), a mudança climática deve 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. Estes fenômenos podem, a curto prazo, causar um aumento da distribuição de casos e surtos de vários micro-organismos patogênicos marinhos, inclusive *V. vulnificus*.

Em Santa Catarina, segundo dados do *National Center Environmental Prediction / Marine Modeling and Analysis Branch* (NCEP/MMAB), observa-se que a temperatura da água do mar na superfície vem aumentando. Na Figura 1.5 é possível comparar a temperatura da água do mar na costa catarinense nos anos de 2012 a 2015, e pode-se observar que houve um aumento de temperatura nos dois primeiros anos e que esta manteve-se elevada nos anos seguintes.

Figura 1.5 Mapas de temperatura (°C) de superfície da água do mar no litoral do Estado de Santa Catarina, em janeiro, nos anos de 2012, 2013, 2014 e 2015.



Fonte: NCEP (National Center Environmental Prediction) / MMAB (Marine Modeling and Analysis Branch), disponível em <http://polar.ncep.noaa.gov/sst/ophi/>. Último acesso em 19 jan 2015.

Os dados de janeiro de 2016 indicam uma manutenção de altas temperaturas, com medições da superfície da água do mar entre 24 e 26°C (<http://polar.ncep.noaa.gov/sst/ophi/archive/20160121/>).

Este aquecimento pode favorecer o crescimento de *V. vulnificus*, o que é especialmente importante numa região como o litoral catarinense em função do volume de ostras produzidas.

São muitos os relatos de *V. vulnificus* no mundo. A maior incidência é registrada nos EUA, especialmente na região do Golfo do México, entretanto há relatos na costa do Oceano Atlântico e também no Oceano Pacífico. Segundo Crim et al. (2014), foram registrados 21 casos de infecção causada por *V. vulnificus* nos EUA em 2013. Estudos sobre a incidência de *V. vulnificus* em ostras demonstram a presença da bactéria em várias regiões dos EUA (CDC, 2005, 2013a, 2015).

Na Nova Zelândia, Kirs et al. (2011) realizaram um estudo para determinar os níveis de *V. vulnificus* em ostras do pacífico (*C. gigas*) coletadas de áreas de cultivo de North Island. A coleta foi realizada nos meses de verão, entre dezembro/2007 a abril/2008. Os resultados indicaram a presença de 17,2% (10/55) amostras positivas para *V. vulnificus*.

Cantet et al. (2013), na França, estudaram a presença de *V. vulnificus* em água, sedimentos e crustáceos em três lagoas costeiras na região mediterrânea, importantes pela produção de ostras e por serem áreas de lazer. As amostras foram coletadas entre 2006 e 2007, nas estações de verão e inverno. *V. vulnificus* foi encontrada na água das três lagoas no verão, somente em uma das lagoas não foi detectada nas amostras de crustáceos e de sedimento, provavelmente pela diferença de salinidade entre as áreas de coleta. Ainda na Europa, na Espanha, Hidalgo et al. (2008), realizaram um estudo na Galícia para identificar as espécies de *Vibrio* em 759 amostras de vôngole cultivados na região. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *V. vulnificus*. Entretanto, um estudo feito por Cañigral et al. (2010), analisando amostras de ostra, água do mar e águas residuais na região de Valência detectaram a presença da *V. vulnificus* em todos os tipos de amostras, sendo 32% de amostras positivas em água do mar, 13% de águas residuais coletadas em estações de tratamento de efluentes, e 10% das amostras de mariscos (ostras e mexilhões).

Na Itália, tem sido registrada a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos em ambientes aquáticos como rios (CALDINI et al., 1997), água salobra (MAUGERI; CACCAMO; GUGLIANDOLO, 2000), estuários (BARBIERI et al., 1999) e na costa marinha (CARLI et al., 1993; DUMONTET et al., 2000; MONTANARI et al., 1999). Além disso, neste país, vários autores demonstraram a associação de *Vibrio* spp., inclusive *V. vulnificus*, com plâncton marinho em diferentes estações do ano, em diferentes temperatura e salinidade

(CARLI et al., 1993; DUMONTET et al., 2000; GUGLIANDOLO et al., 2005; MAUGERI et al., 2004; MONTANARI et al., 1999; PRUZZO et al., 1996). Gugliandolo et al. (2005) encontraram *V. vulnificus* em amostras de plâncton e livre na água nos meses de agosto e setembro, sendo a maior quantidade associada ao plâncton. Todas as cepas identificadas foram identificadas como sendo do biotipo 1, potencialmente patogênica para o ser humano. Estudos realizados na Dinamarca também encontraram a presença de *V. vulnificus* na água do mar, em mariscos e em sedimentos, em baixas concentrações, mas houve aumento no crescimento da bactéria durante algumas semanas, no verão, quando a temperatura da água do mar ultrapassou os 20°C (HØI et al., 1999).

Na China, Chen et al. (2010) analisaram a presença de patógenos em ostras do Pacífico (*C. gigas*) comercializadas no sul da China durante um ano. *V. vulnificus* foi detectado em 54,9% (67/122) das amostras, com maior incidência durante os meses de verão. Outro estudo realizado na China pesquisou a presença de *V. vulnificus* em camarão marinho comercializado durante os meses de verão, uma vez que ele é consumido cru ou parcialmente cozido. Entre as diferentes espécies de camarões estudadas, a prevalência da bactéria foi de 58,6% (140/239), sendo que 61,7% foram identificadas como genótipo *vcgC*.

No Japão, os casos de infecção por *V. vulnificus* estão associados ao consumo de sashimi e sushi produzidos com pescado e mariscos crus durante o verão (FUKUSHIMA; SEKI, 2004). No estudo realizado por Fukushima e Seki (2004), foram analisadas amostras de água, sedimento, além de pescados e mariscos crus comprados no comércio, durante dois anos. *V. vulnificus* foi isolado de 68% (104/153) das amostras de água e de 31,4% (22/70) das amostras de sedimento, mesmo nos meses de inverno. A prevalências nas amostras de brânquias de pescado e mariscos inteiros foi de 22% (14/65), principalmente nas amostras originárias de regiões costeiras.

Um estudo realizado no Irã, na região do Mar Cáspio, local caracterizado por baixa salinidade (média de 10‰), analisou amostras de água durante a primavera e o verão de 2001. *V. vulnificus* foi a espécie com maior prevalência nas amostras com 53% (39/73) (AMIRMOZAFARI; FOROHESH; HALAKOO, 2005).

No Brasil existem vários relatos de presença de *V. vulnificus* em ostras e mexilhões. Matté et al. (1994) estudaram mexilhões (*Perna perna*) na região de Ubatuba e encontraram *V. vulnificus* com sendo a espécie de maior incidência nas amostras analisadas.

Garcia Moreno e Landgraf (1997) realizaram um estudo da ocorrência de *V. vulnificus* em alimentos de origem marinha (ostras, mexilhões e camarões) coletados no litoral do Estado de São Paulo em diferentes estações do ano. Os resultados indicaram 55% de amostras positivas para a presença da bactéria, sendo que as ostras foram as que apresentaram maior incidência (65%). Nascimento et al. (2001) coletaram 20 amostras de camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) em um mercado de pescados em Fortaleza e encontraram *V. vulnificus* em 7 deles. Silva (2003) analisou amostras de água, mexilhões (*Perna perna*) e ostras (*C. gigas*) em três regiões de cultivo de moluscos em Penha, Balneário de Camboriu e Bombinhas, no estado de Santa Catarina. Entre as 16 amostras coletada, foi detectada a presença da bactéria em 11 delas. Entre as amostras positivas para *V. vulnificus*, 90% apresentaram presença de cápsula e 100% delas foram positivas para a produção de hemolisina. Pereira, Viana e Rodrigues (2007) estudaram amostras de ostras comercializadas em restaurantes no Rio de Janeiro com relação à presença de *Vibrio* e encontraram *V. vulnificus* em 7% das amostras.

Ramos (2007) realizou um monitoramento da água e de ostras (*C. gigas*) na Baía Sul de Florianópolis, durante 12 meses. Os resultados indicaram *V. vulnificus* em 4% (8/180) das amostras, sendo que foi a única espécie encontrada em uma amostra no período de inverno, em agosto de 2006 quando foi registrada a menor temperatura da água no período de estudo, 18°C. Neste estudo, a autora encontrou correlação positiva entre a presença de *Vibrio* spp em ostras e a temperatura da água do mar, mas não entre a presença das bactérias e a salinidade.

Em 2012, Ramos (2012) 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. Entre as 60 amostras de ostras analisadas, em 6 (10%) foi isolada a bactéria. Na água, *V. vulnificus* foi encontrado isolado (4 amostras) ou associado com outras espécies como *V. parahaemolyticus* (2 amostras) e *V. alginolyticus* (2 amostras).

Costa, Araújo e Vieira (2013) analisaram microbiota da ostra (*C. rhizophorae*) fresca e coletada em restaurantes em Fortaleza, Ceará e encontraram *V. vulnificus* em 11,4% (4/30) das amostras, sendo que todas estavam em ostras congeladas.

1.4.2. Etiologia da infecção causada por *V. vulnificus*

A doença causada por *V. vulnificus* pode variar de uma gastroenterite até uma septicemia e fasciíte necrosante. A taxa de mortalidade, nos Estados Unidos onde a doença é mais frequente, gira em torno de 50% (HORSEMAN; SURANI, 2011), mas pode variar conforme exposto por Fukushima e Seki (2004), segundo dados do Japão, sendo de 71,4% nos casos de septicemia e 25% nos casos de infecção de pele.

A contaminação pode dar-se pelo consumo ou manipulação de alimentos de origem marinha crus ou mal passados, principalmente de moluscos bivalves. Outra forma de infecção é a exposição de ferimentos abertos ou lesões de pele à água salgada ou salobra nas quais esteja presente a cepa patogênica da bactéria (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009).

A gastroenterite e a septicemia normalmente resultam de contágio pela ingestão de frutos do mar crus ou mal passados, enquanto a fasciíte necrosante geralmente resulta da manipulação destes alimentos ou da exposição de feridas e lesões de pele em águas contaminadas (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009). A fasciíte necrosante pode ser causada por diversos micro-organismos, além do *V. vulnificus*, o que dificulta o diagnóstico. Em todos os casos, a evolução dos sintomas é similar, com infecção da área subcutânea e rápida evolução (ROJE et al., 2011).

A maioria dos casos de infecção com *V. vulnificus* ocorreu em pacientes com doença hepática crônica, imunodeficiências ou alterações hematológicas caracterizadas pelo alto nível de ferro sérico (HORSEMAN e SURANI, 2011). A bactéria não causa alterações sensoriais no alimento, de modo que não é possível detectar sua presença sem testes microbiológicos ou moleculares.

Outros fatores que podem predispor à doença são o consumo frequente de álcool, *diabetes mellitus*, idade avançada e quaisquer outras doenças crônicas, especialmente cardiopatias. Além disso, a grande maioria dos casos aconteceu em indivíduos adultos, do sexo masculino (HORSEMAN; SURANI, 2011).

Lesões bolhosas de pele são observadas nos casos de infecções causadas por *V. vulnificus*, exceto nos casos de gastroenterites. Os sintomas gastrointestinais são leves a moderados, auto limitantes e podem ocorrer mesmo em consumidores sem os fatores de predisposição descritos acima. Nestes casos a taxa de mortalidade é de 9%, e segundo Horseman e Surani (2011), podem ser devido a uma

septicemia não diagnosticada. A septicemia severa tem sido descrita como a apresentação mais comum das doenças causadas por *V. vulnificus*, ou ainda como secundária à infecção de pele (HORSEMAN; SURANI, 2011).

A septicemia primária geralmente caracteriza-se por uma bacteremia sem um foco definido da infecção. Culturas positivas das lesões de pele ou do exsudado também se incluem nesta categoria. Acredita-se que a porta de entrada seja o intestino delgado ou o cólon proximal (ceco), com o íleo sendo o local mais provável. Os sintomas geralmente aparecem em 7 dias, podendo ser até 14 dias no caso de consumo de alimentos de origem marinha cru ou mal passados (HORSEMAN; SURANI, 2011). A septicemia primária normalmente causa febre e calafrios repentinos. Uma infecção metastática caracterizada por lesões cutâneas como bolhas, celulites, equimoses ou mesmo lesões maculares generalizadas acometem as extremidades ou o tronco. Sintomas gastrointestinais como náusea, vômito e dor abdominal podem preceder a febre, os calafrios e as lesões cutâneas (HORSEMAN; SURANI, 2011).

As lesões cutâneas podem evoluir para úlceras necróticas, fasciíte necrosante, vasculite necrótica ou mionecrose. Outras alterações já foram registradas como choque séptico, hipotensão, leucopenia, letargia, desorientação e trombocitopenia (HORSEMAN; SURANI, 2011).

Uma das diferenças entre a infecção de pele a septicemia primária é a porta a infecção. A infecção da pele pode resultar da entrada da bactéria por lesões pré-existentes durante o banho ou contato, que pode ser simplesmente caminhar em águas onde a bactéria esteja presente ou ainda pela inoculação por lesões traumáticas que ocorrem geralmente durante a manipulação de pescados, mariscos e instrumentos de pesca (facas, anzóis, etc). Assim como no caso das gastroenterites, a infecção de pele é leve a moderada nas pessoas sem os sintomas de predisposição citados. O período de incubação é de 7 dias, podendo chegar a 12. As infecções mais graves causam, além das lesões citadas acima, dor intensa e inchaço. As lesões podem evoluir para fasciíte necrosante, vasculite necrótica ou gangrena. Outra diferença entre a infecção da pele e a septicemia primária é que as lesões de pele são limitadas à área de inoculação. Pode haver bacteremia e septicemia secundária em infecções de pele mais graves, inclusive com sintomas sistêmicos como febre, hipotensão ou choque, calafrios e alteração do estado mental (HORSEMAN; SURANI, 2011).

1.4.3. Relatos de casos e surtos de *V. vulnificus*

Considerando dados dos Estados Unidos, os frutos do mar correspondem a menos que 1% da dieta típica dos norte americanos, mas causam 25% de todas as doenças transmitidas por alimentos, sendo que 96% destas doenças são causadas pelo consumo de ostras cruas, e 95% de todas as mortes causadas por frutos do mar são causadas por uma única bactéria, o *V. vulnificus* (OLIVER, 2013). Na Costa do Golfo, que inclui os Estados do Texas, Louisiana, Mississippi, Alabama e Florida dos EUA, *V. vulnificus* é responsável pela maior parte (34%) dos casos de doença causada por *Vibrio* (CDC, 2015). A principal causa é o consumo de ostras cruas da Costa do Golfo, especialmente nos meses de verão (HORSEMAN; SURANI, 2011). Segundo informações do Departamento de Saúde da Florida, EUA, foram registrados os números de casos e mortes desde 2008 descritos no Quadro 1.1

Quadro 1.1 Números de casos e mortes causadas por *V. vulnificus* nos Estados Unidos entre 2008 e 2012.

Ano	Número de casos	Número de mortes
2008	15	5
2009	24	7
2010	32	10
2011	35	13
2012	27	9

Fonte: Departamento de Saúde da Florida.

<http://newsroom.doh.state.fl.us/2013/10/01/10-01-13-vibrio-vulnificus/>

Dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (CDC, 2013b) dos EUA, mostram que são confirmados em média 50 casos por ano, com cerca de 45 deles requerendo hospitalização e 16 mortes registradas somente na região do Costa do Golfo (que inclui os Estados do Alabama, Florida, Louisiana, Mississippi a Texas). No país são registrados mais de 95 casos por ano, com 85 deles necessitando de hospitalização e aproximadamente 35 mortes. Cerca de 85% dos casos acontecem entre os meses de maio a novembro, com um pico de ocorrências entre julho e agosto (CDC, 2013b), que correspondem aos meses de verão no hemisfério norte.

Além dos casos relatados no EUA, há registros de casos no Canadá associado à manipulação e ingestão de tilápia (VINH et al.,

2006), e no México, associado ao consumo de mariscos (CASTAÑÓN-GONZÁLEZ et al., 2000; CORNEJO-JUÁREZ et al., 2014).

Talvez o primeiro relato de infecção por *V. vulnificus* seja a descrição feita pelo médico escocês John Bell, e publicada em 1801 (HASSING; DE GROOT; KOMPANJE, 2010). O relato trata do caso de um garoto chamado Joiner, que trabalhava no navio mercante “Triumph”, o mesmo foi retratado pelo próprio médico, como se observa na

Figura 1.6 onde se pode observar a área de gangrena na perna do rapaz. A descrição dos sintomas começa com febre, vômitos e evolui para lesões de pele e gangrena, com a morte do paciente após uma semana. E a descrição dada pelo médico em 1801 são as lesões e sintomas típicos da fasciíte necrosante.

Figura 1.6 Joiner, o paciente descrito com fasciíte necrosante, relatado por John Bell (*The principles of surgery*, 1801).



Fonte: Hassing; De Groot; Kompanje (2010)

Apesar deste primeiro caso ter sido descrito na Europa, atualmente há poucos relatos de infecção causada por *V. vulnificus* neste continente, e normalmente estão limitados às costas da Itália, Espanha e França (BARBIERI et al., 1999; CANTET et al., 2013; HERVIO-

HEATH et al., 2002; MARTÍNEZ-RIENDA et al., 2007; MARTINEZ-URTAZA et al., 2008). Na Espanha, a maioria dos relatos acontecem na costa do Mediterrâneo, e um relato da Costa Cantábria, provavelmente pelas condições de temperatura e salinidade do mar Mediterrâneo serem mais favoráveis ao desenvolvimento da bactéria (MARTÍNEZ-RIENDA et al., 2007).

No Japão, Fukushima e Seki (2004) relatam uma taxa de 71,4% de mortalidade entre os casos de septicemia. Os autores relatam que a infecção por *V. vulnificus* tem sido registrada no Japão desde 1978, e que está relacionada ao consumo de alimentos de origem marinha crus ou marinados.

Na América Central, em 2013 foram registrados dois casos de infecção pela pele nas Bahamas¹. Uma das vítimas era um turista, mergulhador que se infectou por uma lesão de pele e se recuperou. A outra vítima foi um morador local, idoso. Os relatos foram encontrados apenas em sites de jornais locais, não há registro em publicação científica.

O único caso registrado no Chile foi diagnosticado em um homem, de 53 anos, diabético, que havia retornado há pouco tempo de uma viagem a El Salvador, na América Central, com histórico de consumo de ostras. Após 68h de internação, com quadro de evolução rápida, o paciente evoluiu a óbito (POBLETE et al., 2002).

Outros casos registrados na América do Sul, além do caso importado do Chile mencionado acima, incluem relatos de casos no Equador (VILLACRÉS et al., 2013), Peru (IBARRA; DELGADO; ALVARADO, 1999), Brasil (BRACK et al., 2004; DE ARAUJO et al., 2007; FRANÇA et al., 2013) e Uruguai, onde foi registrado o primeiro caso na América do Sul em 1997 (CARREROU, 2001) e é o país com o maior número de casos, todos na região estuarina do Río de la Plata (CHICHEFF et al., 2001; URUGUAY, 2015). No Brasil, apesar dos estudos indicando a presença de *V. vulnificus* em água do mar e em mariscos (COSTA; ARAÚJO; VIEIRA, 2013; GARCIA-MORENO; LANDGRAF, 1997; RAMOS, 2007; RAMOS, 2012), são poucos os relatos de casos de infecção por *V. vulnificus* no Brasil.

Caso 1

O primeiro relato publicado no Brasil foi um caso de infecção cutânea em paciente do sexo masculino, com 53 anos que se feriu caminhando na praia. Em algumas horas começaram os sintomas de

¹ <http://www.tribune242.com/news/2013/oct/17/health-staff-still-silent-victims/>

febre e dor no local, evoluindo para edema. Este paciente não apresentava nenhuma das condições predisponentes e após 48 horas foi levado ao Centro de Terapia intensiva com hipotensão e taquicardia, sem reposta à antibioticoterapia. Após 12 horas da internação o paciente entrou em choque. Foi isolado *V. vulnificus* do sangue e do líquido das lesões bolhosas. O paciente teve o pé amputado, mas no 10º dia foi constatada a morte encefálica (BRACK et al., 2004).

Caso 2

Araújo et al. (2007) publicaram o caso de um senhor de 86 anos, com histórico de problemas hepáticos e pancreáticos, que apresentou sintomas de febre, vômito e diarreia após o consumo de mexilhões e polvo em Guarujá, no litoral de São Paulo, no ano de 2004. Foi confirmada a presença de *V. vulnificus* no sangue e o quadro clínico rapidamente evoluiu para um choque séptico, também havia presença de necrose em um dos membros inferiores. O paciente foi tratado com antibióticos, mas após 19 dias de internação faleceu por uma infecção fúngica sistêmica causada por *Candida albicans*. Os casos 1 e 2 aconteceram no mesmo ano.

Caso 3

França et al. (2013) registraram o terceiro caso no Brasil e o primeiro caso de infecção por *V. vulnificus* no sul do Brasil. Um paciente de 39 anos, com colite ulcerativa² e colangite esclerosante³ que deu entrada no hospital para um transplante de fígado eletivo. Após 12 horas da internação o paciente apresentou febre, taquicardia e mialgia. Após algumas horas surgiram lesões eritematosas nos membros, com evolução rápida. O paciente relatou que esteve no litoral do Estado do Paraná no dia anterior à internação. A cultura do sangue indicou a presença de *V. vulnificus* e o paciente faleceu 32h após o aparecimento dos sintomas, mesmo com antibioticoterapia.

Este foi o primeiro relato de infecção por *V. vulnificus* no sul do Brasil, onde a temperatura da água é menor que no restante do país, entretanto, tem sido detectado um aumento na temperatura da água nesta

² Colite ulcerativa é uma doença inflamatória do cólon, intestino grosso, que se caracteriza por inflamação e ulceração da camada mais superficial do cólon (Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, 2014, www.abcd.org.br).

³ Colangite esclerosante é uma doença crônica que acomete canais biliares dentro e fora do fígado Instituto para o Cuidado do Fígado, 2010, WWW.icfigado.org.br).

região, provavelmente como consequência das mudanças climáticas (FRANÇA et al., 2013).

Caso 4

Em 2016 foi noticiado o falecimento o de uma mulher de 32 anos, no Rio Grande do Norte, por septicemia causada por *V. vulnificus*, que ocorreu cinco dias após o consumo de carne de caranguejo (<http://www.mossoro hoje.com.br/noticias/6411/08-03-2016/Exames-comprovam-que-estudante-morreu-por-bactéria-de-caranguejo>). Não há informação se a paciente apresentava doença predisponente concomitante e tampouco sobre detalhes do método de diagnóstico.

1.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O polimorfismo genético de *V. vulnificus*, associado aos diversos fatores envolvidos na expressão da patogenicidade que ainda não foram bem elucidados, assim como os crescentes relatos de casos e alterações climáticas, indicam a necessidade de mais estudos para que a detecção da bactéria em amostras ambientais e em alimentos de origem marinha possa ser rápida e precisa para garantir a saúde de consumidores e trabalhadores do setor.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. R. et al. **HACCP: Ferramenta essencial para a inocuidade de alimentos**. Buenos Aires: OPS/INPPAZ, 2005.
- AMIRMOZAFARI, N.; FOROHESH, H.; HALAKOO, A. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of Golestan Province in Iran. **Arch. Razi Ins**, v. 60, p. 33–44, 2005.
- ANGELL, C. L. **The biology and culture of tropical oysters**. Manila: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1986.
- AREIAS, D. L. L. **Efeito da salinidade e temperatura no assentamento da ostra *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e indução da desova da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795)**. [s.l.] Porto. Dissertação Mestrado. Universidade do Porto, 2012.
- BARBIERI, E. et al. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 65, n. 6, p. 2748–2753, 1999.

- BEAZ HIDALGO, R. et al. Diversity of *Vibrios* associated with reared clams in Galicia (NW Spain). **Systematic and applied microbiology**, v. 31, n. 3, p. 215–22, ago. 2008.
- BRACK, J. C. et al. Infecção cutânea por *Vibrio vulnificus*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia.**, v. abr/mai/ju, n. 6, 2004.
- CALDINI, G. et al. High prevalence of *Vibrio cholerae* non-O1 carrying heat-stable-enterotoxin-encoding genes among *Vibrio* Isolates from a temperate-climate river basin of central Italy. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2934–9, 1997.
- CAÑIGRAL, I. et al. Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. **Microbiological research**, v. 165, n. 8, p. 657–664, 20 out. 2010.
- CANTET, F. et al. Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 8, p. 867–874, 2013.
- CARLI, A. et al. Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian coast rock pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvus* (Fisher 1860). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1960–1962, 1993.
- CARREROU, L. A. Infecção grave por *Vibrio vulnificus* (primer caso publicado en Uruguay). **Cir. Urug**, v. 71, n. 3/4, p. 116–118, 2001.
- CASTAÑÓN-GONZÁLEZ, J. A et al. *Vibrio vulnificus* infection in Mexico: report of a fatal case. **Rev Med IMSS**, v. 38, n. 1, p. 23–25, 2000.
- CDC. *Vibrio* illnesses after hurricane Katrina - multiple states, August - September, 2005. **MMWR**, v. 54, n. 37, p. 928–931, 2005.
- CDC. **FoodNet 2013 Annual Report**. Atlanta: CDC, 2013a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2013.html>>.
- CDC. **Trends in foodborne illness in the United States, 2013**.
- CDC. *Vibrio vulnificus*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vibrio/vibriov.html>>. Acesso em: 20 nov. 2015.
- CHEN, Y. et al. Foodborne pathogens in retail oysters in South China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 23, n. 1, p. 32–36, fev. 2010.
- CHICHEFF, O. C. et al. *Vibrio vulnificus*: un veraneante letal en las aguas oceánicas de Uruguay. Comunicación del primer caso nacional. **Paciente Crítico**, v. 14, n. 3, p. 168–174, 2001.

- CORNEJO-JUÁREZ, P. et al. Sepsis fulminante por *Vibrio vulnificus*. Serie de casos. **Rev. Invest. Clini**, v. 52, n. 6, p. 2–3, 2014.
- COSTA, R. A.; ARAÚJO, R. L.; VIEIRA, R. H. F. Hemolytic and urease activities in vibrios isolated from fresh and frozen oysters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 103–105, 2013.
- CRIM, S. M. et al. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2006-2013. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 63, n. 15, p. 328–32, 2014.
- DA SILVA, L. et al. Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio vulnificus* in postharvest shellstock oysters. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1675–81, mar. 2012.
- DE ARAUJO, M. R. E. et al. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and literature review. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 302–5, abr. 2007.
- DUMONTET, S. et al. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 53–72, 2000.
- DUPUY, C. et al. Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. **Marine Ecology Progress Series**, v. 205, n. 171, p. 171–184, 2000.
- FAO. World review of fisheries and aquaculture. **Aquaculture**, v. 1, p. 88, 2010.
- FRANÇA, J. C. B. et al. *Vibrio vulnificus* infection in Southern Brazil - case report. **An Bras Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 424–426, 2013.
- FROELICH, B. A.; NOBLE, R. T. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 80, p. 7454–7459, 2014.
- FUKUSHIMA, H.; SEKI, R. Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. **FEMS microbiology ecology**, v. 48, n. 2, p. 221–9, 1 maio 2004.
- GARCIA-MORENO, M. L.; LANDGRAF, M. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha. **Ciênc. Tecnol.**

Aliment, v. 17, n. 2, p. 177–180, 1997.

GUGLIANDOLO, C. et al. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in the marine environment of the Straits of Messina (Italy). **Marine pollution bulletin**, v. 50, n. 6, p. 682–697, 2005.

HASSING, R.-J.; DE GROOT, Y. J.; KOMPANJE, E. J. A description and illustration of a necrotizing fasciitis by John Bell in 1801, hypothetically caused by *Vibrio vulnificus*. **International journal of infectious diseases**, v. 14 Suppl 3, p. e341–3, set. 2010.

HELM, M.; BOURNE, N. **Hatchery culture of bivalves. A practical manual**. Rome: FAO, 2004.

HELM, M. M. **Cultured Aquatic Species Information Programme: Crassostrea gigas**. Rome: FAO/Fisheries and Aquaculture Department, 2005. Disponível em:

<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en>.

Acesso em: 13 maio. 2014.

HERVIO-HEATH, D. et al. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 1123–1135, 2002.

HOFFMANN, M. et al. PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio* species. **BMC microbiology**, v.10; n.90, p.1-14, 2010.

HØI, L. et al. *Vibrio vulnificus* in Denmark isolation, identification and characterization. **Miljøprojekt**, p. 66, 1999.

HOR, L. I. et al. Mechanism of high susceptibility of iron-overloaded mouse to *Vibrio vulnificus* infection. **Microbiology and immunology**, v. 44, n. 11, p. 871–8, 2000.

HORSEMAN, M. A.; SURANI, S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. **International journal of infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. e157–66, mar. 2011.

IBARRA, J.; DELGADO, A.; ALVARADO, D. Vibrios no epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 asociados a enfermedad diarreica aguda. Evento climatológico. “El Niño”- 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo.

Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, v. 60, n. 4, 1999.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2013**. Disponível em:

<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2013_v4_1_br.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2015.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. **Research in microbiology**, v. 159, n. 7-8, p. 495–506, 2008.

JI, H. et al. Occurrence and characteristics of *Vibrio vulnificus* in retail marine shrimp in China. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1935–1940, dez. 2011.

JONES, M. K.; OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 77, n. 5, p. 1723–33, maio 2009.

KIM, K. et al. Crystal structure of *PilF*: functional implication in the type 4 pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, n. 4, p. 1028–38, 24 fev. 2006.

KIRS, M. et al. A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 149–53, 27 maio 2011.

MARTÍNEZ-RIENDA, M. I. et al. Infección por *Vibrio vulnificus* en las costas cantábricas. **Gac Med Bilbao**, v. 104, n. 1, p. 27–29, jan. 2007.

MARTINEZ-URTAZA, J. et al. Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with *El Niño*. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 19, n. 6, p. 829–837, 2008.

MATTÉ, G. R. et al. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 281–287, 1994.

MAUGERI, T. L. et al. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 354–361, 2004.

MAUGERI, T. L.; CACCAMO, D.; GUGLIANDOLO, C. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 261–6, ago. 2000.

MIOSSEC, L.; DEUFF, R.-M. LE; GOULLETQUER, P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). **ICES Cooperative Research Report**, n. 299, p. 46, 2009.

MIZUTA, D. D. **Contribuição do estudo oceanográfico para a produção comercial de ostras *Crassostrea gigas*: estudo de caso da Baía Sul, Ilha de Santa Catarina, SC**. São Paulo: Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2010.

MONTANARI, M. P. et al. Vibrios associated with plankton in a

coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, n. 3, p. 241–247, jul. 1999.

NASCIMENTO, S. M. et al. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 263–266, 2001.

OLIVER, J. D. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. **FEMS microbiology letters**, v. 133, n. 3, p. 203–208, 1995.

OLIVER, J. D. Chapter 17 - Culture media for the isolation of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. In: CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. (Eds.). **Handbook of Culture Media for Food Microbiology**. 2nd. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 249–269.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In: **The Biology of Vibrios**. Edited by Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J. Washington: ASM press, 2005. p. 349-365.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 793–9, maio 2013.

OLIVER, J. D.; BOCKIAN, R. *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2620–3, 1995.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. D. P. Vibrios patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 300–303, 2007.

POBLETE U., R. et al. *Vibrio vulnificus*: una causa infrecuente de shock séptico. **Revista médica de Chile**, v. 130, p. 787–791, 2002.

PORTELLA, C. DE G. **Avaliação da qualidade da ostra nativa *Crassostrea brasiliiana* congelada em concha em função da composição química e análise sensorial**. Jaboticabal: Dissertação de Mestrado. UNESP, 2005.

PRUZZO, C. et al. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitin-binding proteins. **Microbiology**, v. 142, n. 8, p. 2181–2186, 1996.

RAMOS, R. J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de**

ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina. Florianópolis: Dissertation. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

RAMOS, R. J. ***Vibrio* sp. em ostras e águas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina: ocorrência, caracterização feno e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração.** Florianópolis: Thesis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ROJE, Z. et al. Necrotizing fasciitis: literature review of contemporary strategies for diagnosing and management with three case reports: torso, abdominal wall, upper and lower limbs. **World Journal of Emergency Surgery**, v. 6, n. 1, p. 46, jan. 2011.

ROSCHE, T. M.; YANO, Y.; OLIVER, J. D. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 4, p. 381–9, jan. 2005.

SANTOS, A. A. DOS et al. **Síntese Informativa da Maricultura 2012.** Florianópolis: EPAGRI, 2013. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Síntese-informativa-da-maricultura-2012-4.pdf>>.

SANTOS, A. A. DOS; COSTA, S. W. DA. **Síntese Informativa da Maricultura 2014.** Florianópolis: EPAGRI, 2014. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese_informativa_da_maricultura_2014.pdf>.

SILVA, M. A. C. DA. **Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de moluscos e água de áreas de cultivo de Santa Catarina.** Itajaí: Dissertação de Mestrado. UNIVALI, 2003.

SOUZA FILHO, J. **Custo de produção da ostra cultivada:** Cadernos de indicadores agrícolas. Florianópolis: CEPA/SC, 2003.

STARKS, A. M. et al. Use of a marker plasmid to examine differential rates of growth and death between clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in experimentally infected mice. **Molecular microbiology**, v. 61, n. 2, p. 310–23, 2006.

URUGUAY. **Bacteria *Vibrio vulnificus*: MSP recomienda no ingresar al agua marina a personas con lesiones en la piel, fundamentalmente si son adultas mayores y con patologías preexistentes.** Disponível em:

<<http://www.msp.gub.uy/comunicado/comunicado-la-poblaci?n-bacteria-vibrio-vulnificus-msp-recomienda-no-ingresar-al-agua>>. Acceso em: 15 jun. 2015.

VILLACRÉS, D. et al. Sepsis por *Vibrio vulnificus*: reporte de dos casos en ciudades de altura en el Ecuador. **Revista Médica Vozandes**, v. 24, n. 1-2, p. 53–58, 2013.

VINH, D. C. et al. *Vibrio vulnificus* septicemia after handling tilapia species fish: a Canadian case report and review. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 129–32, mar. 2006.

WETZ, J. J. et al. Quantification of *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment: a multi-year analysis using QPCR. **Estuaries and Coasts**, v. 37, n. 2, p. 421–435, 20 set. 2013.

CAPÍTULO 2: A REVIEW - VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AND VIBRIO VULNIFICUS IN SOUTH AMERICA: WATER, SEAFOOD, AND HUMAN INFECTIONS

Artigo aceito no *Journal of Applied Microbiology*, 2016.
Versão final em: DOI 10.1111/jam.13246

Simone M. RASZL, Brett A. FROELICH^b, Cleide R. W. VIEIRA^a, A. Denene BLACKWOOD^b and Rachel T. NOBLE^b

^a Federal University of Santa Catarina (UFSC), Department of Food Science and Technology, Florianopolis, Brazil

^b The University of North Carolina at Chapel Hill (UNC-CH), Institute of Marine Sciences, Morehead City, North Carolina, USA.

Abstract

The bacterial species, *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus*, are ubiquitous in estuaries and coastal waters throughout the world, but they also happen to be important human pathogens. Interestingly, they can cause disease by raw seafood consumption or contact with water containing appropriate concentrations of pathogenic forms. They are concentrated by filter feeding shellfish, such as oysters and clams. Because molluscan shellfish are often consumed raw or undercooked, this provides an important potential route of entry for an infective dose of these bacteria. *V. parahaemolyticus* can cause abdominal cramping, nausea, diarrhea, vomiting, chills, and fever. *V. vulnificus* can cause similar gastrointestinal-related symptoms, but can also spread to the bloodstream, resulting in primary septicemia. *V. vulnificus* can also cause disease via wound infections. The objective of this article is to summarize, for the first time, the incidence and importance of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in South America (SA), in environmental waters and seafood, specifically molluscan shellfish. This review includes attention to reported cases and outbreaks caused by both pathogens. It appears that infections from *V. parahaemolyticus* have been more strongly related to shellfish ingestion and have been more frequently reported on the Pacific coast of SA. Conversely, *V. vulnificus* has been more frequently acquired by water contact with open wounds and its presence has been more heavily reported along the

Atlantic coast of SA. The impacts of El Nino Southern Oscillation (ENSO) have been observed to cause an increase of *V. parahaemolyticus* outbreaks on the Pacific coast of SA. *V. vulnificus* human cases have been restricted mostly to the southeastern and southern areas of the Atlantic coast of SA, and while documented to cause serious mortality, have been relatively few in number. We have assembled the information available from specific studies of *Vibrio* species abundance as related to environmental parameters, and have also presented species-specific disease reports, but this information is rarely presented comprehensively. It is evident that this vast continent experiences environmental conditions that are permissive for both *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*. The implementation of a regulated monitoring approach, along with the use of faster, more accurate, and virulence-specific detection approaches, such as PCR confirmation, should be considered to detect the presence of pathogenic *Vibrio* strains in environmental and seafood samples for protection of public health. Furthermore, improved clinical surveillance with suspected cases should be implemented. This review highlights the need for more research and monitoring of vibrios in SA, in water, shellfish, and clinical samples.

Introduction

The proportion of food-borne disease derived from consumption of raw and undercooked seafood worldwide is considerable, reaching about 80,000 illnesses, 500 hospitalizations and 100 deaths each year in the United States (Altekruse et al. 2000; Iwamoto et al. 2010; Westrell et al. 2010; Schaeffer et al. 2013). While bacterial, viral, algal, and parasitic pathogens, particularly those stemming from fecal contamination, can contribute to seafood-borne illness, the pathogenic bacteria in the genus *Vibrio* have been garnering some recent headlines, as outbreaks and infections caused by these marine bacteria are increasing in number (Baker-Austin et al. 2012; Martinez-Urtaza et al. 2013), especially for raw and undercooked seafood.

In the United States, foodborne *Vibrio* infections are on the rise, even when numbers of infections from other foodborne bacterial pathogens are decreasing (CDC 2013a). The CDC produces an annual food safety report, which contains updates about foodborne infections including those caused by *Vibrio*. The most recent report presents some dour statistics. Most strikingly, the frequency rate of foodborne *Vibrio* infection, recorded during the 2013-2014 period has increased 173% as compared to the previous decade (CDC 2013a). Alarmingly, this trend is not restricted to the US. The geographic areas for which *Vibrio*

diseases are being reported is expanding, even to locations unaccustomed to these infections, a phenomenon most likely brought about by warming ocean temperatures (Martinez-Urtaza et al. 2010; Baker-Austin et al. 2012; Levy 2015).

Vibrio spp. are ubiquitous along estuaries and coastal waters throughout the world (Urakawa and Rivera 2006). While the majority of these bacteria are harmless, several species can potentially infect humans or other animals and cause serious disease (Hotel 2007). Of those, *V. cholerae*, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* are the most important pathogens. The pathogens *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* can cause waterborne diseases, but are particularly dangerous when combined with a filter-feeding vector, such as molluscan shellfish. Filter feeding mollusks pump the surrounding water over their gills, simultaneously obtaining oxygen and food. *Vibrio* spp. are often found attached to particles and as these particulates are passed over the sieve-like gills of filter feeding mollusks, they are strained out of the water and retained (Ward and Shumway 2004; Froelich et al. 2013). This filtration ultimately can concentrate the number of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in shellfish up to 100-fold of that found in the overlaying water (DePaola et al. 2003). Because some seafood, especially oysters, is commonly eaten raw or only slightly cooked, this provides a route of entry for a significant dose of live, potentially pathogenic *Vibrio* bacteria. *Vibrio* pathogens can also be associated with other seafood, such as shrimp, fish, clams, mussels, or octopus (Oliver et al. 1983; Normanno et al. 2006; Yamamoto et al. 2008; García et al. 2009; Rodgers et al. 2014; Rodríguez-Camacho et al. 2014). In the US, even though *Vibrio* diseases are reportable to the CDC, there are a large number of unreported cases, and approximately 84,000 Americans are estimated to contract a food-borne *Vibrio* infection every year (CDC 2013b).

V. parahaemolyticus infections cause symptoms that are typical of enteric viruses such as norovirus, and bacterial pathogens such as *Salmonella* spp. Symptoms of infection with *V. parahaemolyticus* can include abdominal cramping, nausea, diarrhea, vomiting, chills, and fever (Yeung and Boor 2004). Some *V. parahaemolyticus* strains are sufficiently virulent to cause outbreaks, in which large numbers of people can be affected (Martinez-Urtaza et al. 2005; Martinez-Urtaza et al. 2013). *V. vulnificus* can cause similar symptoms, but can also be far more morbid, with infections that can spread to the bloodstream, resulting in primary septicemia (Ratner 1987; Oliver 2006;). After a short incubation, in as little as 24 hours, the patient can experience

dangerously low blood pressure, blistering skin lesions along the extremities, organ failure, and death (Jones and Oliver 2009). Interestingly, *V. vulnificus* can also cause serious infections through entry of the pathogen into an open wound. These types of infections predominate in subpopulations with compromised immune systems (such as people with liver disease, or diabetes), and can rapidly proceed to amputation of limbs or death (Horseman and Surani 2011). *V. vulnificus*, which has a fatality rate approaching 50%, is the most fatal foodborne pathogen in the US. Thus, *V. parahaemolyticus* results in the highest number of cases, while *V. vulnificus* cases are highly morbid and cause the most deaths.

While the USA has some of the best *Vibrio* disease epidemiology data available, reporting requirements only began in 2007. Other countries, with fewer historical infections, have large numbers of shellfish harvested and consumed on an annual basis but a relatively low level of data is available. In SA, for example, shellfish and finfish aquaculture are large and economically robust industries, corresponding to 7.5% of the world's production (FAO 2013). Yet, despite the occurrence of both *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* along the Pacific and Atlantic coasts of SA, these bacteria are not part of any formal or official monitoring program for shellfish production in any of the South American countries. Only *V. parahaemolyticus* is regulated for seafood in Brazil and Peru, but not at shellfish production areas, as these regulations are focused on ready to eat products. There may be limited transmission of *Vibrio*-caused disease from non-molluscan aquaculture and seafood products in South America, but the presentation of information here is focused on the well-known vectors of *Vibrio*-caused disease, molluscan shellfish. The objective of this article is to review and summarize the importance of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in SA, across both environmental waters and seafood, as well as to document in a single publication, the reported cases and outbreaks caused by pathogenic *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* pathogens. Through this summary, we present information indicating the importance of developing coordinated monitoring strategies for these pathogens into the future.

Shellfish Aquaculture in South America

South America is the fourth largest continent in the world with twelve countries and three major territories: the Falkland Islands, the Galapagos Islands, and the French Guiana. South America is surrounded

by the Pacific and Atlantic Oceans, and by the Caribbean Sea. Bolivia and Paraguay are the only landlocked countries.

Aquaculture in South America produces a significant amount of food and contributes substantially to local economies. The continent contributes 7.6% (12,307,208 tons) of the world fishery production, with 80% of the total supplied by three countries: Peru, Chile and Brazil (FAO 2013). Bivalve mollusk production has always been remarkable in Chile and Peru, and in other countries, like Brazil, production has been on the rise (FAO 2013). Shellfish production is important for jobs and economic growth throughout the year and also serves as an alternative source of income for fishermen during closed fishing seasons. And even if *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* are not known to be pathogenic to shellfish, the possible impact of *V. parahaemolyticus* on shrimp populations via early mortality syndrome and their pathogenicity to finfish has now been noted (De Schryver, Defoirdt, Scorgeloo, 2014).

***Vibrio parahaemolyticus* occurrence in South America**

In 1971, Argentina reported the occurrence of *V. parahaemolyticus* in mussels (Casellas et al. 1977), which was the first report in South America and until now it is the only report of the bacterium in that country. In 1975, Brazil reported the first human case of *V. parahaemolyticus* (Hofer 1983) in SA. Since then, many reports of *V. parahaemolyticus* in environmental samples, seafood, and marine animals have been published, and isolated cases and outbreaks of *V. parahaemolyticus* have been observed in some South American countries.

The spread of *V. parahaemolyticus* in environmental samples (Figure 1) and the occurrence of human cases and years reported along the South America have been documented for the recent decades (Figure 2). It is important to observe that the spread of the disease coincides with ENSO years and route, reaching the Peruvian coast in 1993 and again in 1997, when the cases spread to Chilean coast (Figures 1 and 2).

Records of *V. parahaemolyticus* in South American marine water and animal samples are mainly found in Brazil, with only a few reports in Chile, Peru, Colombia, and Venezuela. Table 1 lists published reports, from 1971 until 2015, of *V. parahaemolyticus* findings in environmental and seafood samples from SA. Despite the existing reports of the bacterial presence in environmental and seafood samples, only Brazil and Peru have instituted national legislation establishing a maximum allowed number of *V. parahaemolyticus* in seafood. Peru

requires non-detectable *V. parahaemolyticus* in 25 g for all seafood (Peru 2008), while Brazilian legislation established a maximum limit of 10^3 CFU g⁻¹ in ready to eat seafood, which includes raw oysters (Brasil 2001), while the limit in USA is equal to or greater than 1×10^4 CFU g⁻¹ (Kanagawa positive or negative) for ready to eat fishery products with minimal cooking by consumer (FDA 2011). Interestingly, even though numerous *V. parahaemolyticus* outbreaks have been reported, Chile does not establish maximum limits for *V. parahaemolyticus* in seafood, there is only a requirement for cold transportation of molluscan shellfish (Chile 1996).

Figure 1 Map of *V. parahaemolyticus* reports in South American environmental samples with tags showing the year of occurrence.



Figure 2 Map of *V. parahaemolyticus* cases and outbreaks in South America, with tags showing the year of occurrence.



Some strains of *V. parahaemolyticus* are especially virulent and instead of causing single sporadic cases, they are responsible for outbreaks (Martinez-Urtaza et al. 2004; Martinez-Urtaza et al. 2013), which happens when the occurrence of cases of a disease is above of what was expected in a defined community, geographical area or season (WHO, 2015). These strains are identified by serotyping of the capsular (K) and lipopolysaccharide (O) antigens (Parveen and Tamplin 2013). Two serotypes are of particular importance, O4:K12 and O3:K6 and have been implicated in recent outbreaks and have worldwide presence.

The first report of *V. parahaemolyticus* infection in South America occurred in 1975 in Brazil, and was reported as isolated watery diarrhea in a six-year-old child from Ceara, Brazil (Hofer 1983). The strain was serotyped as O5:K17, Kanagawa-positive. There is no epidemiological data available, except that the local population was known to eat salt-cured marine and freshwater fish (Hofer 1983; Santos and Vieira 2013). Even though there are other *V. parahaemolyticus* serotypes as the above mentioned O5:K17 in SA, O3:K6 and O4:K12 serotypes are worth mentioning as they are related to outbreaks in South America and also in other continents as cited before (Bhuiyan et al. 2002; Chao et al. 2011; Powell et al. 2013; Martinez-Urtaza et al. 2013).

Serotype O4:K12 and O4:KUT are of concern today in Europe and USA (Martinez-Urtaza et al. 2013; Haendiges et al. 2015). They have been shown to be more virulent than other pathogenic *V. parahaemolyticus* strains and they have caused large outbreaks in the USA in 1997, 2004 and 2013 (Martinez-Urtaza et al. 2013; Newton et al., 2014). In SA, except for a report in Brazil from an outbreak in 1989 (Magalhaes et al. 1991) and one report from Kanagawa negative environmental sample (Pereira et al. 2004), all findings from this serotype occurred on the Pacific Coast. Serotype O4:K12 has been recovered from environmental and seafood samples in South America since 1984, when it was found in ceviche samples in Peru (Guevara-Duncan et al. 1989). Since then it has been mainly found in outbreaks in Peru and Chile in 1997 and 2004, respectively at the same time when this serotype caused USA outbreaks (González-Escalona et al. 2005; Gil et al. 2007). The outbreak that occurred in Chile in 2004 affected approximately 1,500 people, mainly in Puerto Montt, a region characterized by cold coastal water and one of the main shellfish-producing areas in Chile (González-Escalona et al. 2005). It is important to mention that the Pacific coast was under the influence of ENSO phenomena in both the 1997-1998 and 2004-2005 years, with warmer water all along the coastline, favoring the growth of the bacteria.

Strain O3:K6 has been implicated in outbreaks worldwide until 1996 and has been typically found associated with other serotypes such as O1:K38, O3:K29, O4:K8, O2:K3, and O4:K8 (Okuda et al. 1997; Wong et al. 2000). This situation changed in 1996, after an atypical increase in *V. parahaemolyticus* O3:K6 infections in India (Velazquez-Roman et al. 2013) when the serotype was detected alone causing disease. In the same year, this clone rapidly spread throughout Southeast Asian countries (Okuda et al. 1997; Chowdhury et al. 2000), and also to South America, particularly in Peru (Martinez-Urtaza et al. 2008). It

was then reported in the following years in outbreaks and isolated cases in the Atlantic and Gulf coasts of the U.S. (Okuda et al. 1997; Matsumoto et al. 2000; Chowdhury et al. 2000). Recently, similar reports in Europe (Martinez-Urtaza et al. 2013), Africa (Ansaruzzaman et al. 2005), and North, Central and South America (Daniels and MacKinnon 2000; González-Escalona et al. 2005; Velazquez-Roman et al. 2013). Unfortunately, only a handful of reports from South America have included *V. parahaemolyticus* serotyping, which does not allow us to trace the frequency of outbreak strains along the South American coast temporally. Considering the serotyped samples, it is noted that serotype O3:K6 is still a public health concern in and it has been observed more frequently in outbreaks and environmental samples than O4:K12 serotype.

The first report of *V. parahaemolyticus* pandemic strain O3:K6 in South America was one isolated case in Trujillo, Peru in 1996 in a 6-month-old baby, and occurred simultaneously to the outbreak in Calcutta in February 1996. However, the first Peruvian outbreak related to the O3:K6 strain occurred in Lima, in 1998, which coincided with a strong ENSO occurrence and the strain was found to be similar to that found in Calcutta outbreak in 1996 (Gil et al. 2007). In Chile, the first report occurred in Antofagasta, in 1997 and the serotype has been present on the Chilean coast since then (González-Escalona et al. 2005; García et al. 2009; Dabanch P. et al. 2009). In 2005, there were nearly 11,000 cases reported by the Ministry of Health of Chile, with more than 95% of the cases caused by serotype O3:K6 (García et al. 2009). This strain was also found to cause gastroenteritis cases in Brazil in Pernambuco, Alagoas, and Ceara in 2002 (Leal et al. 2008). These states are within the tropical region, in northeast Brazil, characterized by warm waters and high tourism activity. Unfortunately, there is information about the number of cases only in Ceara outbreak, with 26 reported cases between guests of two hotels, and in which *V. parahaemolyticus* O3:K6 was found in 45% of the cases. Although the bacterium was not isolated from any food sample (FUNASA 2002), which could have been due to imprecise detection methodology or to inadequate food sample maintenance. This outbreak in Ceara highlights the importance of an adequate surveillance system, not only to generate more accurate data about foodborne disease outbreaks, but also to ensure the correct treatment is administered. There were also outbreaks in 2003 and 2004 in Brazil, with no information available about location or serotype (Brasil 2014).

Notably, most of the recent reports do not discuss serotype information. Beyond the absence of information on *V. parahaemolyticus* serotypes in the reports referenced in Table 1, there is also a lack of information on salinity and seawater temperature. These two environmental parameters are critical to understanding the ecology of the species. *V. parahaemolyticus* growth is favored by warmer temperatures, between 5 and 43°C, with optimum temperature 37°C, and by moderate salinity, in a range of 0.5 to 10‰, with optimum growth between salinity of 1.5-3.0‰ (WHO and FAO 2011). These environmental parameters are often observed on South American coasts, especially in estuarine areas or after tropical rainfalls. Moreover, the ENSO oscillation that occurs along the Pacific coast, brings warm seawater to this area that can favor the presence of the bacteria on the South American west coast and increase the occurrence of cases and outbreaks.

A review of the data shows a broad variation in salinity and temperature in South America. Seawater temperature on the Atlantic coast varied between 14.4°C (Costa Sobrinho et al. 2010) to 35°C (Markman 2008), which is within the range of the survival and growth of the bacterium. Salinity ranged between 3‰ (Sousa et al. 2004) to 41.6‰ (Lira et al. 2001). The remarkably higher salinity data found (41.6‰) was logged in an estuarine area on the Brazilian northeast coast, with a water temperature of 30°C. The shellfish samples contained around 10³ CFU g⁻¹ of sucrose negative colonies on TCBS agar, which indicates the presence of *V. parahaemolyticus*. Approximately 60% of those isolates were confirmed to be *V. parahaemolyticus* by biochemical tests (Lira et al. 2001). It is important to note that even under extreme conditions, such as high salinities, researchers were able to collect the bacterium, showing that it can be a potential health hazard to molluscan shellfish consumers.

Since there is not any official monitoring program for *V. parahaemolyticus* in shellfish production area or seawater in South American countries, the data presented in this review are not uniform in respect to the methodology used, temporal or spatial coverage, and do not provide enough information to establish relationships between bacterial abundance and environmental parameters. These factors are needed to perform predictive analyses.

Among the studies found in this review, two of them, from the same author, deserve to be mentioned for robust monitoring and the inclusion of environmental parameters, serotyping and PCR confirmation for thermostable direct hemolysin (*tdh*) and *tdh*-related

hemolysin, *trh*. genes. The presence of one or both of these genes is typically associated with host cell cytotoxicity (Nishibuchi and Kaper 1995; Broberg et al. 2011). Ramos (2007; 2012), studied the prevalence of vibrios in oysters and seawater in Santa Catarina, the main oyster production area in Brazil. *V. parahaemolyticus* was found as the most prevalent *Vibrio* specie in both studies. Samples were examined for potential virulence by assaying for the presence of *tdh* and *trh* genes. There were positive strains for *tdh* and *trh* genes, but no positive strain was found on Wagatsuma agar. The hemolysis caused by some *V. parahaemolyticus* strains on this medium is called “Kanagawa phenomenon” and it is positively related to human pathogenicity. It was found that *tdh* is responsible for the Kanagawa phenomenon (Honda et al. 1980), although there are cases of Kanagawa negative and *tdh* positive strains (Vieira et al. 2011; Ramos 2012). Ramos (2012) found no correlation between environmental parameters and the presence of *V. parahaemolyticus* when the sampling occurred in a temperature range between ca. 21°C and 28°C, during summer and spring seasons. In another study, Ramos (2007) collected samples all year and there was a positive correlation with the incidence of *Vibrio* and seawater temperature, ranging from 18°C to 29°C. Ramos (2012) identified the presence of pandemic *V. parahaemolyticus* serotype O3:K6 among 83 *V. parahaemolyticus* strains collected and found ca. 37% as *trh* positive and 5% as *tdh* positive. The *trh* and *tdh* genes were found occurring simultaneously in 4.3% of oyster samples and in 5% of seawater samples. Although, all the strains found were Kanagawa negative.

Regrettably, none of the most recent reports published after 2009 serotyped *V. parahaemolyticus* in environmental sampling or in clinical cases. This information is crucial to trace pathogenic serotypes and to establish a control plan to reduce the number of cases and outbreaks. Table 2 shows outbreaks and isolated cases generated by *V. parahaemolyticus* in South American countries in chronological order. The last report of disease caused by serotype O3:K6 in South America was in Chile (García et al. 2009) in 2009, the same year the serotype was found in environmental samples from Brazil (Ramos 2012). Although, the lack of serotyping information from the strains found after 2009, does not allow us to identify the presence this *V. parahaemolyticus* serotype in recent years in SA.

Although primary septicemia caused by *V. parahaemolyticus* is rare, it can occur in individuals with underlying chronic illness (Parveen and Tamplin 2013). In SA, Dabanch *et al.* (2009) reported the first case

of septicemia due to *V. parahaemolyticus* in Puerto Montt, in Chile, which occurred in 2008.

V. parahaemolyticus human cases are more frequent on the Pacific coast of SA, and the majority of the reports coincide with ENSO occurrences. Furthermore, the spread of *V. parahaemolyticus* infections from Peru to Chile follows the same course observed during ENSO currents, with warm waters towards south, which is the opposite of normal Peru Current route, as seen in Figures 1 and 2. From 1993 until 1997, *V. parahaemolyticus* cases were concentrated on the Peruvian coast (Gil et al. 2007; Martínez-Urtaza et al. 2008). After 1997, the bacterium spread to Chile, where it is still causing outbreaks (Córdova et al. 2002; González-Escalona et al. 2005; García et al. 2009; Dabanch et al. 2009; Chile. 2014; Chile. 2015). These facts highlight the influence of ENSO on the spread and escalation of the disease along South American Pacific coast. Despite all of the cases and outbreaks in Peru and Chile, there are only a few publications about the presence of *V. parahaemolyticus* in environmental samples along the Pacific coast. Thus, the area in which the most cases have occurred is the region in which there is the least amount of available environmental data.

All of the cases reported above resulted from isolated research efforts, and most likely are a vast underrepresentation of the real number of infections. These data are an indication of the factors that can affect the patterns of disease in South American countries.

Strikingly, the disease caused by *V. parahaemolyticus* is not listed as a notifiable disease in any country in SA, although in contrast, all diarrheal and foodborne diseases are, and *V. parahaemolyticus* infections are included in this latter category. However, the epidemiological surveillance system on the continent is inaccurate, with a high percentage of foodborne diseases outbreaks classified as being from unspecific causes. Thus, cases of diarrhea caused by *V. parahaemolyticus* on the continent could be underestimated and underreported. This leads to weak food inspection programs regarding these bacteria as there are not enough data to justify costly control and warning systems.

Table 1 Reports of *Vibrio parahaemolyticus* in environmental and seafood samples in South America

Year	Country	State/ Region	Observation/ matrix	Serotype	Reference
1971	Argentina	Chubut	Mussel		Casellas et al. 1977
1976	Brazil	Sao Paulo	Oyster	O5:K17, O5:K47, O3:K45, O1:K32, O11:K5, O3:K33	Leitão et al. 1976
1979	Brazil	Sao Paulo	Oyster		Gelli et al. 1979
1979	Brazil	Ceara	Fish		Hofer and Silva 1974
1980	Peru	Trujillo	Crab and water		Bocanegra et al. 1981
1980	Brazil	Bahia	Mollusks, shellfish, crustaceans, fish		Franca et al. 1980
1982	Brazil	Rio de Janeiro	Oyster and water	O1:K32, O1:K33, O2:K28, O3:K29, O3:K*, O4:K13, O4:K*, O6:K61, O5:K*, O8:K20, O11:K15	Rodrigues and Hofer 1986
1984	Peru	Lima	Ceviche	O4:K33, O1:K33, O2:K28, O4:K12 , O5:K17, O3:K30, O1:K33, O7:K19, O2:K22, O3:K33, O11:K61.	Guevara-Duncan et al. 1989
1986	Brazil	Rio de Janeiro	Fish	O2:K28	Hofer and Silva 1986
1988	Brazil	Rio de Janeiro	Squid		Lima et al. 1994
1990	Brazil	Ceara	Lobster	Serogroups K.	Vieira and Iaria 1993

1990	Brazil	Sao Paulo	Mussel Temp: 23-23.5°C Salinity: 32-33‰	Matté et al. 1994
1990	Brazil	Sao Paulo	Oyster	Rojas et al. 2011 Archer and Moretto 1994
1994	Brazil	Santa Catarina	Mussel Temp: 23-28.5°C Salinity: 35-36.5‰	
1994	Brazil	Sao Paulo	Mussel	O5:K30, OND:K30, OND:K17, OND:KND, OND:K39, OND:K22, O1:K30, O3:K17, O5:KND, OND:K13, OND:K34, OND:K11
1994	Brazil	Sao Paulo	Mussel	Matté et al. 2007
1998	Brazil	Rio de Janeiro	Oyster and mussel	Pereira et al. 2004
				O10:K*, O1:K*, O5:K17, O8:K*, O2:K28, O10:K69, O2:K3, O3:K57, O3:K72, O11:K*, O2:K*, O4:K*, O4:K42, O10:K52, O11:K19, O1:K32, O3:K33, O4:K34, O5:K47, O11:K34, O1:K12, O1:K33, O2:K25, O2:K30, O3:K*, O3:K5, O3:K6 , O3:K30, O3:K31, O3:K36, O4:K12 , O5:K25, O6:K*, O8:K11, O8:K39, O8:K41, O9:K*, O10:K7, O10:K25, O10:K31, O10:K60, O11:K22, O11:K36, O11:K40

1999	Brazil	Pernambuco	Oyster and water Temp: 26-30°C Salinity: 27-42‰	Lira et al. 2001
1999	Brazil	Sao Paulo	Oyster and water Temp: 19-28°C Salinity: 16-21‰	Ristori et al. 2007
2001	Brazil	Maranhao	Clam and mussel Temp: 30-32°C Salinity: 9-23‰	Serra et al. 2001
2001	Brazil	Ceara	Oyster Salinity: 3‰	Sousa et al. 2004
2002	Brazil	Santa Catarina	Oyster, mussel and water Temp: 20-28°C Salinity: 29-36‰	Silva 2003
2003	Brazil	Ceara	Oyster	Barros et al. 2003
2003	Brazil	Ceara	Crab	Vieira et al. 2004
2004	Venezuela	Sucre	Mussel	Grau et al. 2004
2004	Brazil	Rio de Janeiro	Mussel	Lafisca et al. 2008
2004	Brazil	Sao Paulo	Tuna	Chen 2004
2004	Venezuela	Sucre	Clam and mussel	Munoz et al. 2008
2005	Brazil	Rio de Janeiro	Marine mammals	Pereira et al. 2007a
2005	Brazil	Rio Grande do Sul	Marine mammals	Pereira et al. 2007a
2005	Brazil	Ceara	Shrimp and water	Costa 2006
2006	Brazil	Pernambuco	Shrimp and water	Mendes et al. 2009

2006	Colombia	Cartagena	Oyster	López et al. 2010
2007	Brazil	Rio de Janeiro	Mussel	Pereira et al. 2007b
2007	Brazil	Santa Catarina	Oyster Temp: 23-24°C Salinity: 33-34‰	Ramos 2007
2007	Brazil	Rio Grande do Norte	Shrimp	Melo et al. 2011
2007	Brazil	Santa Catarina	Oyster Temp: 18-29°C	Ramos et al. 2012
2008	Brazil	Sao Paulo	Water Temp: 20-32°C Salinity: 19-32‰	Markman 2008
2008	Brazil	Parana	Water Temp: 16-35°C Salinity: 17-27‰	Markman 2008
2008	Brazil	Pernambuco	Water Temp: 23-29°C Salinity: 8-35‰	Markman 2008
2008	Venezuela	Sucre	Clam	Muñoz et al. 2008
2009	Peru	Lima	Fish Temp: 20°C	Altiaga et al. 2010
2009	Chile	Region de los Lagos	Molluscan shellfish O3:K6, O3:KUT	Garcia et al. 2009
2009	Brazil	Santa Catarina	Oyster and water Temp: 21-28°C Salinity: 31-34‰	Ramos et al. 2014

2009	Brazil	Santa Catarina	Oyster and water Temp: 24°C Salinity: 12-36‰	O1:K1, O1:K25, O1:K41, O1:K69, O1:KUT, O2:K3, O2:K28, O3:K6, O3:K30, O4:K34, O4:K63, O5:K61, O6:K4, O6:K6, O6:K18, O6:K46, O7:K7, O7:K19, O8:K20, O8:K39.	Ramos 2012
2009	Brazil	Bahia	Oyster		Rodrigues and Carvalho-Filho 2011
2009	Brazil	Ceara	Oyster		Vieira et al. 2011
2010	Brazil	Sao Paulo	Oyster Temp: 14-28°C Salinity: 5-30‰		Costa Sobrinho et al. 2010
2010	Brazil	Sao Paulo	Oyster		Costa Sobrinho et al. 2011
2010	Brazil	Ceara	Oyster		Vieira et al. 2010
2011	Brazil	Sao Paulo	Mussel, oyster		Rojas et al. 2011
2011	Brazil	Rio de Janeiro	Mussel		Oliveira 2012
2012	Chile	Puerto Montt	Molluscan shellfish		Aranda et al. 2015
2014	Brazil	Piaui	Shrimp		Muratori et al. 2014

Table 2 Reports of *V. parahaemolyticus* incidence in isolated human cases and outbreaks in South America

Year	Country	State/ Region	Cases / Outbreak information	Strain identification/ serotype	Reference
1975	Brazil	Ceara	Isolated case	O5:K17	Hofer 1983
1989	Brazil	Pernambuco	Outbreak	O4:K12 , O1:K56, O3:K5, O3:K58, O3:KUT, O4:K4, O4:K10, O4:K53, O5:KUT, O10:KUT	Magalhães et al. 1991
1993	Peru	Trujillo	Outbreak	O2:K3, O4:K8, OUT:KUT	Gil et al. 2007
1994	Peru	Lima, Trujillo	Outbreak	OUT:K3, O2:K3, O2:KUT, O4:K8	Gil et al. 2007
1995	Peru	Lima	Outbreak	O4:K12 , OUT:K46	Gil et al. 2007
1996	Peru	Trujillo	Outbreak	O3:K6 , O4:K8, OUT:K8.	Gil et al. 2007
1997	Peru	Lima, Arequipa	Outbreak	O3:K6 , O4:K12	Gil et al. 2007
1997	Peru	Lima, Cajamarca, Lambayeque, Monqueagua	Outbreak	O3:K6	Martinez-Urtaza et al. 2008
1998	Peru	Lima	Outbreak	O3:K6	Martinez-Urtaza et al. 2008
1998	Chile	Antofagasta	Outbreak	O3:K6 , O1:K56	González- Escalona et al. 2005
1998	Chile	Antofagasta	Outbreak		Córdova et al.

1998	Peru	Lima, Trujillo	Outbreak	O3:K6 , O3:K68, O3:K58, O4:K8, O4:K12 , O11:KUT, O11:K15, OUT:KUT	2002 Gil et al. 2007
1998	Peru	Lima	Outbreak		Ibarra et al. 1999
1999	Peru	Lima, Lambayeque	Outbreak	O3:K6 , O3:KUT	Martinez-Urtaza et al. 2008
1999	Brazil	Maranhao	Wound		Rodrigues et al. 2001
1999	Peru	Lima	Outbreak	O3:K6	Gil et al. 2007
2000	Peru	Lima	Outbreak	O3:K6 , O4:K12	Gil et al. 2007
2001	Peru	Lima, Lambayeque, Iquitos	Outbreak	O3:K6	Martinez-Urtaza et al. 2008
2001	Peru	Lima	Outbreak	O6:K18	Gil et al. 2007
2001	Brazil	Pernambuco	Outbreak	O3:KUT	Leal and Franco 2008
2002	Peru	Lima	Outbreak	O3:K6	Martinez-Urtaza et al. 2008
2002	Brazil	Pernambuco	Isolated case and outbreak samples 26 cases/9 confirmed O3:K6, due to raw crab leg)	O3:K6	Leal et al. 2008; FUNASA 2002

2002	Brazil	Ceara	Outbreak	O3:K6	Leal and Franco 2008
2002	Brazil	Alagoas	Isolated case	O3:K6	Leal and Franco 2008
2003	Peru	Lima, Cajamarca	Outbreak	O3:K6	Martinez-Urtaza et al. 2008
2003	Brazil		2 outbreaks		Brasil 2014
2004	Brazil		1 outbreak		Brasil 2014
2004	Chile	Puerto Montt	Outbreak	O3:K6, O4:K12	González-Escalona et al. 2005
2004	Chile	Region de los Lagos	Outbreak / 1,500 cases	O3:K6	Garcia et al. 2009
2005	Chile	Region de los Lagos	Outbreak / 3,725 cases	O3:K6	Garcia et al. 2009
2006	Chile	Region de los Lagos	Outbreak / 1,083 cases	O3:K6	Garcia et al. 2009
2007	Chile	Region de los Lagos	Outbreak / 477 cases	O3:K6	Garcia et al. 2009
2008	Chile	Puerto Montt	Outbreak / 1,153 cases	O3:K6, O3:KUT, O4:KUT	Garcia et al. 2009
2008	Chile	Puerto Montt	Isolated case, septicemia		Dabanch P. et al. 2009
2009	Ecuador		Isolated case	OUT:K29	Ottaviani et al. 2013

2009	Chile	Region de los Lagos	Outbreak / 441 cases	O3:K6, O3:KUT	Garcia et al. 2009
2011	Brazil		1 outbreak		Brasil 2014
2012	Brazil		2 outbreaks		Brasil 2014
2013	Chile	Coquimbo, Valparaiso, Maule, Biobío, Los Ríos	31 outbreaks / 383 cases Jan-April		Chile 2014
2014	Chile	Arica y Parinacota, Atacama, Coquimbo, Metropolitana, Maule, Biobio	5 outbreaks / 26 cases and 3 isolated cases Jan-April		Chile 2015
2014/ 2015	Uruguay	Río de la Plata Estuary	3 cases wound infection (cellulitis)		Camou, T., 2015 pers.communic.
2015	Chile	Arica y Parinacota, Tarapaca, Coquimbo, Valparaiso, Metropolitana, Maule, Los Ríos	8 outbreaks / 60 cases and (Jan-April)		Chile 2015

UT = untypeable

***Vibrio vulnificus* occurrence in South America**

The presence of *V. vulnificus* in environmental and seafood samples in South America is less documented than *V. parahaemolyticus*. It is mostly reported in studies focused on *V. parahaemolyticus*, in which they also detected *V. vulnificus*, all from the Atlantic and Caribbean coasts, as seen in Figure 3, where reports from environmental and human cases are shown.

V. vulnificus has been recorded in South America since 1982 when it was found in estuarine water samples in Rio de Janeiro State in Brazil, but there was no information on temperature or salinity (Rodrigues and Hofer 1986). However, as with *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* samples taken from different sites and seasons, and analyzed through differing methodologies, do not allow analysis of its prevalence temporally in SA. Table 3 presents *V. vulnificus* records of environmental and seafood samples from South American countries. Seawater temperature and salinity ranges are listed when present in the article cited. The methodology used by different authors is rarely the same, and was potentially inadequate to detect the bacteria, especially since most of the studies were based only on microbiological and biochemical identification, without molecular confirmation.

Higher prevalence of *V. vulnificus* can be found in seawater with a salinity range between 5 and 20‰ (Parveen and Tamplin 2013), the consensus is that *V. vulnificus* has a maximum environmental salinity tolerance of about 25‰ (Kaspar and Tamplin 1993; Motes et al. 1998; Arias et al. 1999; Macián et al. 2000; Wetz et al. 2008; Froelich et al. 2012). While *V. vulnificus* can survive at higher salinities, it becomes difficult to isolate and is considered to be rare (Froelich et al. 2012; Staley et al. 2013; Froelich et al. 2015). According to Froelich and Noble (2014), keeping oysters bathed in high salinity (>30‰) water is able to reduce the level of *V. vulnificus* in oyster meat. The relationship between vibrios and salinity has been identified by some studies (Johnson et al. 2010; Reyes-Velázquez et al. 2010; Igbinsosa et al. 2011), while others did not (Singleton et al. 1982; Nigro et al. 2011; Costa Sobrinho et al. 2014), demonstrating that the relationship with salinity may be variable and complex (Johnson et al. 2012). Although, as seen in Table 3, salinity in South America is found to be, in general, higher than 25‰, which could explain the lower prevalence of *V. vulnificus* compared to the USA. In Brazil, Ramos (2007) found *V. vulnificus* in oyster and seawater samples with salinities ranging between 33 to 34‰. Silva (2003) and Ramos (2012) also found *V. vulnificus* in environmental samples in Brazil where salinity was as high as 36‰,

which is above the normal upper limit of salinity expected to permit the presence of *V. vulnificus*, although none of the authors tested the presence of potentially pathogenic strains and there are no cases of infections reported for this area (Ramos et al. 2012; Froelich and Noble 2014).

Because of the difficulty in differentiating *V. vulnificus* from other *Vibrio* sp. on culture media, polymerase chain reaction (PCR) is typically employed to confirm presumptive colonies. The gene *vvhA* can be used to confirm *V. vulnificus* presence, but it does not differentiate potentially pathogenic and nonpathogenic strains. There are other genes, including the virulence correlated gene (*vcg*) (Warner and Oliver 2008) that provide some indication of potential pathogenicity. Only two studies used PCR to confirm the presence of *V. vulnificus* in South American environmental samples. Oliva (2012) used the gene *vvhA* to confirm *V. vulnificus* in mussels and Raszl *et al.* (2016) used the genes *vcgE* and *vcgC* and confirmed the presence of a pathogenic strain in an oyster sample from Brazil. All other studies were based on culture media alone, mainly Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS), and/or biochemical tests. Ramos (2012) analyzed oysters and seawater samples and collected data on salinity, temperature and rainfall, though there was no PCR confirmation for *V. vulnificus*. Ramos (2012) found a positive correlation between *V. vulnificus* presence in seawater samples and seawater temperature, and also with weekly precipitation levels from the week antecedent to sampling, which agrees with studies from Høi et al. (1998), Strom and Paranjpye (2000), Lhafi and Khune, (2007) and Blackwell and Oliver (2008). But there was no correlation found between *V. vulnificus* and salinity in seawater samples as has been found previously in Brazil (Ramos 2007; Ristori et al. 2007) and in other areas of the world (Høi et al. 1998; Parveen et al. 2008; Blackwell and Oliver 2008).

In some studies, *V. vulnificus* was found to be highly prevalent, as in the study performed by Matté *et al.* (1994) who found *V. vulnificus* in 17% of mussels tested, and Garcia-Moreno and Landgraf (1997) found 55% of samples from mussels, oysters and shrimp tested. Moreover, Nascimento *et al.* (2001) found *V. vulnificus* in 35% of shrimp samples. Costa *et al.* (2013) found 11.4% *V. vulnificus* presumptive in samples from frozen oysters, which were confirmed through biochemical tests. However, in other studies, the prevalence is low as 4% (Pereira et al. 2007; Ramos 2007). It is difficult compare quantitative data from the scientific articles reporting *V. vulnificus* in environmental samples because of variable methodologies.

Given the reports of *V. vulnificus* from environmental water and seafood samples, there are relatively few clinical cases reported in SA. Some countries that have had confirmed *V. vulnificus* cases, such as Uruguay, Ecuador and Peru, did not previously have any report from environmental samples or in seafood. Therefore, any correlative analysis between environmental and clinical samples is impossible. Infections cases of *V. vulnificus* in South America are reported only in Brazil, Uruguay, Ecuador and Peru. The first case was diagnosed in 1997 in Uruguay. All the reported cases in South America showed in Figure 3 are detailed in Table 4.

Figure 3 Map of *V. vulnificus* reports from environmental samples (blue tags), and cases and outbreaks (red tags) in South America, with tags showing the year of occurrence.



Table 3 Reports of *V. vulnificus* incidence in environmental and seafood samples in South America

Year	Country	State/ Region	Matrix	Temp. / Salinity	Reference
1982	Brazil	Rio de Janeiro	Water		Rodrigues and Hofer 1986
1990	Brazil	Sao Paulo	Mussel	Temp.: 23-23.5°C Salinity: 32-33‰	Matté et al. 1994
1995	Brazil	Sao Paulo	Molluscan shellfish, shrimp		Garcia-Moreno and Landgraf 1997
1999	Brazil	Sao Paulo	Oyster and water	Temp.: 19.2-28°C Salinity: 16-21‰	Ristori et al. 2007
2001	Brazil	Ceara	Shrimp		Nascimento et al. 2001
2002	Brazil	Santa Catarina	Molluscan shellfish, water	Temp.: 19.2-28°C Salinity: 29-36‰	Silva 2003
2002	Venezuela	Sucre	Mussel		Grau et al. 2004
2003	Brazil	Ceara	Oyster		Barros et al. 2003
2005	Brazil	Ceara	Water		Costa, 2006
2005	Brazil	Rio de Janeiro	Marine mammals		Pereira et al. 2007a
2005	Brazil	Rio Grande do Sul	Marine mammals		Pereira et al. 2007a
2006	Brazil	Pernambuco	Shrimp and water		Mendes et al. 2009
2006	Colombia	Cartagena	Oyster		López et al. 2010
2007	Brazil	Rio de Janeiro	Mussel		Pereira et al. 2007b
2007	Brazil	Santa Catarina	Oyster	Temp.: 22.27-23.57°C	Ramos 2007

2007	Brazil	Santa Catarina	Oyster	Salinity: 33.13-34.03‰ Temp.: 18-29°C	Ramos et al. 2012
2009	Brazil	Santa Catarina	Oyster and Water	Temp.: 20.9-27.5°C Salinity: 30.7-33.9‰	Ramos et al. 2014
2009	Brazil	Santa Catarina	Oyster and Water	Temp.: 24.3°C Salinity: 12-36‰	Ramos 2012
2009	Brazil	Ceara	Oyster		Vieira et al. 2011
2010	Brazil	Ceara	Frozen oyster		Costa et al. 2013
2010	Brazil	Ceara	Oyster		Vieira et al. 2010
2011	Brazil	Rio de Janeiro	Mussel		Oliva 2012
2014	Brazil	Santa Catarina	Oyster	vcgC and vcgE strains Temp.: 22.2°C Salinity: 34.18‰ (VcgC) 34.83‰ (VcgE)	Raszl, 2016.

Table 4 Reports of *V. vulnificus* incidence in isolated human cases and outbreak in South America

Year	Country	State/Region	Case/outbreak information	Reference
1997	Uruguay	Río de la Plata Bay	Water contact, sepsis. Isolated case.	Carrerou-Perreng 2001
1998	Peru	Lima	Acute diarrhea. 3 cases.	Ibarra et al. 1999
2000	Uruguay	Maldonado	Water contact, sepsis. Isolated case.	Chicheff et al. 2001
2001	Chile	Imported case from El Salvador	Ingestion of raw oyster. Sepsis. Isolated case.	Poblete et al. 2002
2004	Brazil	São Paulo	Molluscan shellfish consumption. Isolated case.	Araujo et al. 2007a
2004	Brazil	Rio de Janeiro	Wound infection. Isolated case.	Brack et al. 2004
2005	Uruguay	Río de la Plata Bay	Water contact. Wound infection. Isolated case.	Camou, T., 2015 (not published)
2007	Uruguay	Río de la Plata Bay	Water contact. Wound infection. Isolated case.	Camou, T., 2015 (not published)
2012	Brazil	Paraná	Probably by molluscan shellfish consumption. Sepsis.	França et al. 2013
2012	Ecuador	Quito	Isolated case. Sepsis.	Villacrés et al. 2013
2013	Ecuador	Ibarra	Isolated case. Sepsis.	Villacrés et al. 2013
2014	Uruguay	Río de la Plata Bay	Water contact. Wound infection. Isolated case.	Camou, T., 2015 (not published)
2014/15	Uruguay	Punta del Este	Water contact. Outbreak, 4 cases, 2 death.	Uruguay 2015

Severe sepsis has been described as the most common presentation of *V. vulnificus* infection. It is generally characterized by bacteremia without an evident focus of infection. Symptoms typically occur within 7 days, and they start with an abrupt onset of fever and chills, followed by metastatic infection characterized by cutaneous lesions, usually on the lower extremities or the trunk. Ibarra *et al* (1999) reported on *V. vulnificus* in three cases of acute diarrhea in Peru in 1998. One of the patients discussed had a co-infection with *V. cholera* O1, but there was no follow up information available and thus it is not possible to know if the symptoms evolved to sepsis. Diarrhea is not a common symptom caused by *V. vulnificus* but there are some reported cases of patients presenting gastroenteritis, characterized by vomiting, diarrhea, and abdominal pain, with a stool culture yielding *V. vulnificus*, negative blood cultures, and no skin lesions or septicemia caused by *V. vulnificus* (Klontz *et al.* 1988; Horseman and Surani 2011). Gastrointestinal symptoms often precede fever, chills, and cutaneous manifestations. Cutaneous lesions may progress to necrotic ulcers, necrotizing fasciitis, necrotizing vasculitis, or myonecrosis. Septic shock can occur in more than 50% of the cases. Hypotension during the first 12 h or leukopenia is often associated with a very poor prognosis. It has also been reported mental status changes characterized by lethargy or disorientation in half the patients (Horseman and Surani 2011).

The single case reported in Chile was recorded as being originated in El Salvador, a Central America country. A 53-year-old man, with diabetes and chronic liver disease, returned from a trip to El Salvador and had eaten raw oysters. Notwithstanding the rapid diagnosis, the man died after 68 hours of hospitalization (Poblete *et al.* 2002). Despite all the reports about *V. parahaemolyticus* in Chile, there is no information about the presence of *V. vulnificus* in environmental samples as well as in human cases, in this country, nor in El Salvador, from where the infection was supposed to be acquired.

In 2013, Ecuador had reported two cases of *V. vulnificus* that resulted in sepsis during summer season 2012/ 2013. Both patients were men with previously documented health disorders (diabetes and aplastic anemia, respectively). One of the patients presented a gastrointestinal disease prior to sepsis. Both cases resulted in death and there was no history of molluscan shellfish consumption, but it is intriguing that the cases occurred away from the coast (in Quito and in Ibarra). The authors confirmed the strains through the *rrs* gene (Villacrés *et al.* 2013).

In Brazil, regardless of the number of reports indicating the presence of *V. vulnificus* in seawater, in shellfish and in marine

mammals (Garcia-Moreno and Landgraf 1997; Ramos 2007; Pereira et al. 2007; Ramos 2012; Costa et al. 2013); there are only three infection cases reported, and two of them occurred in 2004 in areas that are close to one another. The first case reported in Brazil was related to an injury caused by a wood fragment, in a 53-year-old man, in Rio de Janeiro state. The case evolved to septicemia and the death occurred five days later (Brack et al. 2004). The second case was acquired by seafood ingestion (mussels and octopus) in the coast of Sao Paulo state, in an 86-year-old man, with a history of pancreatic, and hepatic and renal chronic disorders. The symptoms started with gastroenteritis and evolved to sepsis. The patient died after 12 days, due to fungemia caused by *Candida albicans* (de Araujo et al. 2007). The third case in Brazil occurred in Parana State, in 2013. The patient was a 39-year-old man, who was admitted to the hospital for elective liver transplantation due to an ulcerative colitis and sclerosing cholangitis. The man had been in the coast one day before being admitted in the hospital. Before the surgery, the symptoms of primary septicemia began and despite the diagnosis and the treatment applied, he died 32 hours after the onset of the symptoms (França et al. 2013).

Uruguay is the country in South America with the higher number of *V. vulnificus* cases, which occurred all the same area and were related to seawater contact. This country reported the first case of *V. vulnificus* infection in SA, in 1997, in the estuarine area of Rio de la Plata (Perreng and Luis 2001). The patient, a 60-year-old, and diabetic man, reported to be fishing at Rio de la Plata estuary the day before, letting both legs for hours into the water. The infection was evolved to sepsis and caused the death of the patient even with bilateral leg amputation. Another case occurred in 2000, in Maldonado Department, also in the estuarine area of Rio de la Plata, from a 57-year-old woman; with diabetes, using weekly immunosuppressive medication, and who had surgical wound not completely scarred; and had been in seawater 24 to 36 h before the first symptoms. She presented wound infections and also gastroenteritis, but she survived after 12 days of intensive treatment in hospital (Chicheff et al. 2001). Other cases occurred in Uruguay in 2005, 2007 and 2014/2015 summer season, all from the same area, having the cases from 2005 and 2007 evolved to sepsis and death, while in 2014/2015 summer season, two out of four patients died as consequence of the infection (Uruguay 2015). The information from 2005 and 2007 is not published, they were obtained from personal communication with Dr. T. Camou, from the Ministry of Public Health from Uruguay.

There were two outbreaks of *V. vulnificus* in SA, three cases occurring in Peru, without follow up of the patients (Ibarra et al. 1999) and another outbreak with four cases in Uruguay, as reported by the Ministry of Health in the 2014/2015 summer season in Punta Del Este, resulting in two deaths (Uruguay 2015). All cases from Uruguay occurred in the same area, an estuary that can present salinity rates around 20‰ and seawater temperature that can be as high as 25°C in summer seasons, as reported by Piola et al. (2003). There is no information about the presence of *V. vulnificus* in environmental samples from Uruguay, specifically from Rio de la Plata estuarine water where the infection cases occurred. Summer seawater temperature and salinity in Rio de la Plata are permissive for *V. vulnificus*, yet more studies are needed to determine if one or both parameters are related to these infections or if there are other factors that could influence the presence of pathogenic strains in the area. An increase in *V. vulnificus* cases in South America since 2012 has been observed, which could be related to an increase in the concentration of the bacteria, but it also could be evidence of increased surveillance (personal communication, T. Camou, Ministry of Public Health of Uruguay 2015).

Except for the gastrointestinal cases from Peru, all the reports of *V. vulnificus* human cases occurred on the Atlantic coast. Comparing the distribution maps from *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in South America (Figs. 1, 2 and 3), it can be seen that the only places where both bacteria were reported causing infection were Peru, Ecuador and Uruguay. It also appears that there could be some factor that affects the distribution of pathogenic strains of *V. parahaemolyticus* or *V. vulnificus* in some areas, which is not observed for environmental strain distribution. These factor could be related to seawater temperature, oceanic currents, salinity, or even with association of *Vibrio* pathogenic strains with other marine organisms, and also could be due to bacterial genetic characteristics, but it is difficult to establish since there is not a continuous monitoring and not all the countries had published environmental data, besides this is an assumption that needs to be further studied with environmental data and genotyping information.

Climate impact on *Vibrio* populations

V. parahaemolyticus and *V. vulnificus* occurrence in the estuaries and along the coastlines of South America is ubiquitous, and therefore, they are also commonly found in shellfish grown in these areas (Pereira et al. 2004; Markman 2008; Muñoz et al. 2008; Ramos et al. 2014; Aranda et al. 2015). In the United States, temperature and salinity have

been determined to be fundamental predictors of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* abundance. For a recent review of how environmental factors affect the concentration of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in oysters, see Froelich and Noble (2015). Salinity along the South America coast varies with precipitation and proximity to estuaries. For example, the Amazon River outflow can cause a decrease in the salinity that is observed more than 300 km from the mouth of the river (Dias 2007).

Moreover, ENSO, which happen every three to four years, cause an increase in seawater temperatures on the Pacific coast, as well as an increase in precipitation levels in tropical and equatorial areas on both coasts of SA. These temperature increases and precipitation associated with salinity decreases could play a major role in *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* proliferation and, consequently, enhance the probability of cases and outbreaks generated by these bacteria. The hypothesis of ENSO role spreading waterborne diseases as a long-distance corridor between Asia and the Americas has also been presented by Martinez-Urtaza et al. (2016). Besides ENSO, decreases in sea surface salinity in the western and central equatorial Pacific can happens due to low salinity water that is brought in by anomalous eastward surface currents, and to a lesser extent due to excess rainfall in the Pacific Ocean (Zhu et al. 2014). According to Latif and Grötzner (2000) the effects of ENSO can also impact the Atlantic coast, often with a lag period of six months. The area also has another similar phenomenon, the Equatorial Atlantic oscillation, which happens ca. every 30 months. However, as water temperatures on the Atlantic coast are warm, the impact of ENSO and the Equatorial Atlantic oscillation on the Equatorial and Tropical Atlantic coast can be lesser than those observed for ENSO on the Pacific coast in relation to *Vibrio* sp.

Another consequence of ENSO is the spread of *V. parahaemolyticus* from other continents to the South American Pacific coast. According to Martinez-Urtaza (2011), the 1997 *V. parahaemolyticus* outbreak in Peru coincided with an ENSO phenomenon. The authors had analyzed data from *V. parahaemolyticus* strains from human cases in Peru between 1994 and 2005, and also studied the distribution and environmental parameters of these cases. The strains from the 1997 outbreak were identified as being serotype O3:K6 and showed a close correspondence with the arrival and circulation of 1997 ENSO along the South American Pacific coast. Moreover, the increase in surface seawater temperature from 18°C -

23°C increased the risk of infection by 600-fold (Martinez-Urtaza et al. 2008).

ENSO also could explain *V. vulnificus* cases in Peru in 1998 (Ibarra et al. 1999; Martinez-Urtaza et al., 2016), a year notable for the elevated strength of ENSO (CPTEC/INPE 2015). More studies are needed, though, to confirm the influence of the Peru Current and/or ENSO on *V. vulnificus* abundance in South America to determine if it is not being monitored in the area, and it could be an underreport case. Adopting a policy of notification would allow countries to better monitor the prevalence of *V. vulnificus*, and to establish control plans in order to prevent and to inform people at high risk for infection. It also would permit doctors to better diagnose and to give safety recommendations to their patients.

Overall Conclusions

This review describes the presence and distribution of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in seawater, shellfish and other marine animals, as well as clinical samples from SA. It appears that infections of *V. parahaemolyticus* have been more strongly related to seafood ingestion and have been more frequently reported on the Pacific coast. Conversely, *V. vulnificus* is more frequently acquired by water contact with open wounds and its presence has been more heavily reported along the Atlantic coast.

The impacts of ENSO have been observed as an increase of *V. parahaemolyticus* outbreaks on the Pacific coast of SA. Although, more studies are required to confirm the importance of environmental factors that are affecting the presence, concentrations and virulence of the bacteria in these areas of the continent.

V. vulnificus human cases have been restricted mostly to the southeastern and southern areas of the Atlantic coast of SA, with the only exception being the report of three gastroenteritis cases in Peru and two cases in Ecuador. Uruguay had the highest number of cases in SA, but the number of cases in all of South America is low compared with the numbers of reported infections in the USA, where, according to CDC (Ratner 1987), there are approximately 96 *V. vulnificus* cases reported annually.

Peru, Ecuador and Uruguay are the only countries where human cases from both *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* were recorded. Even considering possible underreporting from other areas, and the concomitant presence of environmental strains of both bacteria along the Atlantic and Caribbean coasts, the distribution of pathogenic strains

should be further studied. More research is necessary in order to determine if there are environmental or genetic factors that explain the distribution of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* pathogenic strains. It is evident that the continent experiences environmental conditions that are permissive for both *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*. In the face of climate change, a formal monitoring program should be instituted to quantify *Vibrio* sp., and to develop models that permit predictions of environmental conditions that are favorable for the pathogenic forms of these bacteria. This monitoring would also serve to gather sufficient information to determine the impact of ENSO and other global climate phenomena on the abundance of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. Eventually, this would allow for the establishment of control plans to minimize new cases and reduce the impact of outbreaks, especially for *V. parahaemolyticus* in the Pacific coast during years when ENSO is forecasted to be stronger than normal such as in the spring of 2016.

The use of faster, more accurate, and virulence specific detection approaches, such as PCR confirmation, should be considered to detect the presence of pathogenic *Vibrio* strains in environmental and seafood samples for protection of public health.

In summary, the published reports and the environmental characteristics from South America cannot be disregarded, there is a demonstrated risk of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* infection from the water and seafood. Although the total numbers of cases are very low, the morbidity, mortality, and close association of these cases with seafood production and water warrant an improved monitoring and surveillance framework for all countries in South America for *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, in order to predict protect public health and prevent outbreaks. This study highlights the need for more research and a formal monitoring program of *vibrios* in South America, both in environmental and clinical samples, particularly in the countries with the worst sets of cases as Uruguay for *V. vulnificus*, and Chile for *V. parahaemolyticus*. A continent wide culture based monitoring program, with collection of salinity and temperature information would be a start, and then for the mentioned countries with the most cases, a pathogenic strain tracking system could be implemented initially in a basic way (conventional PCR). So, in order to maintain the economic, cultural, and societal roles of aquaculture, public health and food safety should be closely monitored and controlled.

Acknowledgements

This study was carried out with financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC)/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aliaga, R., Miranda, J. and Zevallos, J., 2010. Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Rev Med Hered*, 21(3), pp.139–145.
- Altekruse, S. et al., 2000. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. *Epidemiol Infect*, 124, pp.489–495.
- Ansaruzzaman, M. et al., 2005. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *J Clin Epidemiol*, 43(6), pp.1–5. Available at: <http://jcm.asm.org/content/43/6/2559.full.pdf+html>.
- Aranda, C.P. et al., 2015. Distribution and growth of *Vibrio parahaemolyticus* in southern Chilean clams (*Venus antiqua*) and blue mussels (*Mytilus chilensi*). *Foodborne Pathog Dis*, 12(1), pp.1–7.
- Araujo, M.R.E. et al., 2007. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and literature review. *Braz J Infec Dis*, 11(2), pp.302–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625784>.
- Archer, R.M. and Moretto, E., 1994. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) from a natural coastal bed in the municipality of Palhoça, Santa Catarina, Brazil. *Cad Saude Publica*, 10(3), pp.379–386.
- Arias, C.R. et al., 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western

Mediterranean coast. *J Appl Microbiol*, 86(1), pp.125–134.

Baker-Austin, C. et al., 2012. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Clim Change*, 3(1), pp.73–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nclimate1628>.

Barros, L.M. de O. et al., 2003. Víbrios sacarose negativos isolados de ostras *Crassostrea rhizophorae* comercializadas em barracas de praia da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. *Bol Tec Cient Cepnor*, 7(1), pp.9–16.

Bhuiyan, N. a. et al., 2002. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *J Clin Microbiol*, 40(1), pp.284–286.

Blackwell, K.D. and Oliver, J.D., 2008. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina Estuaries. *J Microbiol*, 46(2), pp.146–153. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-007-0216-2>.

Bocanegra, F.A., Mercado, P.E. and Saldaña, W.H., 1981. *Vibrio parahaemolyticus*: presencia en ambientes marinos y mixohalinos de la provincia de Trujillo, Peru. *Rev Latinoam Microbiol*, 23, pp.135–140.

Brack, J.C. et al., 2004. Infecção cutânea por *Vibrio vulnificus*. *Bol Soc Bras Dermatol*, abr/mai/ju(6). Available at: www.dermato.med.br/ufrrj2004/Infec%20cut%20nea.pdf.

Brasil. ANVISA, 2001. *Resolução - RDC Nº 12, de 2 de Janeiro de 2001*.

Brasil, 2014. *Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos - VE - DTA*, Available at: http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf.

Broberg, C.A., Calder, T.J. and Orth, K., 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect*, 13(12-13), pp.992–1001.

Carrerou-Perreng, L.A., 2001. Infecção grave por *Vibrio vulnificus* (primer caso publicado en Uruguay). *Cir Urug*, 71(3/4), pp.116–118.

Casellas, J.M., Caría, M.A. and Gergghi, M.E., 1977. Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de cholgas y mejillones en Argentina.

Rev Asoc Arg Microbiol, 9(2), pp.41–53.

CDC, 2013a. *FoodNet 2013 Annual Report*, Atlanta: CDC. Available at: <http://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2013.html>.

CDC, 2013b. Trends in foodborne illness in the United States, 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/trends-in-foodborne-illness.html>.

Chao, G. et al., 2011. Origin of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic clone. *Int J Food Microbiol*, 145(2-3), pp.459–463. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.022>.

Chen, J., 2004. *Pesquisa de Vibrio parahaemolyticus em atum (Thunnus spp) comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP*. São Paulo: Dissert. Univ Sao Paulo.

Chicheff, O.C. et al., 2001. *Vibrio vulnificus*: un veraneante letal en las aguas oceánicas de Uruguay. Comunicación del primer caso nacional. *Pac Crit*, 14(3), pp.168–174.

Chile. MINSAL, 1996. *Reglamento Sanitario de los Alimentos - Decreto 977/1996*, Available at: http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO_977_96 actualizado a Enero 2015(1).pdf.

Chile, 2014. *Brotos de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) Chile , semana epidemiológica (SE) 1 a 52 año 2013*, Available at: http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/ETA_2013.pdf.

Chile, 2015. *Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) - parcial 2015*, Available at: http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/Informe_Entericas_SE072015.pdf#page=4.

Chowdhury, N.R. et al., 2000. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg infect dis*, 6(6), pp.631–636. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2640929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Colwell, R.R. (2005). *A global and historical perspective of the genus Vibrio*. In: *The Biology of Vibrios*. Edited by Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J. p3-11. Washington: ASM press.

Córdova, J.L. et al., 2002. Characterization by PCR of *Vibrio*

parahaemolyticus isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biol Res*, 35(3-4), pp.433–440.

Costa, R.A., 2006. *Pesquisa de Vibrio no cultivo de camarão marinho Litopenaeus vannamei no Estado do Ceará*. Fortaleza: Thesis. Univ Fed do Ceará.

Costa, R.A., Araújo, R.L. and Vieira, R.H.F., 2013. Hemolytic and urease activities in vibrios isolated from fresh and frozen oysters. *Rev Soc Bras Med Trop*, 46(1), pp.103–105.

Costa Sobrinho, P. de S. et al., 2010. Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of Sao Paulo state, Brazil. *Appl Environ Microbiol*, 76(4), pp.1290–1293.

Costa Sobrinho, P.D.S. et al., 2014. A quantitative risk assessment model for *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters in Sao Paulo State, Brazil. *Int J Food Microbiol*, 180, pp.69–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.008>.

Costa Sobrinho, P.D.S. et al., 2011. Occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters in Sao Paulo State, Brazil. *Food Microbiol*, 28(1), pp.137–140.

CPTEC/INPE, 2015. *El Niño e La niña*. INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais / CPTEC - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos. Available at: <http://enos.cptec.inpe.br>. Access Nov 11, 2015.

Dabanch P., J. et al., 2009. Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: reporte de caso y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect*, 26(4), pp.360–362.

Daniels, N. and MacKinnon, L., 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *J Infect Dis*, 181(5), pp.1661–1666.

De Schryver, P.; Defoirdt, T.; Sorgeloos, P., 2014. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLoS Pathog* 10(4): e1003919. doi:10.1371/journal.ppat.1003919

DePaola, A. et al., 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol*, 69(3), pp.1521–6. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Dias, J.M.A., 2007. Glossário das Zonas Costeiras. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 2007. Available at: <http://www.aprh.pt/rgci/glossario/praias.html>.

FAO, 2013. Fish Trade and Production Motion Chart. *Globefish - Fish trade and production motion chart*. Available at: <http://www.globefish.org/motion-chart.html>.

FDA, 2011. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance* Fourth edi., Gainesville: FDA.

França, J.C.B. et al., 2013. *Vibrio vulnificus* infection in Southern Brazil - case report. *An Bras Dermatol*, 88(3), pp.424–426.

Franca, S.M. et al., 1980. *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. *JAMA*, 244(6), pp.587–588.

Froelich, B.A. et al., 2012. Apparent loss of *Vibrio vulnificus* from North Carolina oysters coincides with a drought-induced increase in salinity. *Appl Environ Microbiol*, 78(11), pp.3885–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2014].

Froelich, B.A. et al., 2015. Development of a matrix tool for the prediction of *Vibrio* species in oysters harvested from North Carolina. *Appl Environ Microbiol*, 81(3), pp.1111–1119. Available at: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03206-14>.

Froelich, B.A., Ayrapetyan, M. and Oliver, J.D., 2013. Integration of *Vibrio vulnificus* into marine aggregates and its subsequent uptake by *Crassostrea virginica* oysters. *Appl Environ Microbiol*, 79(5), pp.1454–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3591956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 8, 2014].

Froelich, B.A. and Noble, R.T., 2014. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Appl Environ Microbiol*, 80(80), pp.7454–7459.

Froelich, B.A. and Noble, R.T., 2015. *Vibrio* bacteria in raw oysters: managing risks to human health. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci*, **371**, 1689.

FUNASA, 2002. Investigação de surto de gastroenterite por *Vibrio parahaemolyticus* em Fortaleza/Ceará, Setembro, 2002. *Bol Elet Epidemiol*, pp.5–7.

García, K. et al., 2009. Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), pp.7482–7487.

Garcia-Moreno, M.L. and Landgraf, M., 1997. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha. *Cienc Tecnol Aliment*, 17(2), pp.177–180.

Gelli, D.S., Tachibana, T. and Sakuma, H., 1979. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em ostras. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 39(1), pp.61–66.

Gil, A.I. et al., 2007. O3:K6 Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. *Int J Infect Dis*, 11(4), pp.324–328.

González-Escalona, N. et al., 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis*, 11(1), pp.2004–2006.

Grau, C. et al., 2004. Isolation of *Vibrio* spp. and evaluation of the sanitary condition of bivalve mollusks *Arca zebra* and *Perna perna* collected on the northeastern coast of Sucre state, Venezuela. *Rev Cient Fac Cienc Vet*, 14(6), pp.513–521.

Guevara-Duncan, J.M., Roel-Pineda, S. and Del Carpio-Gomez, E., 1989. *Vibrio parahaemolyticus* en cebiches vendidos por ambulantes de Lima-Peru. *Diagn*, 24(1/2), pp.23–26.

Haendiges, J. et al., 2015. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* clinical strains from Maryland (2012–2013) and comparisons to a locally and globally diverse *V. parahaemolyticus* strains by whole-genome sequence analysis. *Front Microbiol*, 6, pp.1–11. Available at: http://www.frontiersin.org/Food_Microbiology/10.3389/fmicb.2015.00125/abstract.

Hofer, E., 1983. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. *Rev Microbiol*, 14(3), pp.174–175.

Hofer, E. and Silva, C.H., 1986. Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de peixes capturados no litoral

brasileiro. *Rev Microbiol*, 17(4), pp.327–331.

Hofer, E. and Silva, C.H.D., 1974. Isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* de material de peixes de origem marinha. In *Congres Bras Microbiol*. Rio de Janeiro: UGF, p. 193.

Høi, L., Dalsgaard, I. and Dalsgaard, A., 1998. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. *Appl Environ Microbiol*, 64(5), pp.1721–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=106221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Honda, T. et al., 1980. Immunological methods for detection of Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Microbiol*, 11(6), pp.600–603.

Horseman, M. A. and Surani, S., 2011. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *Int J Infect Dis*, 15(3), pp.e157–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177133> [Accessed May 26, 2014].

Ibarra, J., Delgado, A. and Alvarado, D., 1999. Vibrios no epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 asociados a enfermedad diarreica aguda. Evento climatológico. “El Niño”- 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo. *Ann Fac Med. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 60(4).

Igbinosa, E.O., Obi, C.L. and Okoh, A.I., 2011. Seasonal abundance and distribution of *Vibrio* species in the treated effluent of wastewater treatment facilities in suburban and urban communities of Eastern Cape Province, South Africa. *J Microbiol (Seoul, Korea)*, 49(2), pp.224–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538242>.

Iwamoto, M. et al., 2010. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *Clin Microbiol Rev*, 23(2), pp.399–411.

Johnson, C.N. et al., 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(20), pp.7249–7257.

Johnson, C.N. et al., 2010. Relationships between environmental factors and pathogenic vibrios in the Northern Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 76(21), pp.7076–7084. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00697-10>.

Jones, M.K. and Oliver, J.D., 2009. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infect Immun*, 77(5), pp.1723–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2681776&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2014].

Kaspar, C.W. and Tamplin, M.L., 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 59(8), pp.2425–2429.

Klontz, K.C. et al., 1988. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. *Ann Intern Med*, 109, pp.318–323.

Lafisca, A. et al., 2008. Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50(4), pp.199–202.

Latif, M. and Grotzner, A., 2000. The equatorial Atlantic oscillation and its response to ENSO. *Clim Dynam*, 16(2-3), pp.213–218.

Leal, D.A.G. and Franco, R.M.B., 2008. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. *Rev Panam Infectol*, 10(4), pp.48–57. Available at: [http://revista-api.com/4 edicao 2008/pdf/mat 08.pdf](http://revista-api.com/4%20edicao%202008/pdf/mat%2008.pdf).

Leal, N.C. et al., 2008. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. *J Appl Microbiol*, 105(3), pp.691–697.

Leitão, M.F. de F., Arima, H.K. and Kai, M., 1976. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado Sao Paulo. *Colet Inst Tecnol Alim*, 7, pp.181–190.

Levy, S., 2015. Warming trend: how climate shapes *Vibrio* ecology. *Environ Health Perspect*, 123(4), p.A 82– A 89.

Lhafi, S.K. and Kühne, M., 2007. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *Int J Food Microbiol*, 116(2), pp.297–300. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507000827>.

Lima, F.C. De, Oliveira, L.A.T. de and Mano, S.B., 1994. Enumeração e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* em lulas frescas comercializadas no município de Niterói-RJ, Brasil. *Rev Bras Cienc Vet*, 1(1), pp.7–11.

- Lira, A. de A., Barros, G.C. de and Mota, R.A., 2001. *Vibrio parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife, PE. *Hig Aliment*, 15(90/91), pp.50–59.
- López, L. et al., 2010. Estudio piloto para el aislamiento de *Vibrio* spp en ostras (*Crassostrea rhizophorare*) capturadas en la Ciénaga de la Virgen, Cartagena, Colombia. *Rev Salud Publica Nutric*, 11(1).
- Macián, M.C. et al., 2000. Identification of *Vibrio* spp. (other than *V. vulnificus*) recovered on CPC agar from marine natural samples. *Int Microbiol*, 3(1), pp.51–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963334>.
- Magalhães, V. et al., 1991. Gastroenteritis humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 33(1), pp.64–68.
- Markman, C.V., 2008. *Caracterização de Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus e V. vulnificus em amostras da região costeira do Estado Sao Paulo, de regiões portuárias brasileiras e de tanques de lastro de navios*. São Paulo: Thesis. Univer Sao Paulo.
- Martinez-Urtaza, J. et al., 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J Clin Microbiol*, 42(10), pp.4672–4678.
- Martinez-Urtaza, J. et al., 2010. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Res Int*, 43, pp.1780–1790.
- Martinez-Urtaza, J. et al., 2008. Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with *El Niño*. *Epidemiology*, 19(6), pp.829–837.
- Martinez-Urtaza, J. et al., 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg Infect Dis*, 11(8), pp.4–5.
- Martinez-Urtaza, J. et al., 2013. Spread of Pacific Northwest *Vibrio parahaemolyticus* strain. *N Engl J Med*, 369(16), pp.1573–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131194>.
- Martinez-Urtaza, J. et al., 2016. Is El Niño a long-distance corridor for waterborne disease? *Nat Microbiol*, 1(3):16018.
- Martínez-Urtaza, J., 2011. Cambio climatico y patógenos en el agua: el

fenómeno El Niño y su impacto en la salud. *Rev Salud Ambient*, 11(1-2), pp.46–51.

Matsumoto, C. et al., 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J Clin Microbiol*, 38(2), pp.578–85. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Matté, G.R. et al., 1994. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. *J Appl Bacteriol*, 77(3), pp.281–287.

Matté, M.H. et al., 2007. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. *Food Control*, 18, pp.747–751.

Melo, L.M.R. de et al., 2011. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. *Braz J Microbiol*, 42, pp.1463–1469.

Mendes, E.S. et al., 2009. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. *Cien Anim Bras*, 10(4), pp.1191–1199.

Motes, M.L. and DePaola, A. (1996) Offshore suspension relaying to reduce levels of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* **62**, 3875-3877.

Motes, M.L. et al., 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol*, 64(4), pp.1459–1465.

Muñoz, D. et al., 2008. Prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. y enterobacterias en carne de pepitona, *Arca zebra*, comercializada en Cumaná, Venezuela. *Zootec Trop*, 26(4), pp.505–513.

Muratori, M.C.S. et al., 2014. *Vibrio parahaemolyticus* em carcinicultura marinha. *Rev Bras Saude Prod Anim*, 15(2), pp.289–296.

Nascimento, S.M. et al., 2001. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 43(5), pp.263–266. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696848>.

Newton, A.E. et al., 2014. Notes from the Field: Increase in *Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Atlantic

Coast Shellfish. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 63(15), pp.335-336.

Available at:

<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6315a6.htm>.

Nigro, O.D. et al., 2011. Temporal and spatial variability in culturable pathogenic *Vibrio* spp. in Lake Pontchartrain, Louisiana, following hurricanes Katrina and Rita. *Appl Environ Microbiol*, 77(15), pp.5384–93. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147459&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Nishibuchi, M. and Kaper, J.B., 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun*, 63(6), pp.2093–2099.

Normanno, G. et al., 2006. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *Int J Food Microbiol*, 106(2), pp.219–22. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226820> [Accessed May 26, 2014].

Okuda, J. et al., 1997. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol*, 35(8), pp.1965–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=229885&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Oliva, M.S. de, 2012. *Utilização de marcadores fenogenotípicos de virulência na caracterização de Vibrio spp. isolados a partir de mexilhões (Perna perna) em diferentes pontos do litoral do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: Thesis, Univ Fed Rural do Rio de Janeiro.

Oliver, J.D., 2006. *Vibrio vulnificus*. In F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings, eds. *The Biology of Vibrios*. Washington, DC: American Society of Microbiology, pp. 349–366.

Oliver, J.D., Warner, R. a. and Cleland, D.R., 1983. Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Appl Environ Microbiol*, 45(6), pp.985–998.

Ottaviani, D. et al., 2013. A severe case of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* travellers' diarrhoea characterized by *Vibrio parahaemolyticus* co-isolation. *J Med Microbiol*, 62, pp.161–164.

- Parveen, S. et al., 2008. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int J Food Microbiol*, 128(2), pp.354–361. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.019>.
- Parveen, S. and Tamplin, M.L., 2013. *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. In R. G. Labbé and S. García, eds. *Guide to Foodborne Pathogens*. Wiley and Sons, pp. 148–176.
- Pereira, C.S. et al., 2007a. *Vibrio* spp. isolados de mamíferos marinhos capturados na região litorânea do sudeste ao sul do Brasil. *Pesq Vet Bras*, 27(2), pp.81–83.
- Pereira, C.S. et al., 2007b. *Vibrio* spp. isolados de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Cienc Tecnol Aliment*, 27(2), pp.387–390.
- Pereira, C.S., Viana, C.M. and Rodrigues, D.D.P., 2004. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas in natura em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. *Cienc Tecnol Aliment*, 24(4), pp.591–595.
- Peru. MINSA (2008). Resolución Ministerial No 59, de 27 de agosto del 2008.
- Piola, A.R., Guerrero, R. a and Osiroff, A.P., 2003. Climatología de frentes y estratificación del Río de la Plata. In *V Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar*. Mar del Plata, Argentina. Available at: https://www.researchgate.net/profile/Raul_Guerrero2/publication/242565820_Climatologa_de_frentes_y_estratificacin_del_Ro_de_la_Plata/links/0deec53ad96a3bfe40000000.pdf.
- Poblete, R. et al., 2002. *Vibrio vulnificus*: una causa infrecuente de shock séptico. *Rev Med Chile*, 130, pp.787–791.
- Powell, A. et al., 2013. Isolation of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* from UK water and shellfish produce. *Microb Ecol*, 65(4), pp.924–927.
- Ramos, R.J., 2007. *Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (Crassostrea gigas) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina*. Florianópolis: Dissert. Univ Fed Santa Catarina.
- Ramos, R.J. 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(May-Jun), pp.327–333.

Ramos, R.J. et al., 2012. Occurrence of *Vibrio* spp., positive coagulase staphylococci and enteric bacteria in oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in the south bay of Santa Catarina island, Brazil. *Cienc Tecnol Aliment*, 32(3), pp.478–484.

Ramos, R.J., 2012. *Vibrio* sp. em ostras e águas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina: ocorrência, caracterização fenotípica e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração. Florianópolis: Thesis. Univ Fed Santa Catarina.

Raszl, S.M.; 2016. The first report of a potentially pathogenic strain of *Vibrio vulnificus* in oysters from Brazil. (submitted).

Ratner, H., 1987. *Vibrio vulnificus*. *Infect Control*, 8(10), pp.430–433.

Reyes-Velázquez, C. et al., 2010. Pathogenic vibrios in the oyster *Crassostrea virginica* in the lagoon system of Mandinga, Veracruz, Mexico. *Hidrobiol*, 20(3), pp.238–245.

Ristori, C.A. et al., 2007. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliensis*) and estuarine water along the south coast of Brazil. *Int J Environ Health Res*, 17(4), pp.259–269.

Rodgers, C. et al., 2014. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* in blue crabs (*Callinectes sapidus*), seawater and sediments of the Maryland Coastal Bays. *J Appl Microbiol*, 117(4), pp.1198–209. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066367> [Accessed January 7, 2015].

Rodrigues, D. P. and Hofer, E., 1986. *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem bay in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Microbiol*, 17(4), pp.332–338.

Rodrigues, L.A.P. and Carvalho-Filho, C.D., 2011. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* nas etapas de beneficiamento de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), cultivadas na Baía de todos os Santos - BA, e determinação dos pontos críticos de controle. *Cient Cienc Biol Saude*, 13(2), pp.77–84. Available at: http://www.sumarios.org/sites/default/files/pdfs/66014_7481.PDF.

Rodrigues, S.M. de A. et al., 2001. Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA. *Rev Soc Bras Medic Trop*, 34(5), pp.407–411.

- Rodríguez-Camacho, J.C. et al., 2014. Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Rev Bio Ciencias*, 2(203), pp.282–292.
- Rojas, M.V.R. et al., 2011. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Medic Trop Sao Paulo*, 53(4), pp.201–205.
- Santos, C.A.L. dos and Vieira, R.H.S.F., 2013. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 55(4), pp.1–10.
- Schaeffer, J. et al., 2013. Norovirus contamination on French marketed oysters. *Int J Food Microbiol*, 166(2), pp.244–8. Available at: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00152/26367/>.
- Serra, C.L.M. et al., 2001. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em sarnambi (*Anomalocardia brasiliense*) e sururu (*Mytella falcata*) capturados no estuário de Rio Anil, São Luís, MA. *Hig Aliment*, 18(116/117), pp.73–78.
- Silva, M.A.C. da, 2003. *Ocorrência e caracterização de Vibrio vulnificus isolados de amostras de moluscos e água de áreas de cultivo de Santa Catarina*. Itajai: Dissert. UNIVALI.
- Singleton, F.L. et al., 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl Environ Microbiol*, 44(5), pp.1047–1058.
- Sousa, O. V. et al., 2004. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in oyster, *Crassostrea rhizophorae*, collected from a natural nursery in the Cocó River estuary, Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46(2), pp.59–62.
- Staley, C., Chase, E. and Harwood, V.J., 2013. Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* and *V. sinaloensis* in water and oysters of a Gulf of Mexico estuary. *Environ Microbiol*, 15(2), pp.623–633. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12045>.
- Strom, M.S. and Paranjpye, R.N., 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microb infection*, 2, pp.177–188. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742690>.
- Urakawa, H. and Rivera, I.N.G., 2006. Aquatic Environment. In F L Thompson, B Austin, and J Swings, eds. *The biology of vibrios*. Washington, DC: ASM Press, pp. 175–189.

Uruguay, 2015. Bacteria *Vibrio vulnificus*: MSP recomienda no ingresar al agua marina a personas con lesiones en la piel, fundamentalmente si son adultas mayores y con patologías preexistentes. *Ministerio de Salud Publica de Uruguay*. Available at:

<http://www.msp.gub.uy/comunicado/comunicado-la-poblaci?n-bacteria-vibrio-vulnificus-msp-recomienda-no-ingresar-al-agua> [Accessed June 15, 2015].

Velazquez-Roman, J. et al., 2013. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent. *Front Cell Infec Microbiol*, 3(January), p.110. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3878053&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Vieira, R.H.S.D.F. et al., 2010. Raw oysters can be a risk for infections. *Braz J Infec Dis*, 14(1), pp.66–70. Available at:

[http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670\(10\)70013-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670(10)70013-1).

Vieira, R.H.S.F. et al., 2011. Kanagawa-negative, *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. *Curr Microbiol*, 63(2), pp.126–130.

Vieira, R.H.S.F. et al., 2004. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46(4), pp.179–182.

Vieira, R.H.S.F. and Iaria, S.T., 1993. *Vibrio parahaemolyticus* in lobster *Panulirus laeviscauda* (Latreille). *Rev. Microbiol*, 24(1), pp.16–21.

Villacrés, D. et al., 2013. Sepsis por *Vibrio vulnificus*: reporte de dos casos en ciudades de altura en el Ecuador. *Rev Med Vozandes*, 24(1-2), pp.53–58.

Ward, J.E. and Shumway, S.E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J Exp Marine Biol Ecol*, 300, pp.83–130.

Warner, E.B. and Oliver, J.D., 2008. Multiplex PCR assay for detection and simultaneous differentiation of genotypes of *Vibrio vulnificus* biotype 1. *Foodborne Pathog Dis*, 5(5), pp.691–693.

Westrell, T. et al., 2010. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveill*, 15(12), pp.7–10.

Wetz, J. et al., 2008. Trends in total *Vibrio* spp. and *Vibrio vulnificus* concentrations in the eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, during storm events. *Aquat Microb Ecol*, 53(September), pp.141–149. Available at: <http://www.int-res.com/abstracts/ame/v53/n1/p141-149/>.

WHO and FAO. (2005) Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. Interpretative summary and technical report.

WHO and FAO, 2011. *Risk assessment of Vibrio parahaemolyticus in seafood. Interpretative Summary and Technical Report.*

Wong, H.C. et al., 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol*, 66(9), pp.3981–6. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=92248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Yamamoto, A. et al., 2008. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand. *Int J Food Microbiol*, 124(1), pp.70–78.

Yeung, P.S.M. and Boor, K.J., 2004. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathog Dis*, 1(2), pp.74–88.

Zhu, J. et al., 2014. Salinity anomaly as a trigger for ENSO events. *Sci Rep*, 4, p.6821. Available at:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/srep06821>.

CAPÍTULO 3: COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE MEIOS DE CULTIVO PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *V. VULNIFICUS*

3.1. INTRODUÇÃO

Vibrio vulnificus é um bacilo halofílico, móvel, Gram-negativo, não formador de esporos e capaz de ocasionar uma infecção grave em indivíduos suscetíveis. Os sintomas da doença podem variar desde uma gastroenterite até uma septicemia primária e fasciíte necrosante, com uma taxa de mortalidade superior a 50% nos casos de septicemia (JONES; OLIVER, 2009; OLIVER, 2013; WARNER; OLIVER, 2008a).

O contágio pode ocorrer pelo contato de lesões de pele com água do mar onde a bactéria esteja presente, ou pelo consumo de alimentos de origem marinha, especialmente ostras cruas ou mal cozidas (BIER et al., 2013; OLIVER, 2005). Assim como as demais espécies de moluscos bivalves, as ostras são organismos filtradores e alimentam-se de partículas em suspensão na coluna de água, que tanto podem ser orgânicas como inorgânicas (DUPUY et al., 2000; FROELICH; OLIVER, 2013; MIZUTA, 2010). Esta forma de alimentação por filtração faz com que a ostra retenha e acumule partículas de contaminantes e bactérias presentes na água.

É importante destacar que pessoas com distúrbios adjacentes como doença hepática crônica, diabetes, hemocromatose, AIDS, imunocomprometidas, possuem maior suscetibilidade à infecção, podendo aumentar em até 80 vezes a chance de desenvolverem a septicemia primária (JONES; OLIVER, 2009; ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005) causada pela ingestão de alimentos de origem marinha crus ou mal cozidos. Assim, é fundamental o monitoramento destes alimentos e da água do mar para a detecção da bactéria e adoção de medidas de controle.

Para fazer o monitoramento, existem diversos meios de cultivo para o isolamento e enumeração de *V. vulnificus*, mas um fator limitante deve-se à capacidade desta bactéria, em condições desfavoráveis, assumir um estado de dormência, que permite que sobreviva enquanto persistirem as adversidades. Este estado é conhecido como *células viáveis mas não cultiváveis*, cuja sigla em inglês é VBNC – *Viable But Non Cultivable* (OLIVER, 1995). Neste estado, as células estão vivas, mas não crescem nos meios de cultivo normais sem um prévio enriquecimento ou reativação. São menores em tamanho e possuem uma

composição de proteínas diferente das células normais (OLIVER, 1995), mantendo entretanto, a capacidade infectante.

Considerando seu curto período de incubação e a diversidade de fatores de virulência, é de fundamental importância, tanto em casos de infecção humana como nos alimentos, o desenvolvimento de métodos rápidos e globalmente aplicáveis para a detecção de *V. vulnificus*.

O diagnóstico e quantificação de cepas totais e potencialmente patogênicas de *V. vulnificus* de forma precisa e rápida é fundamental, mesmo quando em baixas concentrações, tanto no que se refere a ações de gestão e comunicação de risco, como para facilitar o diagnóstico de casos clínicos suspeitos, permitindo uma intervenção rápida e precisa. Além disso, um método de diagnóstico deve ser aplicável em diferentes regiões geográficas, independente de fatores ambientais e sem a necessidade de instalações e equipamentos altamente especializados para sua realização.

O objetivo deste estudo foi analisar a performance de meios de cultivo seletivos para *V. vulnificus* mais comumente usados e os recomendados pelos métodos oficiais dos EUA (KAYSNER; DEPAOLA, 2004) e pelo norma internacional publicada pela *International Organization for Standardization (ISO)*, a ISO/TS 21872-2:2007(E): *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. — Part 2: Detection of species other than Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae* (ISO, 2007).

3.2. METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE *V. VULNIFICUS*

3.2.1 Metodologias oficiais

Este item apresenta uma revisão das principais metodologias de detecção de *V. vulnificus*, incluindo os métodos microbiológicos, bioquímicos e moleculares. Existem duas metodologias mais comumente usadas para detecção de *V. vulnificus*, o método proposto pelo *Food and Drug Administration (FDA)* dos EUA (KAYSNER; DEPAOLA, 2004) e o método internacional proposto na norma ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007).

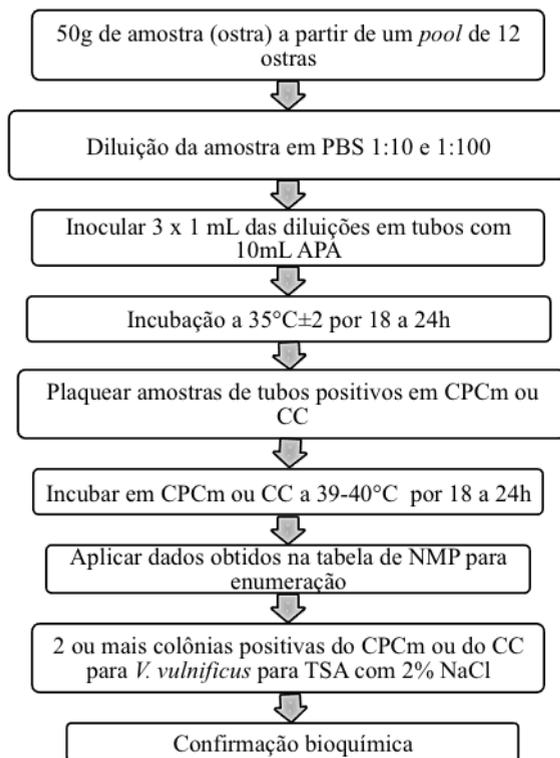
Para o isolamento de *V. vulnificus* é comum um enriquecimento da amostra antes do plaqueamento, entretanto nem todos os métodos incluem esta etapa. O enriquecimento geralmente é feito com água alcalina peptonada (APA) (1% triptona peptona, 1% NaCl e pH 8,6) (OLIVER, 2003) e o resultado é um aumento na sensibilidade dos

métodos uma vez que promove a recuperação de células VBNC diminuindo a possibilidade de resultados falso negativos (PANICKER; MYERS; BEJ, 2004). Entretanto, esta etapa aumenta o tempo para obtenção do diagnóstico.

3.2.2 Metodologia do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM/FDA) (KAYSNER; DEPAOLA, 2004)

Um dos métodos usados para a detecção e enumeração de *V. vulnificus* em amostras de alimentos de origem marinha e em água do mar é o método do número mais provável (NMP) conforme descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) do FDA dos EUA (KAYSNER; DEPAOLA, 2004). Este método permite algumas alternativas de meios de cultivo para identificação de *V. vulnificus* e recomenda uma fase de enriquecimento em tampão fosfato salino (PBS) para recuperar células VBNC. Entre os meios de cultivo recomendados na metodologia BAM estão os meios agar Colistina Polimixina β -Celobiose modificado (CPCm) e o agar Colistina Celobiose (CC). A Figura 3.1 apresenta o fluxograma com as etapas do método proposto pelo BAM.

Figura 3.1 Fluxograma da metodologia de isolamento de *V. vulnificus* de acordo com o FDA/EUA.



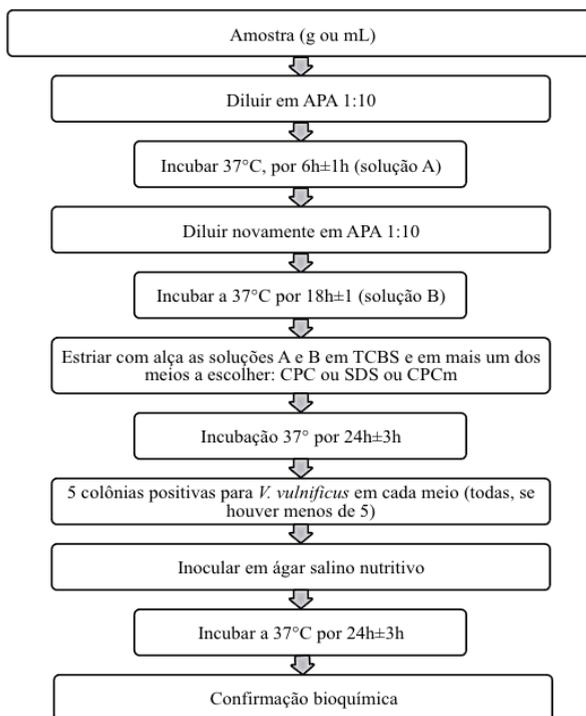
Adaptado de Kaysner e DePaola, 2004.

A confirmação deve ser feita por métodos bioquímicos tradicionais ou pelo API 20-E, e o FDA também sugere o uso de técnicas genéticas mais rápidas e precisas para confirmação de espécies. Os testes bioquímicos sugeridos pela metodologia do BAM são inoculação em ágar arginina glicose inclinado (AGS), reação de oxidase, motilidade e tolerância ao sal. O FDA recomenda, ainda, a confirmação de *V. vulnificus* pelo gene espécie específico citolisina, *vhA*. (KAYSNER; DEPAOLA, 2004)

3.2.3 Metodologia ISO/TS 21872-2: 2007(E) (ISO, 2007)

Outra metodologia disponível para isolamento e identificação de *V. vulnificus* é a descrita na norma ISO/TS 21872-2: 2007(E), Parte 2 (ISO, 2007). A metodologia possui duas fases de enriquecimento em solução salina alcalina peptonada (APA), uma fase de isolamento e identificação em meios de cultura que incluem o ágar Tiosulfato, Citrato, BÍlis e Sacarose (TCBS) e um outro meio seletivo, que pode ser escolhido entre ágar Colistina Polimixina β -Celobiose (CPC), ou ágar Sódio Dodecil Sulfato Polimixina B Sucrose (SDS) ou ainda o ágar CPC modificado (CPCm), seguido de confirmação bioquímica. A norma sugere ainda a coloração Gram e o teste de motilidade em solução salina. A Figura 3.2 apresenta o fluxograma proposto pela norma.

Figura 3.2 Fluxograma da metodologia de isolamento de *V. vulnificus* de acordo com ISO/TS 21872-2.



Adaptado de ISO, 2007.

As colônias puras obtidas passam pela confirmação bioquímica após serem testadas para oxidase, Gram e motilidade. Estas amostras positivas passam por confirmação bioquímica através de teste com ágar salino triplo açúcar e ferro (TSI), detecção de ornitina descarboxilase, L-lisina descarboxilase, arginina di-hidroxilase, β -galactosidase, indol e teste de tolerância salina.

3.2.4 Meios de cultivo para isolamento e enumeração de *V. vulnificus*

Neste item são apresentados os principais meios de cultivo usados no isolamento e identificação de *V. vulnificus*, especialmente os meios recomendados pelas metodologias BAM (KAYSNER; DEPAOLA, 2004) e ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007), além de outros meios existentes.

a) Ágar tiosulfato, citrato, biliar e sacarose (TCBS)

O meio TCBS tem pH alcalino (8,6), sais biliares e NaCl (1%) para inibir o crescimento de outras bactérias, como membros da família Enterobacteriaceae, o gênero *Pseudomonas* e bactérias Gram-positivas. É bastante usado no isolamento de *Vibrio* spp. de amostras ambientais e também para diferenciar *V. cholerae* de *V. parahaemolyticus* e de *V. vulnificus* com base na fermentação de sacarose pelo *V. cholerae* (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004). Este meio é um dos recomendados na metodologia ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007).

Entretanto o TCBS não diferencia *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. mimicus*. As colônias destes três gêneros, que não fermentam sacarose, aparecem redondas, verdes e com 2 a 3 mm de diâmetro no ágar TCBS, sendo necessários outros métodos para confirmação da espécie, como o uso de testes bioquímicos ou moleculares. O meio TCBS não deve ser normalmente usado como método principal ou único para identificação de *V. vulnificus* (WILLIAMS; FROELICH; OLIVER, 2013).

Segundo Oliver (2003), a grande vantagem do meio TCBS é sua pouca seletividade entre as espécies de *Vibrio* e o fato de que vários micro-organismos não *Vibrio* também podem crescer neste meio. Justifica-se o uso de TCBS quando estão sendo pesquisados *Vibrio* spp., mas o que se observa quando o objetivo é estudar apenas a presença de *V. vulnificus*, é que há outros meios mais eficientes e mais seletivos para serem usados em substituição ao TCBS (ARIAS et al., 1998;

HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004; JONES et al., 2013; OLIVER, 2003; WILLIAMS; FROELICH; OLIVER, 2013).

b) Ágar colistina polimixina β -celobiose (CPC)

Este meio é um dos recomendados pela metodologia ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007). Os agentes seletivos deste meio são a colistina e a polimixina, que são peptídeos antibióticos que se diferenciam por apenas um aminoácido. A diferenciação de *V. vulnificus* de outros *Vibrio* spp. se dá pela fermentação da celobiose que resulta em colônias amarelas rodeadas por um halo amarelo. A seletividade do meio também se dá na incubação a 40°C, que inibe outras bactérias marinhas e permite o crescimento de *V. vulnificus* (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004; HØI; DALSGAARD; DALSGAARD, 1998).

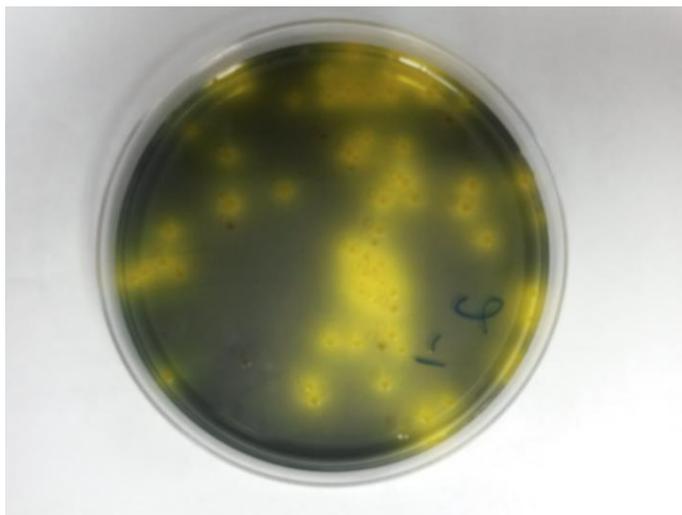
Jones et al. (2013) avaliaram diversos meios de cultivo para *V. vulnificus*. Segundo os autores, *V. vulnificus* é a única espécie de *Vibrio* para a qual existe um meio seletivo amplamente adotado, que é meio CPC. Outro aspecto a favor deste meio é o baixo crescimento de outros micro-organismos.

Enquanto no meio TCBS, as colônias de *V. vulnificus* são morfológicamente semelhantes às colônias positivas de *V. parahaemolyticus*, em CPC não há crescimento de *V. parahaemolyticus* (KAYSNER; DEPAOLA, 2004; OLIVER, 2003), o que o torna, junto com os demais fatores seletivos, um bom meio para isolamento e enumeração de *V. vulnificus*.

c) Ágar colistina polimixina β -celobiose modificado (CPCm)

Este meio é recomendado tanto pela metodologia BAM (KAYSNER; DEPAOLA, 2004) como pela ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007), sendo o único comum a ambas metodologias. A diferença entre os meios CPCm e o CPC está na redução na concentração de colistina e polimixina no meio CPCm (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004; HØI; DALSGAARD; DALSGAARD, 1998), conforme se observa na **Error! Reference source not found..**

Figura 3.3 Placa com meio agar CPC+ e colônias amarelas típicas de *V. vulnificus* com halo amarelo



d) Ágar CPC+

Warner e Oliver (WARNER; OLIVER, 2007) desenvolveram uma nova formulação de meio de cultivo usando como base o meio CPC, adicionando Mg^{2+} e K^{+} e ajustando as concentrações de antibióticos. O novo meio foi comparado ao CPC e VVM quanto a sua performance. As colônias de *V. vulnificus* no ágar CPC+ são amarelas achatadas e com um halo amarelo, como no ágar CPC, como se observa na Figura 3.3. A aparência é resultante da fermentação da D-celobiose e da consequente alteração do pH no meio.

e) Ágar colistina celobiose (CC)

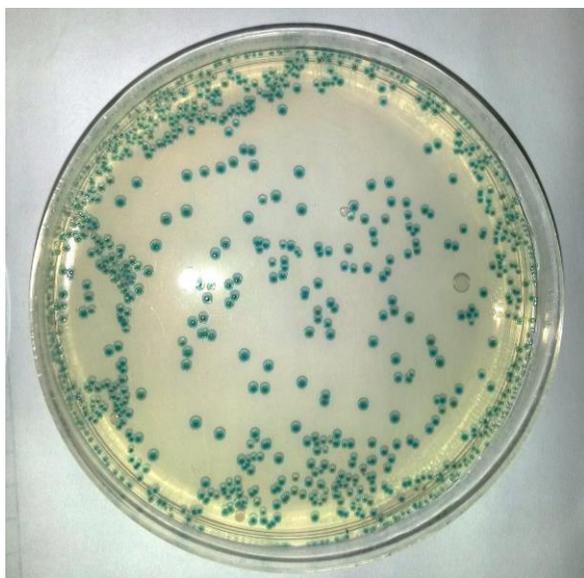
Este ágar também é um dos recomendados pelo método BAM do FDA (KAYSNER; DEPAOLA, 2004), ele possui a mesma composição do ágar CPCm, exceto pela ausência de polimixina B. Segundo Harwood, Gandhi e Wright (2004), a eficácia é semelhante aos meios CPC ou CPCm.

f) Ágar *V. vulnificus* X-Gal (VVX)

Este meio foi proposto por Griffit e Grimes (2013) e não requer etapa de enriquecimento. As colônias positivas para *V. vulnificus* aparecem de coloração azul pela fermentação de uma substância

cromogênica análoga à lactose, o 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal), que é utilizado como fonte carbono pela bactéria. A Figura 3.4 apresenta uma placa de ágar VVX e colônias típicas de *V. vulnificus*. O meio foi considerado mais eficaz nas amostras de ostra que em água com concentração baixa da bactéria e não houve crescimento significativo de colônias de outros microorganismos (GRIFFITT; GRIMES, 2013).

Figura 3.4 Placa com ágar VVX e colônias típicas de *V. vulnificus*, de coloração azul devido à fermentação do X-Gal

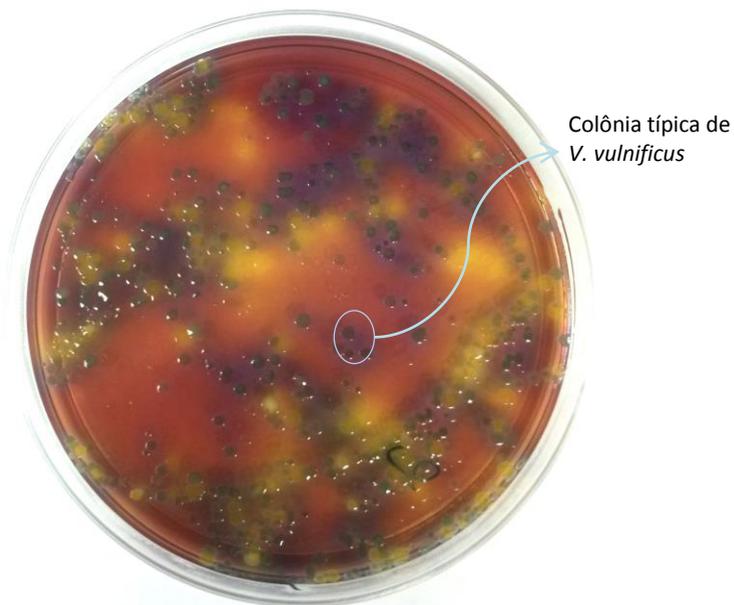


g) Ágar sucrose polimixina dodecil sulfato de sódio (SDS)

O ágar SDS é um dos meios recomendados pela metodologia ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007). Ele foi desenvolvido para diferenciar as colônias de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* que possuem o mesmo aspecto em TCBS. As características que permitem a diferenciação baseiam-se na fermentação da sacarose e na atividade sulfatase, que produzem um halo ao redor da colônia, como se observa na Figura 3.5. Além disso, são acrescentados um detergente e a polimixina B para aumentar a seletividade do meio. Entretanto, é importante ressaltar que, neste meio, tanto as colônias de *V. vulnificus* como de *V. cholerae* não-

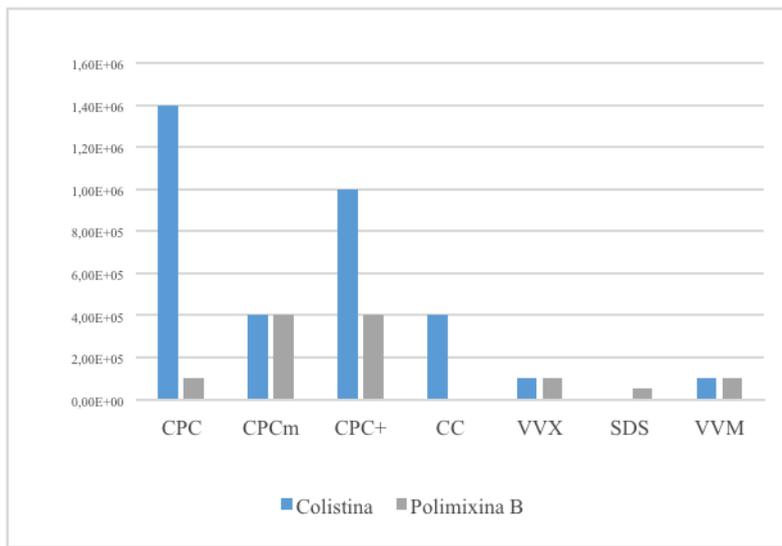
O1 possuem o mesmo aspecto (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004).

Figura 3.5 Placa de ágar SDS com colônias típicas de *V. vulnificus* em coloração azulada



A Figura 3.6 apresenta uma comparação das concentrações dos antibióticos colistina e polimixina B nos meios de cultivo CPC, CPCm, CPC+, CC, VVX, SDS e VVM.

Figura 3.6 Concentrações (U/L) de antibióticos colistina e polimixina B nos meios de cultivo CPC, CPCm, CPC+, CC, VVX, SDS e VVM.

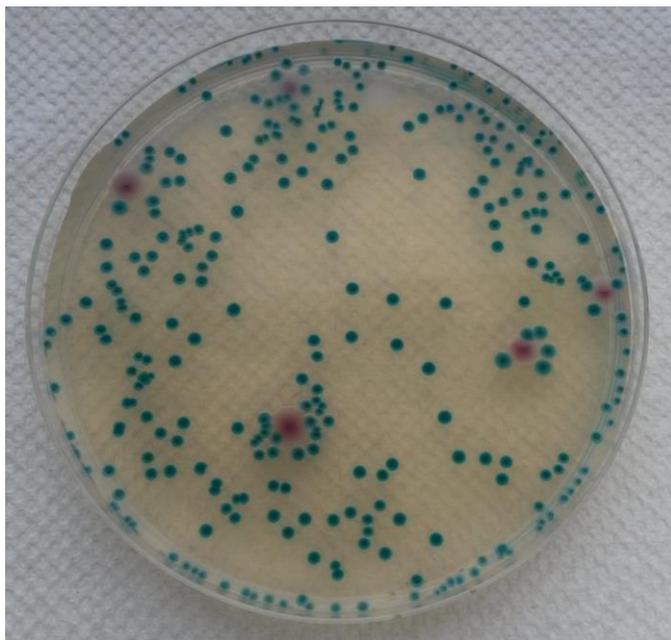


Fonte: Adaptado de Cerdà-Cuellar; Jofre; Blanch (2000), Griffitt; Grimes (2013), Høi; Dalsgaard; Dalsgaard (1998) e Warner; Oliver (2007).

h) Ágar cromogênico (CAV) (CHROMagar *Vibrio*, Paris, França)

Outro meio que tem sido estudado e tem apresentado um bom resultado para isolamento de *V. vulnificus* é o CAV, que apresentou sensibilidade e especificidade superiores aos meios seletivos convencionais (CRUZ; WIN; FLETCHER, 2013). O estudo realizado por Cruz, Win e Fletcher (2013) recomenda o seu uso combinado com outro meio seletivo para pesquisa de *V. vulnificus* em ostras. Um aspecto que torna o meio CAV muito vantajoso é que ele diferencia *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* através da cor das colônias, que são azuis ou púrpuras, respectivamente, como se observa na Figura 3.7. Entretanto, *V. cholerae* também apresenta colônias azuis neste meio, portanto recomenda-se que seja usado associado com outro meio para a diferenciação entre *V. vulnificus* e *V. cholerae*.

Figura 3.7 Placas de CAV com colônias típicas de *V. parahaemolyticus* (púrpura) e *V. vulnificus* (azul)



i) Meio *V. vulnificus* (VVM)

O meio chamado de ágar VVM foi descrito por Cerdá-Cuellar, Jofre e Blanch (2000) contém pequenas modificações do ágar CPC. A celobiose é a principal fonte de carbono e, assim como no CPC, são adicionados $MgCl_2$ e KCl para melhorar o crescimento de *V. vulnificus*. A polimixina B e a colistina são usadas para inibir o crescimento de outros micro-organismos. A incubação a $37^\circ C$ produz colônias de *V. vulnificus* achatadas, amarelo brilhante, enquanto a maioria das outras espécies de *Vibrio* são inibidas ou resultam em colônias verde azuladas (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004). A desvantagem deste meio é que, num estudo de Jones et al. (2013), outras espécies como *V. campbelli*, *V. carchariae*, *V. navarrensis* e *Pseudomonas aeruginosa* também cresceram e produziram colônias amarelas, requerendo mais estudos para justificar que seja usado em substituição ao CPC.

j) Ágar *V. vulnificus* (VV)

O ágar VV para isolamento de *V. vulnificus* demonstra menor especificidade que os meios CPC, SDS e TCBS sendo inadequado para uso em substituição aos meios convencionais (JONES et al., 2013). Na sua formulação foi retirado o citrato de sódio que inibia o crescimento e *V. vulnificus* e foi adicionada salicina como uma fonte de carboidrato seletivo, o pH foi ajustado para 8,6, e foram usados telurito de potássio, cristal violeta e oxgall (bile bovina) para inibir o crescimento de bactérias indesejadas. As colônias positivas são grandes, cinzas com o centro branco, indicando a redução do telurito (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004).

k) Agar de Enumeração de *V. vulnificus* (VVE)

O meio VVE, descrito por Miceli, Watkins e Rippey (1993) contém lactose, além da celobiose, e vários inibidores (oxgall, colato de sódio, taurocolato de sódio e telurito). Os resultados de ensaios ainda não são conclusivos e este meio não tem sido muito usado. As colônias de *V. vulnificus* aparecem azul esverdeadas neste meio em função de um composto cromogênico adicionado, o 5-bromo-4-cloroindoxil-d-galactopiranosídeo (X-Gal), indicador de colônias de *V. vulnificus* β -galactosidase positivas (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004; MICELI; WATKINS; RIPPEY, 1993).

l) HardyCHROM™ *Vibrio* (Hardy Diagnostics, EUA)

Este é um meio seletivo que diferencia colônias de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* na mesma placa baseada na cor da colônia e na observação de fluorescência sob luz UV, na qual somente as colônias de *V. vulnificus* emitem fluorescência. O meio possui pH e salinidade altos para inibir outros micro-organismos. Este meio é novo e carece de estudos comparativos para se determinar sua eficácia.

A Tabela 3.1 apresenta uma comparação entre as características dos principais meios de cultivo usados para isolamento e enumeração de *V. vulnificus*. Observa-se a diferença de pH e composição no que se refere à fonte de carboidrato e ao antibiótico usado para garantir a seletividade do meio, assim como as diferenças na temperatura de incubação. A maioria dos meios utiliza uma combinação de polimixina e celobiose em diferentes concentrações, como foi visto na Figura 3.6. Estas diferenças na composição resultam em diferentes características de coloração de colônias típicas de *V. vulnificus*.

Tabela 3.1 Comparação de métodos de cultivo microbiológico usados para isolamento e enumeração de *V. vulnificus*

Meio de cultivo	pH	temp. de incubação (°C)	Carboidrato	Antibiótico	Característica da colônia	Referência
TCBS	8,6	37	Sacarose	-	Verde	Kobayashi et al., 1963
CPC	7,6	40	Celobiose	C+P	Amarela com halo	Massad; Oliver, 1987
CPCm	7,6	40	Celobiose	C+P	Amarela com halo	Tamplin et al., 1991
CPC+	7,6	40	Celobiose	C+P	Amarela com halo	Warner; Oliver, 2007
VVX	8,5	37	Lactose, X-celobiose, X-Gal	C+P	Azul	Griffith; Grimes, 2013
CC	8,5	40	Celobiose	C	Amarela	Høi; Dalsgaard; Dalsgaard, 1998
SDS	7,6	37	Sacarose	P	Azul com halo	Kitaura et al., 1983
VVM	8,5	37	Celobiose	C+P	Amarela	Cerdá-Cuéllar; Jofre; Blanch, 2000
VV	8,6	37	Salicina, sacarose	-	Cinza, escura no centro	Brayton et al., 1983
VVE	8,5	37	Lactose, X-celobiose, X-Gal	-	Azul esverdeada	Miceli; Watkins; Rippey, 1993
CAV	9,0	37	Peptona,	-	Azul turquesa	Williams; Froelich;

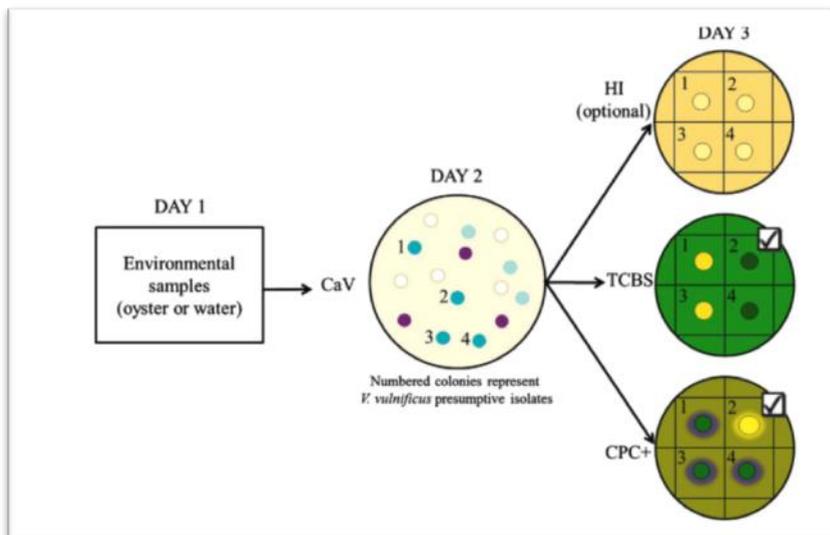
		extrato de levedura		Oliver, 2013		
HardyCH ROM	8.6	35	Sacarose, lactose	-	Roxa e fluorescente sob UV	Hardy Diagnostics, 2015

Fonte: Adaptado de Harwood; Gandhi; Wright (2004). Colistina = C, Polimixina B= P.

3.2.5 Método de plaqueamento triplo

Williams, Froelich e Oliver (2013) propuseram um método para isolamento de *V. vulnificus* denominado de plaqueamento triplo. Eles usaram 25 cepas conhecidas de *V. vulnificus*, incluindo os 3 biotipos e genótipos *vcgC* e *vcgE*, além de 35 cepas adicionais representantes de 16 outras espécies de *Vibrio*. As cepas foram incubadas em meio HI (Heart Infusion) durante a noite, depois foram diluídas em PBS e plaqueadas no meio CAV a 37°C por uma noite. As colônias positivas foram numeradas e plaqueadas em placas de ágar TCBS, CPC+ e HI. A temperatura de incubação de HI e TCBS foi de 30°C, e CPC+ a 37°C (culturas puras) ou 40°C (amostras ambientais). A sequência de plaqueamentos foi feita de acordo com a Figura 3.8.

Figura 3.8 Método do plaqueamento triplo



Fonte: Williams, Froelich; Oliver (2013)

As colônias que cresceram conforme o padrão para *V. vulnificus*, ou seja, turquesa no CAV, amarela em CPC+ e verde em TCBS, nos 3 meios foram consideradas positivas. A confirmação por PCR demonstrou que o método é eficaz e que pode ser uma alternativa quando não existe a infraestrutura necessária para confirmação por PCR.

3.2.6 Confirmação Bioquímica

A identificação bioquímica, conforme previsto nas metodologias BAM (KAYSNER; DEPAOLA, 2004) e ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007), podem ser feita através kits comerciais como Api 20E® (Biomerieux) ou pelo uso de meios e soluções específicas para comprovação de características fenotípicas próprias de *V. vulnificus*. Entretanto, o uso destes meios e soluções não é prático quando existe um número muito grande de amostras, sendo neste caso mais recomendado o uso de sistemas como o já citado API 20E® ou o VITEK® 2 Systems, ambos da Biomerieux®, ou os sistemas automatizados ou semiautomatizados como o Biolog®. Estes kits e equipamentos são mais fáceis de usar e mais rápidos, requerendo no máximo 24h para finalizar as análises.

Além disso, de acordo com Harwood, Gandhi e Wright (2004), a variação fenotípica e genotípica de *V. vulnificus* com frequência dificulta uma confirmação definitiva das cepas, e é comum que estas análises bioquímicas resultem em cepas não identificadas.

3.2.7 Métodos imunológicos

A preocupação com a saúde pública em relação à infecção causada por *V. vulnificus*, a necessidade de um rápido diagnóstico, juntamente com meios de cultivo seletivos que ainda geram resultados falsos positivos ou falsos negativos, levou ao desenvolvimento de métodos moleculares e imunológicos para confirmação e identificação de *V. vulnificus* (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004).

Tem sido usado um antígeno proteico intracelular para a produção de anticorpos monoclonais usados no imuno ensaio para detecção espécie-específico (EIA), com limite de detecção de $2,0 \times 10^3$ células. O anticorpo monoclonal foi designado FRBT37 e foi aprovado pelo FDA como ferramenta de confirmação de *V. vulnificus*. Entretanto, apesar da técnica apresentar uma alta especificidade, os ensaios ELISA geralmente exigem crescimento prévio em meio de enriquecimento para a obtenção de um número maior de células, que esteja dentro do limite de detecção do método (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004). Este enriquecimento prévio aumenta o tempo para que se tenha uma resposta, o que pode dificultar o tratamento e recuperação em casos de infecção por *V. vulnificus*.

3.2.8 Métodos moleculares

Com a limitação do tempo de enriquecimento para os métodos imunológicos, mais estudos foram executados nos métodos moleculares para desenvolver uma metodologia com uma especificidade muito maior que os meios tradicionais de cultivo e uma maior sensibilidade para detecção de células em baixo número, sem a necessidade de enriquecimento das amostras (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004).

As metodologias moleculares são mais rápidas e sensíveis, mas precisam de equipamentos próprios para que sejam realizadas. Uma identificação de *V. vulnificus* com base em PCR precisa de um dia para o resultado, enquanto os meios de cultivo podem levar de quatro a sete dias (KAYSNER; DEPAOLA, 2004).

As tecnologias moleculares baseiam-se principalmente na amplificação do DNA, através da PCR, e podem ser utilizadas tanto para complementar como até mesmo para substituir as metodologias baseadas em métodos de cultivo bacteriano. A detecção de agentes patogênicos usando a PCR é considerada um método sensível o suficiente para ser aplicado em amostras de água e sedimento, assim como em alimentos de origem marinha (THOMPSON et al., 2005), mesmo em presença de baixas contagens de micro-organismos.

Na diferenciação das cepas de *V. vulnificus* pela técnica de PCR, as moléculas de DNA ou cDNA são amplificadas milhares de vezes, rapidamente, para serem analisadas posteriormente. Geralmente uma reação de PCR contém o DNA com a sequência alvo que se quer amplificar, a DNA polimerase termoestável, dois oligonucleotídeos iniciadores, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação e concentração adequada de cloreto de magnésio ($MgCl_2$). A mistura é submetida a ciclos de aquecimento e resfriamento que permitem a desnaturação do DNA alvo, anelamento dos iniciadores e extensão da cadeia de DNA onde há a polimerização de novas fitas. A repetição destes ciclos permite a amplificação do DNA usado como molde (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

A PCR pode auxiliar a responder um questionamento existente com relação às infecções por *V. vulnificus*, que se refere à potencial patogenicidade das cepas. Por qual razão pessoas ingerem alimentos ou entram em contato com água nos quais há a bactéria e, mesmo tendo fatores predisponentes, nem sempre aparece a doença? A resposta a este questionamento pode estar relacionada às variações genéticas entre as cepas. O *V. vulnificus* do biotipo 1, está mais frequentemente associado

com casos de doença em humanos e pode ser classificado em dois genótipos diferentes pela variação no 16S rDNA, que são os tipos A e B, além de um gene relacionado com a virulência identificado como *vcgC* e *vcgE*. Este genótipo tem sido correlacionado com o isolamento em amostras clínicas ou ambientais, sendo que, geralmente, 90% das amostras clínicas possuem a sequência *vcgC* e 87% das amostras isoladas do ambiente possuem a variação *vcgE* (ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005; WARNER; OLIVER, 2008a). Segundo Rosche, Yano e Oliver (2005) a menor presença de cepas *vcgC* nas amostras ambientais (água e ostras) seria uma das respostas para a pergunta acima.

A confirmação de *V. vulnificus* pela análise do gene hemolisina/citolisina *vvhA* através de PCR também tem sido aceita como o método padrão. Entretanto o gene *vvhA* não diferencia cepas potencialmente patogênicas de cepas não patogênicas, ou seja, cepas *vcgC* e *vcgE* (BIER et al., 2013; OLIVER, 2006; WARNER; OLIVER, 2008a).

A PCR é usada como base para diversas aplicações no estudo e identificação de *V. vulnificus*. Um método empregado é o DNA aleatório polimórfico amplificado (RAPD) para identificar *amplicons* presentes principalmente em isolados clínicos, usando um único iniciador para avaliar polimorfismos de DNA. Este método foi usado na diferenciação entre cepas *vcgC* e *vcgE* feita por Rosche, Yano e Oliver (2005).

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) é um método que permite a detecção e quantificação dos produtos gerados a cada ciclo de amplificação. Este método requer equipamentos específicos para a leitura a cada ciclo (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

Os ensaios de PCR multiplex (m-PCR) permitem a detecção simultânea de múltiplos alvos num único ensaio e tem sido 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 *V. vulnificus* em moluscos bivalves (GUGLIANDOLO et al., 2011).

Análises feitas por Jones e Oliver (2009) indicaram que a variação na sequência do gene associado à virulência, o *vcg*, tem alta correlação com a fonte do isolamento. Segundo Jones e Oliver (2009), a variedade de *loci* capazes de correlacionar isolados de *V. vulnificus* com sua origem indicam diferenças nos cromossomos entre as cepas desta bactéria. Assim, tem sido usado um método de subtipificação que analisa simultaneamente polimorfismo de DNA em *loci* múltiplos para

discriminar as cepas de *V. vulnificus*. Os alvos de PCR repetitiva palindrômica extragênica (rep-PCR) conservaram elementos repetitivos que foram distribuídos através do genoma bacteriano, gerando um *fingerprint* para cada cepa. Ao contrário do caso com tipificação da região de espaço intergênico, a análise de isolados clínicos e ambientais usando esta técnica mostrou maior diversidade entre os isolados clínicos, enquanto as cepas ambientais foram mais parecidas. Dadas as preocupações relacionadas à natureza polimórfica do rRNA e a congruência entre os resultados de rep-PCR e outros métodos de tipificação de *locus* simples, o método de avaliação de múltiplos *loci*, segundo os autores, parece ser o melhor para caracterizar a divergência genômica desta bactéria.

Estudos mostraram que a patogenicidade potencial de *V. vulnificus* pode ser quantificada por sondas específicas para o gene *vcgC* ou para o polimorfismo do gene *pilF* (FROELICH; WEISS; NOBLE, 2014). Segundo Baker-Austin et al. (2012), a vantagem do uso do gene *pilF* é o fato de que este também pode ser usado no estudo de biotipos 2 e 3, com boa precisão na identificação de cepas potencialmente patogênicas, o que não foi possível nos métodos baseados nos fatores de virulência do biotipo 1 como o gene *vcg* e o estudo da sequências de 16S rRNA, além de não ser necessária a etapa de enriquecimento da amostra prévia à PCR.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo teve duas etapas, na primeira foram feitos plaqueamentos com cepas conhecidas de *V. vulnificus*, puras, nos meios selecionados para o estudo, e na segunda etapa utilizaram-se amostras ambientais de ostras e água, plaqueadas nos meios de cultivo e com posterior confirmação das colônias típicas, por PCR, utilizando-se os genes *vcgC* e *vcgE*.

3.3.1 Meios de cultivo

A escolha dos meios de cultivo usados no estudo foi feita com base nas recomendações das metodologias oficiais do FDA/EUA (KAYSNER; DEPAOLA, 2004), pela norma ISO/TS 21872-2 (ISO, 2007) e de acordo com o recomendado por Froelich, Weiss e Noble (2014), Jones et al., (2013), Oliver (2013), Williams, Froelich e Oliver (2013) e por Warner e Oliver (2007).

Assim, os meios de cultivo microbiológicos para *Vibrio* escolhidos foram o ágar TCBS (Criterion, Hardy Diagnostics, EUA), o ágar base SDS (HIMedia Laboratories Pvt. Ltd., Índia), o ágar VVX, o CAV (CHROMagar, França), e meio CPC+. Também foi utilizado o ágar HI (Hardy Diagnostics, EUA), não seletivo, para comparar a capacidade de enumeração dos meios avaliados.

No caldo HI foi adicionado 15g/L de ágar base. O preparo do meio CPC+ foi feito a partir de duas soluções. A solução A contém bactopectona (10 g), proteose peptona (5 g), NaCl (10 g), MgCl₂ * 6 H₂O (4 g), KCl (4 g), azul bromotimol (0,04 g), vermelho cresol (0,04 g) e água destilada (900 mL). O pH foi ajustado para 7,6 ± 0,2 e foram adicionadas 15 g de ágar. A solução foi autoclavada por 20 minutos e então esfriada até 55 a 60°C. A solução B contém D-celobiose (15 g), colistina metassulfonato (1 x 10⁶ unidades) e polimixina B (4 x 10⁵ unidades) dissolvidos em 100 mL de água destilada. A solução B foi aquecida com agitação leve para diluição completa da D-celobiose. Os antibióticos foram adicionados à solução à temperatura de 55 a 60°C e a solução B final foi esterilizada por filtração à vácuo em seringa (0,2 µm) e adicionada à solução A. O ágar pronto apresenta coloração verde-oliva. As colônias típicas de *V. vulnificus* possuem coloração amarela com um halo amarelo.

O meio de cultivo VVX foi preparado com a partir de 3 soluções. A solução 1 foi preparada com extrato de levedura (4 g), NaCl (10 g), MgCl₂ * 6 H₂O (3,6 g), KCl (4 g) em 900 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 8,5 e foram adicionadas 15 g de ágar. A solução foi autoclavada por 20 minutos. A solução 2 contém D-celobiose (5 g), lactose * H₂O (0,105 g), colistina metassulfonato (1 x 10⁵ unidades) e polimixina B (1 x 10⁵ unidades) dissolvidos em 100 mL de água destilada. A solução 1 foi autoclavada por 20 minutos e deixada esfriar. A solução 2 foi esterilizada por filtração a vácuo em seringa (0,2 µm) e adicionada à solução 1 que foi esfriada a 55 a 60°C. Finalmente foi preparada a solução 3 contendo 20 mg de X-Gal por mL de dimetil sulfóxido (DMSO), (CH₂)₂SO. O volume da solução 3 a ser adicionado foi de 2 mL/L. As colônias típicas de *V. vulnificus* apresentam coloração azul brilhante.

3.3.2 Preparo das amostras de cepas puras

Para comparação da performance dos meios foram usadas cepas conhecidas de *V. vulnificus*, previamente analisadas e identificadas

quanto à presença dos genes *vcgC* e *vcgE*, de acordo com o protocolo proposto por Warner e Oliver (2008b). As cepas utilizadas neste estudo e sua identificação genotípica fazem parte do estoque mantido no *Institute of Marine Sciences / University of North Carolina (IMS/UNC)* (Quadro 3.1). As amostras congeladas (-80°C) foram inoculadas em caldo HI e incubadas a 37°C sob agitação de 50 rpm durante 18 a 24 h. A partir do caldo HI com crescimento, visível pela presença de turbidez, foram preparadas várias 8 diluições decimais em PBS adicionando-se 100 µL de caldo HI com crescimento em 900 µL de PBS. As diluições 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸ foram plaqueadas, em duplicata, em todos os meios TCBS, SDS, VVX, CAV, CPC+ e HI e incubadas a 37°C por 18 a 24h. O meio CPC+ foi incubado a 40°C pelo mesmo intervalo de tempo dos demais meios. Passado este período foram feitas as contagens de colônias típicas nas placas. No total, foram realizadas 46 repetições com as diferentes cepas apresentadas no Quadro 3.1, nos 6 meios citados, sendo 18 testes com cepas *vcgC* e 28 com cepas *vcgE*.

Quadro 3.1 Identificação genotípica e origem das cepas de *V. vulnificus* utilizadas

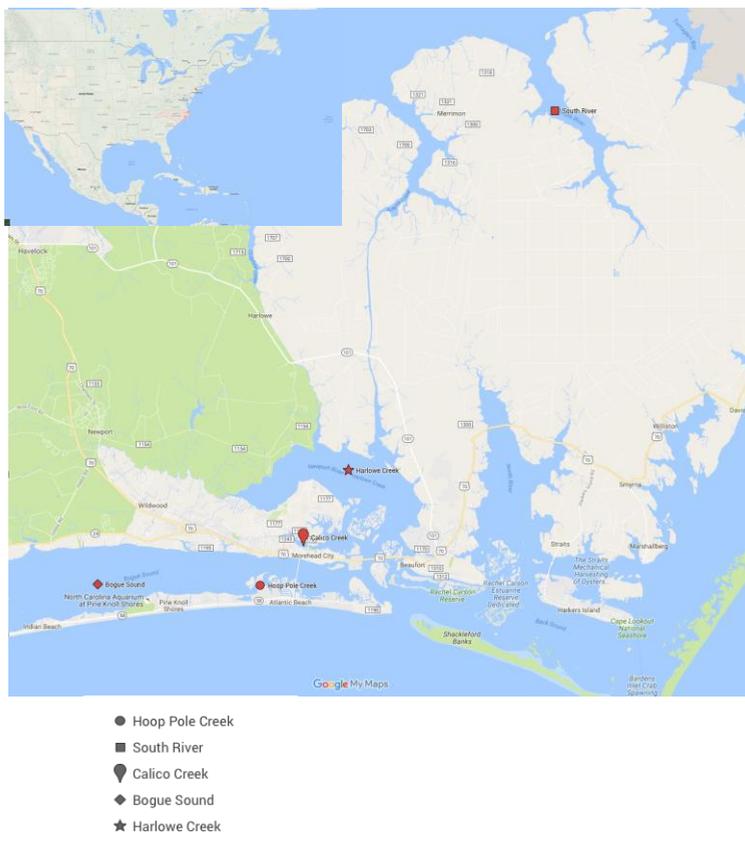
Cepa de <i>V. vulnificus</i>	Identificação genotípica	Origem
VV MO6	<i>vcgC</i>	Caso clínico
VV JY1701	<i>vcgE</i>	Ambiente
VV E64MW	<i>vcgE</i>	Caso clínico
VV SREL 106	<i>vcgE</i>	Ambiente
VV SREL 190	<i>vcgC</i>	Ambiente
VV SREL 89	<i>vcgE</i>	Ambiente

Os resultados das contagens em placas foram transformados em log e foi feita análise estatística de variância ANOVA através do *software Prism 6 for Mac OS X*, versão 6.0h (Graphpad Software Inc.), adotando-se $p < 0,05$, para comparar a performance dos meios no que refere ao crescimento de *V. vulnificus* total e para verificar se existiam diferenças quando considerando os genótipos *vcgC* e *vcgE* separadamente em cada meio.

3.3.3 Preparo das amostras ambientais

Para comparar a performance dos meios de cultivo com amostras ambientais foram coletadas ostras nativas (*Crassostrea virginica*) e água do mar de diferentes pontos da costa do estado da Carolina do Norte, EUA, indicados na Figura 3.9.

Figura 3.9 Pontos de coleta de ostras e água na Carolina do Norte, EUA



Foram analisadas 15 amostras de ostras e cinco de água do mar entre os meses de maio e setembro de 2015, correspondendo a meses de primavera e verão no hemisfério norte, coletas aleatoriamente nos pontos apresentados na Figura 3.9. As amostras de água do mar também

foram analisadas quanto à temperatura no momento da coleta (Termometro Easy-Read® by H-B USA, P 49288) e quanto à salinidade (Seawater refractometer HI 96822, Hanna Instruments Inc.) após a recepção no laboratório. As amostras eram compostas por cerca de 10 unidades de ostras e um litro de água do mar de cada ponto de coleta. As ostras eram colocadas em bolsas plásticas em caixa isotérmica com gelo para transporte ao laboratório no IMS/UNC, sendo analisadas no mesmo dia, em média até 4 h após a coleta. As amostras de água do mar eram coletadas em garrafas plásticas, fazendo-se 3 enxágues antes de coletar o volume mínimo de 1 litro, e esta era mantida e transportada da mesma forma que as ostras.

No laboratório, as ostras eram lavadas com escova sob água potável corrente, colocadas em bancada com papel toalha e aspergidas com álcool 70°GL. Cada amostra foi preparada a partir de cinco unidades de ostras, abertas com faca apropriada, limpa, aspergidas em etanol a 70°GL, enxaguada em água deionizada antes do uso e entre cada grupo de amostras. Após a retirada das valvas e desprezado o líquido presente, as amostras colocadas em bolsa plásticas, pesadas e diluídas em PBS na proporção de 1:1 (peso:volume) em equipamento diluidor automático (*smartdilutor*, Neutec Group Inc.) e homogeneizadas em misturador automático (Fischer Scientific). Esta amostra era então diluída 1:10 em PBS, resultando em diluições 1:1 e 1:20. As amostras que foram utilizadas para plaqueamento, em duplicata, com volume de 100 µL de amostra e com auxílio alça de drigalski nos meios selecionados para o estudo.

As amostras de água foram filtradas à vácuo através de membrana filtrante de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade estéril (GN-6 Metricel® S-Pack, Membrane disc filters, Pall Corporation). O volume de água do mar utilizado variou entre um, cinco e dez mL, dependendo das condições de temperatura e salinidade da água, de modo que quando os parâmetros ambientais se apresentavam mais favoráveis ao crescimento de *V. vulnificus*, ou seja, como maior temperatura e menor salinidade, menor era o volume utilizado, mas sempre usando dois volumes diferentes. Após a filtração, a membrana era colocada diretamente sobre a superfície de cada placa com o ágar selecionado.

Os plaqueamentos nos meios TCBS, SDS, VVX, CAV e HI foram feitos em duplicata e incubadas por 18 a 24 h a 37°C e a 40°C para as placas com o meio CPC+.

3.3.4 Confirmação genotípica das amostras ambientais

Após a incubação e contagem das placas das amostras de origem ambiental (ostras e água do mar), foram coletadas 05 colônias positivas típicas de cada placa (ou todas, quando havia menos que 5 colônias), com auxílio de alça bacteriológica esterilizada, e inoculadas individualmente em microtubos contendo 100 µL de caldo HI estéril, numerados, mantidos em temperatura ambiente (23°C) durante 18 a 24 horas. A extração do DNA para análise por PCR se deu por ebulição das amostras durante 10 minutos, e posterior centrifugação (10.000 rpm x 10 min). As amostras foram mantidas congeladas (-20°C) até a análise por PCR.

A metodologia para realização da PCR foi realizada conforme descrito por Warner e Oliver (2008b), usando os primers *vcgC* e *vcgE* para *V. vulnificus* e o primer *toxR* para confirmação de *V. parahaemolyticus* (FROELICH et al., 2015) cujas sequências são apresentadas no Quadro 3.2. O primer para *V. parahaemolyticus* foi utilizado para avaliar a capacidade dos meios quanto à especificidade entre as duas espécies. Além disso, as amostras também foram analisadas com relação à presença do gene *vvhA* específico para a espécie *V. vulnificus* em geral, sem diferenciação de potencial patogênico sendo considerada *V. vulnificus* total (WARNER; OLIVER, 2008b).

Quadro 3.2 Primers usados na confirmação genotípica das colônias típicas

Primer	Sequência	Referência
<i>vcgE</i> F	5'CTCAGAAAGGCTCAATTGAC3'	Warner; Oliver, 2008b
<i>vcgE</i> R	5'GATTAACGCTGTAAGGCCG3'	
<i>vcgC</i> F	5'AGCTGCCGATAGCGATCT3'	
<i>vcgC</i> R	5'TGAGCTAACGCGAGTAGTGAG3'	
<i>vvhA</i> F	5'AGCGGTGATTTCAACG3'	
<i>vvhA</i> R	5'GGCCGTCTTTGTTCACT3'	
<i>toxR</i> R	5'GTCTTCTGACGCAATCGTTG3'	Froelich et al., 2015
<i>toxR</i> F	5'ATACGAGTGGTTGCTGTCATG3'	

A reação de PCR foi realizada de acordo com as orientações dos fabricantes usando GoTaq Green 2x (Promega, Madison, WI) em termociclador Px2E (ThermoScientific, Waltham, MA). Os parâmetros

usados foram: um ciclo inicial de desnaturação por 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C e 45 s a 72°C, e um ciclo final de extensão de 2 min a 72°C (WARNER; OLIVER, 2008b).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese (Fischer Scientific FB300, EUA), ajustado para 140 V durante 25 min, em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio a 0,1% e observados sob luz UV (UVP PhotoDoc-It™ Imaging system, Photo/Prep®II, Fotodyne).

Os resultados foram submetidos à análise estatística ANOVA, através do *software* Prism 6 for Mac OS X, versão 6.0h (Graphpad Software Inc.), adotando-se $p < 0,05$.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Resultados da análise de performance usando cepas puras de *V. vulnificus*

A Tabela 3.2 apresenta os resultados de contagens em placa (log UFC/g) do teste de eficácia dos meios com as cepas puras de genótipos previamente conhecidos - *vcgC* ou *vcgE* - e *Vibrio* total.

Tabela 3.2 Valor médio e erro padrão da média (SEM) das contagens de cada genótipo de *V. vulnificus* e de *Vibrio* total (log UFC/g)

	TCBS (log UFC/g)	SDS (log UFC/g)	VVX (log UFC/g)	CAV (log UFC/g)	CPC+ (log UFC/g)	HI (log UFC/g)
<i>vagC</i>	0,753±0,4199	4,007±0,7718 ^{a,b}	5,528±0,8025 ^{a,b}	4,654±0,7813 ^b	4,056±0,8397 ^{a,b}	4,321±0,8371 ^{a,b}
<i>vagE</i>	3,267±0,789 ^a	4,284±0,8297 ^a	5,427±0,7936 ^a	5,065±0,7997 ^a	3,763±0,7916 ^a	6,172±0,7671 ^a
<i>Vibrio</i> total	2,448±0,5574 ^a	5,046±0,607 ^b	6,668±0,5374 ^b	5,916±0,5646 ^b	4,76±0,6301 ^{a,b}	6,387±0,5763 ^b

Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as contagens para cada cepa e na contagem de *V. vulnificus* total na comparação entre os meios.

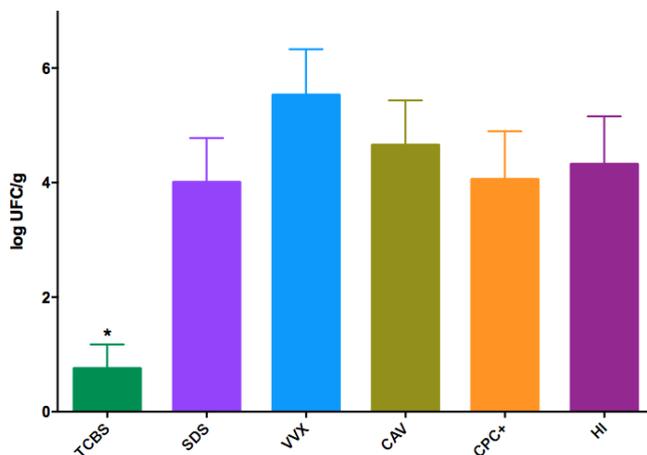
Analisando as cepas *vcgC*, observa-se que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as contagens obtidas no meio TCBS em relação aos meios SDS, VVX e CAV, mas sem diferença entre estes últimos e os demais meios. A Figura 3.10 apresenta o gráfico da média e as de erro padrão da média para as contagens de cepas *vcgC* nos diferentes meios.

Na análise das contagens obtidas pelo plaqueamento das cepas *vcgE*, não foram observadas diferenças significativas entre os meios. A Figura 3.11 apresenta o histograma da média e as barras de erro padrão da média para as contagens de cepas *vcgE* nos diferentes meios.

No que se refere à performance dos meios quando consideradas as contagens totais de *V. vulnificus*, o meio TCBS apresentou diferença estatística significativa em relação aos resultados obtidos por todos os meios, exceto pelo CPC+. Também não houve diferença entre os meios VVX, SDS, CPC+, CAV e HI. Cabe destacar que o meio HI, mesmo não sendo seletivo para *Vibrio*, na inoculação de cepas puras apresentou contagens maiores que o TCBS que é um meio mais recomendado para este gênero, e que esperava-se que apresentasse melhor desempenho pelo menos em relação ao HI.

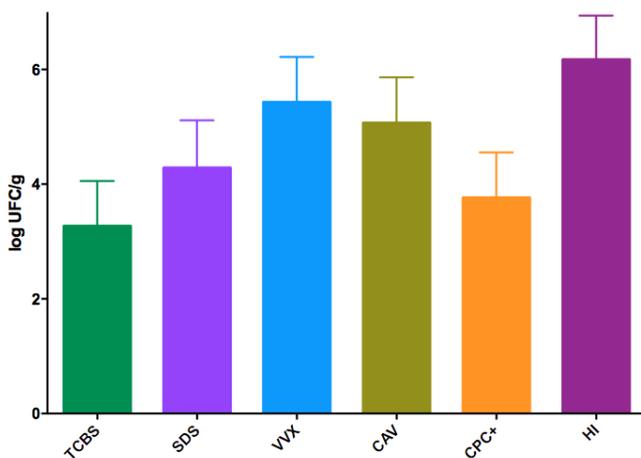
Os resultados da avaliação de performance dos meios em relação aos genótipos *vcgC* e *vcgE* separadamente estão nas Figuras 3.10 e 3.11. Considerando que as amostras plaqueadas eram as mesmas em todos os meios, ou seja, com a mesma contagem bacteriana inicial, observa-se que o meio VVX, seletivo para *V. vulnificus*, apresentou maior crescimento de células.

Figura 3.10 Performance dos meios de cultivo (log UFC/g) no isolamento e enumeração de cepas *vcgC* de *V. vulnificus* (média e erro padrão da média)



O símbolo * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Figura 3.11 Performance dos meios de cultivo (log UFC/g) no isolamento e enumeração de cepas *vcgE* de *V. vulnificus* (média e erro padrão da média)



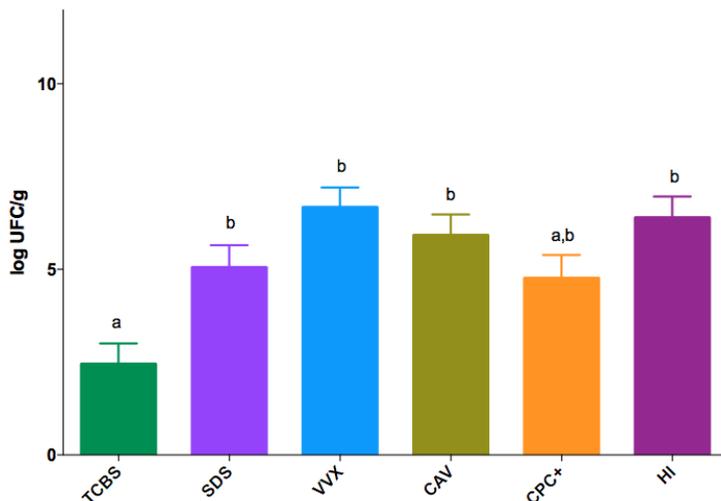
Assim, na comparação da performance dos meios de cultivo em relação aos genótipos *vcgC* e *vcgE*, não houve diferença estatística significativa entre os diferentes genótipos e um mesmo tipo de meio de cultivo, o que demonstra que não houve um desempenho diferenciado dos meios em relação aos diferentes genótipos.

O meio TCBS apresentou uma baixa performance em relação ao meio HI, com diferença estatística significativa em relação a este meio, usado como padrão de referência. Esta análise demonstra que o TCBS, como meio de análise de amostras de origem ambiental, onde há predomínio de cepas *vcgE* (ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005; WARNER; OLIVER, 2008a), como ostras e água, pode apresentar um resultado satisfatório, mesmo sendo um meio não seletivo para *V. vulnificus*. Por outro lado, na análise de amostras obtidas de casos clínicos suspeitos, onde geralmente há predomínio de cepas *vcgC*, o meio TCBS não seria a melhor escolha, uma vez que o resultado da performance com estas cepas foi ainda pior e com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais meios.

Analisando a performance dos meios seletivos, no que se refere às contagens de UFC/g, o meio VVX apresentou maiores contagens que os demais, mas com diferença significativa apenas em relação ao TCBS para contagem de *V. vulnificus* total e cepas C, mas sem diferença em relação ao crescimento de cepas E entre VVX e TCBS. Analisando os resultados obtidos com cepas portadoras do gene *vcgE* não houve diferença estatística entre nenhum dos meios de cultivo testados, apesar da aparente melhor performance do meio VVX.

Além disso, observa-se que o meio TCBS foi o que apresentou menores valores de UFC/g em todos os casos acima, entretanto sem diferença estatística significativa quando comparado ao CPC+ que é considerado um bom meio seletivo para *V. vulnificus*.

Figura 3.12 Performance dos meios de cultivo (log UFC/g) no isolamento e enumeração de *V. vulnificus* total a partir do plaqueamento de cepas puras (média e erro padrão da média)



Subíndices diferentes indicam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os meios de cultivo testados. Os valores são resultantes da média de 46 repetições em duplicata.

Cabe destacar a melhor performance do meio VVX, ainda que sem diferença estatística significativa, em relação ao meio HI, escolhido como padrão de referência já que não possui antibiótico ou qualquer outro fator inibidor para o crescimento de *V. vulnificus* total. A Tabela 3.3 apresenta os percentuais de recuperação de cepas *vcgC* e *vcgE* de *V. vulnificus* nos meios TCBS, SDS, VVX, CAV e CPC+ em relação ao meio HI. Observa-se que tanto para as cepas C como E, a melhor recuperação se deu com o meio VVX, entretanto os resultados mais próximos ao meio HI, usado como padrão neste experimento, foi o CPC+ para as cepas C e o CAV para as cepas E e *V. vulnificus* total.

Tabela 3.1 Percentual comparativo de recuperação de cepas *vcgC* e *vcgE* de *V. vulnificus* em TCBS, SDS, VVX, CAV e CPC+ em relação ao meio HI

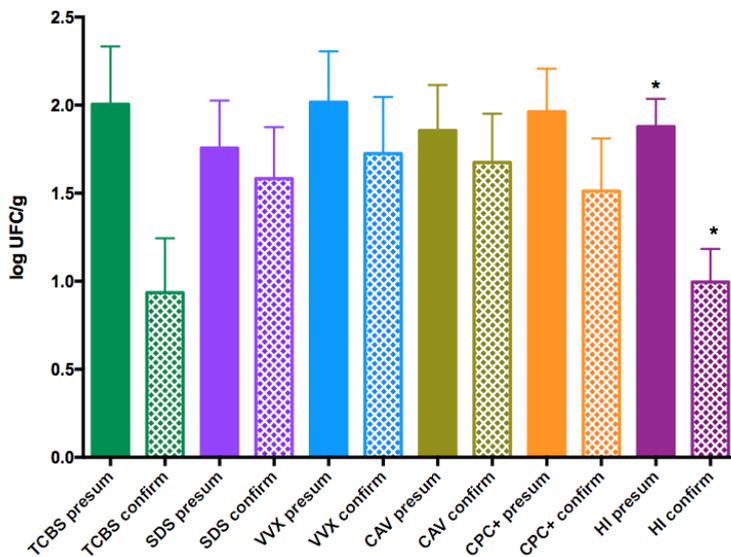
meios/cepas	TCBS	SDS	VVX	CAV	CPC+
% cepas <i>vcgC</i>	17,45	92,75	127,95	107,73	93,89
% cepas <i>vcgE</i>	52,95	69,43	87,95	82,09	60,99
% total	38,32	79,01	104,40	92,63	74,52

3.4.2 Resultados da análise de performance usando amostras ambientais de ostras e água do mar

A avaliação da performance dos meios em amostras de origem ambiental se deu pelo plaqueamentos das amostras de ostras e de água nos meios selecionados e confirmação por PCR, obtendo-se dados presumidos e confirmados.

Analisando os dados totais, considerando-se resultados de amostras de ostras e de água, observa-se que somente houve diferença estatística, entre dados presumidos e confirmados, para o meio HI. Todos os demais apresentaram desempenho equivalente. Os dados são demonstrados na Tabela 3.4 e na Figura 3.13, onde se observa a performance de cada meio no isolamento e detecção de amostras naturalmente contaminadas e o resultado após a confirmação por PCR.

Figura 3.13 Performance dos meios de cultivo com uso de amostras ambientais, naturalmente contaminadas, com confirmação por PCR (média e erro padrão da média)



Barras com * indicam diferença estatística entre elas, em cada meio ($p < 0,05$).

Tabela 3.4 Resultados da análise de performance usando amostras ambientais de ostras e água do mar, em todos os meios (log UFC/g em meios e confirmação por PCR), média e erro padrão da média

	TCBS		SDS		VVX		CAV		CPC+		HI	
	presum	conf	presum	conf	presum	conf	presum	conf	presum	conf	presum	conf
média	2,006	0,935	1,756	1,583	2,017	1,725	1,856	1,675	1,963	1,512	1,878	0,9951
erro	0,327	1,581	0,2697	0,2921	0,2894	0,3211	0,2582	0,2764	0,2436	0,2998	0,1584	0,1883

conf = confirmadas por PCR.

Considerando os meios seletivos, observa-se que a performance foi adequada para todos os meios analisados, uma vez que não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre eles e tampouco entre os resultados de contagem presumida e confirmadas por PCR. Entretanto, cabe destacar que mesmo usando meios seletivos para diferenciar *V. vulnificus* de *V. parahaemolyticus*, como o CAV, ou meios que deveriam permitir apenas o crescimento de colônias de *V. vulnificus*, como o SDS, o VVX e o CPC+, ao analisar os resultados da PCR notou-se que algumas colônias típicas destes meios foram identificadas como sendo *V. parahaemolyticus*. A Tabela 3.4 e a Figura 3.13 apresentam os resultados relativos a estas análises. Também houveram alguns casos de colônias confirmadas como *V. vulnificus*, mas cuja identificação genotípica quanto aos genes *vcgC* ou *vcgE* não foram possíveis (não tipificável = NT), tendo sido apenas confirmadas como *V. vulnificus* pela PCR com o gene *vvhA* (WARNER; OLIVER, 2008b).

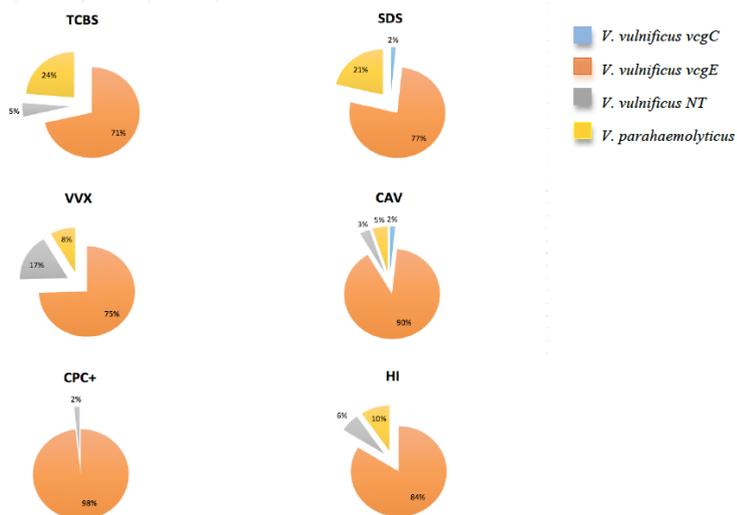
Tabela 3.5 Resultados % de recuperação dos meios analisados

	Nº total colônias típicas para <i>V. vulnificus</i>	Nº total <i>V. vulnificus</i> confirmadas por PCR	% recuperação
TCBS	90	16	17,78
SDS	94	50	53,19
VVX	79	53	67,09
CAV	85	56	65,88
CPC+	76	56	73,68
HI	106	28	26,42
total	530	287	48,87

Na Tabela 3.5, observa-se que, entre as 530 amostras analisadas por PCR, os meios CPC+, VVX e CAV resultaram em maior percentual de confirmação de colônias típicas de *V. vulnificus*. Entretanto, de acordo com o exposto acima, nem todas as amostras positivas resultaram sendo confirmadas como *V. vulnificus*. A Figura 3.14 apresenta os resultados obtidos na identificação genotípica, onde pode-se observar que além das amostras que foram confirmadas como *V. vulnificus*, algumas resultaram identificadas como *V. parahaemolyticus*, mesmo em meios considerados seletivos e algumas não foram não

tipificadas (NT), mesmo sendo confirmadas como *V. vulnificus* (*vvhA*). Os dados apresentados são resultantes da soma dos resultados obtidos de ostras e de água, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre as duas amostras de origem ambiental.

Figura 3.14 Resultado percentual da genotipagem das amostras positivas por PCR



Analisando a performance dos meios com base nos dados da Tabela 3.5 e da Figura 3.14, merece destaque o meio CPC+ que, além de apresentar a maior porcentagem de recuperação (73,68%), resultou na confirmação, por PCR, de identificação de *V. vulnificus* em todas as colônias recuperadas.

Os meios VVX e CAV que apresentaram bons percentuais de confirmação das colônias típicas, com 67,09 e 65,88% respectivamente, entretanto apresentaram um alto percentual de falsos positivos (8 e 5%, respectivamente). Em se tratando do meio CAV, houveram falsos positivos tanto em colônias púrpuras que foram identificadas *V. vulnificus* como colônias azuis que foram confirmadas sendo *V. parahaemolyticus*.

O agar SDS merece destaque pelo maior índice de falsos positivos, 21%, já que é um meio seletivo para *V. vulnificus* e um dos meios recomendado pela metodologia ISO 21872-2 (ISO, 2007).

3.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O meio TCBS, apesar de indicado para a identificação de vibrios e estar presente tanto na metodologia do BAM (KAYSNER; DEPAOLA, 2004) como na ISO/TS 21872-2: 2007(E), parte 2 (ISO, 2007), não é seletivo para ser usado como único meio de diagnóstico, pois além do *V. vulnificus*, o meio também permite o crescimento de *V. parahaemolyticus* e *V. mimicus* sem diferenciação fenotípica das colônias (KAYSNER; DEPAOLA, 2004). Os resultados expressos pelo meio TCBS são, portanto, considerados como *Vibrio* total, e não *V. vulnificus*. Outros meios são indicados no isolamento de *V. vulnificus* como o ágar CPC ou CPCm, que apresentam melhor recuperação de células em comparação ao TCBS (SILVA, 2003). Além deles, outros meios têm sido pesquisados, como o CPC+ ou combinações de meios que aumentam a confiabilidade dos resultados (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004; JONES et al., 2013; WILLIAMS; FROELICH; OLIVER, 2013).

Os dados de recuperação as cepas *vcgC* (93,89%) no meio CPC+ coincidem com os resultados observados por Warner e Oliver (2007) (93,3%), entretanto, para as cepas *vcgE*, a recuperação foi menor (60,99%) que os resultados dos autores citados (93,1%).. Houve pouca variação na quantidade de células de *V. vulnificus* isoladas de ostras nos meios CPC, CPC+ e CC. O meio CPC+ mostrou uma melhor recuperação de células de amostras de ostras e de água do mar sem a necessidade de enriquecimento, além de menor taxa de crescimento de

bactérias não alvo (8 a 10%) em comparação com os outros meios (20 a 50%). As colônias positivas foram confirmadas por PCR, com 91,4% das colônias provenientes de ostras e 75% das amostras de água confirmadas pela metodologia molecular como sendo *V. vulnificus*.

O meio CPCm, no isolamento de *V. vulnificus* de ostras e de amostras de água e sedimento, apresentou resultados superiores a outros meios (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004; HØI; DALSGAARD; DALSGAARD, 1998; JONES et al., 2013), e de acordo com Harwood, Gandhi e Wright (2004), a eficiência dos métodos CC, CPC e CPCm não apresenta diferença significativa. Assim, pode-se considerar que resultados similares a este estudo foram obtidos por Oliver et al. (1992), ao comparar a habilidade de CPC, SDS e TCBS em selecionar e diferenciar *V. vulnificus* de amostras de mariscos, tendo resultado na melhor eficácia do ágar CPC. A comprovação das colônias positivas nesses meios, com anticorpos monoclonais e biologia molecular através de genes específicos, assim como por métodos taxonômicos, mostrou que a quantidade de colônias confirmadas como *V. vulnificus*, a partir do CPC, foi aproximadamente o dobro em comparação com TCBS, enquanto nenhuma colônia foi positiva no ágar SDS.

Arias et al. (1998) compararam métodos de enriquecimento e de cultivo usando TCBS e CPC para pesquisa de *V. vulnificus* e concluíram que a melhor eficácia se deu pelo enriquecimento em APA com 3% NaCl por 3h a 40°C seguido de cultivo em ágar CPC.

Froelich, Weiss e Noble (2014) avaliaram a eficácia de meios de cultivo para isolamento e enumeração de *V. vulnificus*. Os meios estudados foram o CAV, o CPC+ e o VVX, além do método de plaqueamento triplo descrito anteriormente. Nenhum dos meios requer enriquecimento da amostra antes do plaqueamento, o que representa uma vantagem já que torna o diagnóstico mais rápido. Neste estudo, após o plaqueamento, todos os meios foram incubados a 37°C por 24h e todas as colônias possivelmente positivas foram inoculadas em todos os meios, além do TCBS e do plaqueamento triplo. Segundo os autores, nenhum dos meios foi exato o suficiente para medir a concentração exata de *V. vulnificus* em ostras. Cada um deles apresentou vantagens e desvantagens. O meio CPC+ foi o menos preciso, mas foi o único que identificou todas as amostras de cepas do genótipo *vcgC* das amostras, enquanto os demais identificaram apenas 29% destas cepas. Os resultados obtidos por Froelich, Weiss e Noble (2014) diferem deste estudo uma vez que CAV e VVX apresentaram as melhores performances (74 e 81%, respectivamente), em comparação ao CPC+. O meio VVX foi o mais sensível e o segundo mais seletivo neste estudo,

fazendo dele o de melhor performance, além de ser mais econômico em comparação com o CAV. Por outro lado, o meio VVX precisa passar por etapas de pré-preparo com mistura de outros ingredientes enquanto o CAV precisa de apenas alguns minutos para ser preparado (FROELICH; WEISS; NOBLE, 2014).

Na análise da performance dos meios usando cepas puras de *V. vulnificus* de genótipos conhecidos *vcgC* e *vcgE*, o meio VVX apresentou o maior percentual de recuperação e crescimento bacteriano para o genótipo *vcgC* e para *V. vulnificus* total, mas sem diferença estatística significativa ao ser comparado com os meios SDS, CAV, CPC+ e HI. Desta forma, considerando-se *V. vulnificus* total, ambos os meios apresentaram performance satisfatória.

O meio TCBS apresentou o pior percentual de crescimento bacteriano para *V. vulnificus* total e especialmente considerando o genótipo *vcgC*, o que o torna não recomendável para uso em diagnóstico de casos de infecção humana onde há prevalência deste genótipo de *V. vulnificus*.

Com relação à avaliação da performance dos meios para isolamento e enumeração de *V. vulnificus* em amostras ambientais, observa-se que o TCBS apresentou a maior diferença entre a contagem presumida e a confirmação por PCR, o que se explica pelo fato deste não ser um meio seletivo para *V. vulnificus* uma vez que não o diferencia de outras espécies.

O meio SDS, mesmo sendo seletivo para *V. vulnificus* apresentou 21% de resultados falsos positivos que foram identificados como *V. parahaemolyticus*. Resultados falso positivos também foram encontrados nos meios VVX (8%) e CAV (5%). O meio CPC+ apresentou a melhor performance quando usado para isolamento e enumeração de *V. vulnificus* em amostras ambientais, com 73,68% de colônias típicas confirmadas como *V. vulnificus* e nenhum resultado falso positivo.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os meios seletivos SDS, VVX, CAV e CPC+ apresentaram performance razoável e bastante similar quando analisadas as cepas puras. Já o ágar TCBS apresentou melhor percentual de crescimento bacteriano para *V. vulnificus* cepa *vcgE* que a *vcgC*, sendo mais recomendável para o uso com amostras ambientais.

Os meios SDS, VVX e CAV, apesar de serem seletivos para *V. vulnificus*, apresentaram resultados falso positivos quando analisadas

amostras ambientais de ostras e água do mar. O meio CPC+, não apresentou falsos positivos, mas não houve crescimento de cepa *vcgC*. Com relação às amostras ambientais, o meio CPC+, mesmo não tendo apresentado as maiores contagens de colônias típicas e confirmadas, apresentou melhor performance pelo fato de não apresentar falsos positivos.

Não há nenhum meio com performance suficiente para ser usado isoladamente, o uso de meios combinados e a confirmação por PCR são necessários para confiabilidade do resultado. Assim, este estudo conclui que para a detecção e enumeração de *V. vulnificus* em amostras de casos clínicos, os meios seletivos SDS, VVX, CAV ou CPC+ podem ser utilizados, mas a confirmação por PCR é fundamental para a certeza do diagnóstico e definição do tratamento mais adequado.

REFERÊNCIAS

- ARIAS, C. R. et al. A comparison of strategies for the detection and recovery of *Vibrio vulnificus* from marine samples of the western Mediterranean coast. **Systematic and applied microbiology**, v. 21, n. 1, p. 128–34, 1998.
- BAKER-AUSTIN, C. et al. *pilF* polymorphism-based real-time PCR to distinguish *Vibrio vulnificus* strains of human health relevance. **Food microbiology**, v. 30, n. 1, p. 17–23, maio 2012.
- BIER, N. et al. Genotypic diversity and virulence characteristics of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates from the Baltic Sea region. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3570–81, jun. 2013.
- BRAYTON, P. R. et al. New selective plating medium for isolation of *Vibrio vulnificus* biogroup 1. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 1039–1044, 1983.
- CERDÀ-CUÉLLAR, M.; JOFRE, J.; BLANCH, A R. A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 2, p. 855–9, fev. 2000.
- CRUZ, C. D. D.; WIN, J. K. K.; FLETCHER, G. C. C. An improved method for quantification of *Vibrio vulnificus* in oysters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 3, p. 397–399, 2013.
- DUPUY, C. et al. Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a

natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon.

Marine Ecology Progress Series, v. 205, n. 171, p. 171–184, 2000.

FROELICH, B. A. et al. Development of a matrix tool for the prediction of *Vibrio* species in oysters harvested from North Carolina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 1111–1119, 2015.

FROELICH, B. A.; OLIVER, J. D. The interactions of *Vibrio vulnificus* and the oyster *Crassostrea virginica*. **Microb Ecol**, v. 65, n. 4, p. 807–816, maio 2013.

FROELICH, B. A.; WEISS, M. J.; NOBLE, R. T. The evaluation of four recent culture-based methods for the isolation and enumeration of *Vibrio vulnificus* bacteria from oyster meat. **Journal of microbiological methods**, v. 97, n. 1, p. 1–5, fev. 2014.

FROELICH, B.; AYRAPETYAN, M.; OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus* integration in marine aggregates and subsequent uptake by the oyster *Crassostrea virginica*. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 79, p. 1454–1458, 2013.

GRIFFITT, K. J.; GRIMES, D. J. A novel agar formulation for isolation and direct enumeration of *Vibrio vulnificus* from oyster tissue. **Journal of microbiological methods**, v. 94, n. 2, p. 98–102, ago. 2013.

GUGLIANDOLO, C. et al. Conventional and molecular methods to detect bacterial pathogens in mussels. **Letters in applied microbiology**, v. 52, n. 1, p. 15–21, 2011.

HARDY DIAGNOSTICS. **HardyChrom**. Disponível em:

<https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/HardyCHROMVibrio.html>. Acesso em: 12 out. 2015.

HARWOOD, V. J.; GANDHI, J. P.; WRIGHT, A. C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. **Journal of microbiological methods**, v. 59, n. 3, p. 301–16, dez. 2004.

HØI, L. et al. Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 5, 1997.

HØI, L.; DALSGAARD, I.; DALSGAARD, A. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1721–4, 1998.

ISO. **ISO/TS 21872-2:2007(E): Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. — Part 2: Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae***. Geneva: ISO, 2007.

JONES, J. L. et al. Comparison of plating media for recovery of total and virulent genotypes of *Vibrio vulnificus* in U.S. market oysters. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 3, p. 322–7, 1 nov. 2013.

JONES, M. K.; OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 77, n. 5, p. 1723–33, maio 2009.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, A. Chapter 9 - *Vibrio*. In: **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. Silver Spring: USFDA, 2004. v. 139p. 1–25.

KITAURA, T. et al. Halo production by sulfatase activity in *V. vulnificus* and *V. cholerae* O1 on a new selective sodium dodecyl sulfate containing agar medium: a screening marker in environmental surveillance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 17, p. 205–209, 1983.

KOBAYASHI, T. et al. A new selective isolation medium for vibrio group on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). **Jpn. J. Bacteriol.**, v. 18, p. 387–392, 1963.

MASSAD, G.; OLIVER, J. D. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, p. 2262–2264, 1987.

MICELI, G. A.; WATKINS, W. D.; RIPPEY, S. R. Direct plating procedure for enumerating *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 3519–3524, 1993.

MIZUTA, D. D. **Contribuição do estudo oceanográfico para a produção comercial de ostras *Crassostrea gigas*: estudo de caso da Baía Sul, Ilha de Santa Catarina, SC**. São Paulo: Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2010.

OLIVER, J. D. et al. Use of colistin-polymyxin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 2, p. 737–9, 1992.

OLIVER, J. D. The viable but non-culturable state in the human

pathogen *Vibrio vulnificus*. **FEMS microbiology letters**, v. 133, n. 3, p. 203–208, 1995.

OLIVER, J. D. Chapter 17 - Culture media for the isolation of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. In: CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. (Eds.). . **Handbook of Culture Media for Food Microbiology**. 2nd. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 249–269.

OLIVER, J. D. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 3, p. 383–391, jun. 2005.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In: F. L. THOMPSON; B. AUSTIN; J. SWINGS (Eds.). . **The Biology of Vibrios**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2006. p. 349–366.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 793–9, maio 2013.

PANICKER, G.; MYERS, M. L.; BEJ, A. K. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by Real-Time PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 498–507, 2004.

ROSCHKE, T. M.; YANO, Y.; OLIVER, J. D. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 4, p. 381–9, jan. 2005.

SILVA, M. A. C. DA. **Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de moluscos e água de áreas de cultivo de Santa Catarina**. Itajaí: Dissertação de Mestrado. UNIVALI, 2003.

TAMPLIN, M. L. et al. Enzyme immuno assay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1235–1240, 1991.

THOMPSON, F. L. et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 9, p. 5107–5115, 2005.

WARNER, E. B.; OLIVER, J. D. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p.

80–85, 2008a.

WARNER, E. B.; OLIVER, J. D. Multiplex PCR assay for detection and simultaneous differentiation of genotypes of *Vibrio vulnificus* biotype 1. **Foodborne pathogens and disease**, v. 5, n. 5, p. 691–693, 2008b.

WARNER, E.; OLIVER, J. D. Refined medium for direct isolation of *Vibrio vulnificus* from oyster tissue and seawater. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 9, p. 3098–100, maio 2007.

WILLIAMS, T. C.; FROELICH, B. A.; OLIVER, J. D. A new culture-based method for the improved identification of *Vibrio vulnificus* from environmental samples, reducing the need for molecular confirmation. **Journal of microbiological methods**, v. 93, n. 3, p. 277–83, jun. 2013.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *V. VULNIFICUS* COLETADOS DE OSTRAS (*C. GIGAS*) CULTIVADAS EM SANTA CATARINA

4.1. INTRODUÇÃO

Vibrio vulnificus é um bacilo halofílico, móvel, Gram-negativo, não formador de esporos e capaz de ocasionar uma infecção grave em indivíduos suscetíveis (JONES; OLIVER, 2009). Os sintomas da doença podem variar desde uma gastroenterite até uma septicemia primária e fasciíte necrosante, com uma taxa de mortalidade superior a 50% nos casos de septicemia. A infecção resulta do consumo ou manipulação de alimentos de origem marinha onde a bactéria esteja presente ou pela exposição de ferimentos ou lesões de pele à água do mar (HORSEMAN; SURANI, 2011; IGBINOSA; OKOH, 2008; OLIVER, 2006).

A bactéria pode ser encontrada em ambientes marinhos costeiros ou estuários onde a temperatura varia entre 9 a 31°C, sendo que a temperatura ótima é de 18°C e salinidade entre 15 a 25 ‰ (FROELICH; NOBLE, 2015; FROELICH et al., 2015). Estudos de Horseman e Surani (2011) indicam que a salinidade acima de 30 ‰ pode reduzir a incidência de *V. vulnificus* independentemente da temperatura da água.

A identificação genotípica do gênero *Vibrio* pode ser feita pelo gene *rpoA* (DALMASSO et al., 2009; THOMPSON et al., 2005). E a confirmação de *V. vulnificus* total pode ser feita pela detecção do gene hemolisina/citolisina *vvhA*, que tem sido aceita como o método padrão (JONES; OLIVER, 2009; KAYSNER; DEPAOLA, 2004; OLIVER, 2013; ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005; WARNER; OLIVER, 2008a). Entretanto, o gene *vvhA* identifica a espécie *V. vulnificus*, mas não caracteriza a potencial patogenicidade (WARNER; OLIVER, 2008a). São conhecidos três biotipos de *V. vulnificus* responsáveis por causar doenças em seres humanos. O biotipo 1, de maior importância para a saúde pública, pode ser classificado geneticamente em duas cepas, aquelas isoladas geralmente de casos clínicos, identificadas como tipo C, por apresentarem o gene *vcgC*, e as relacionadas ao meio ambiente, identificadas como tipo E, identificadas pelo gene *vcgE* (HORSEMAN; SURANI, 2011; JONES; OLIVER, 2009; ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005; WARNER; OLIVER, 2008a). Esta identificação genotípica de cepas de *V. vulnificus* tem sido correlacionada com o isolamento em amostras clínicas ou ambientais, sendo que 90% das amostras clínicas possuem a sequência *vcgC* e 87%

das amostras isoladas do ambiente possuem a variação *vcgE* (JONES; OLIVER, 2009; ROSCHE; YANO; OLIVER, 2005; WARNER; OLIVER, 2008a).

Apesar da alta incidência de doença causada por *V. vulnificus* nos EUA, e aumentando a cada ano (CRIM et al., 2014), no Brasil, onde estudos indicam a presença de *V. vulnificus* na água do mar e em alimentos de origem marinha em toda a costa (BARROS et al., 2003; GARCIA-MORENO; LANDGRAF, 1997; MATTÉ et al., 1994; MENDES et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2001; OLIVA, 2012), existem apenas quatro casos relatados de infecção por *V. vulnificus*, e todos resultaram em morte dos pacientes (BRACK et al., 2004; DE ARAUJO et al., 2007; FRANÇA et al., 2013).

No estado de Santa Catarina, onde são produzidas 98% das ostras produzidas no Brasil (IBGE, 2013), há estudos que relatam a presença de *V. vulnificus* em água do mar e em ostras e mexilhões (RAMOS, 2007, 2012; RAMOS et al., 2012, 2014; SILVA, 2003). Oliva (2012) utilizou o gene *vvhA* para confirmação da espécie em mexilhões coletados no estado do Rio de Janeiro, entretanto, até o momento, nenhum estudo havia realizado a identificação genotípica de *V. vulnificus* nas amostras no Brasil, para detecção do gene *vcg*, indicador de potencial patogenicidade.

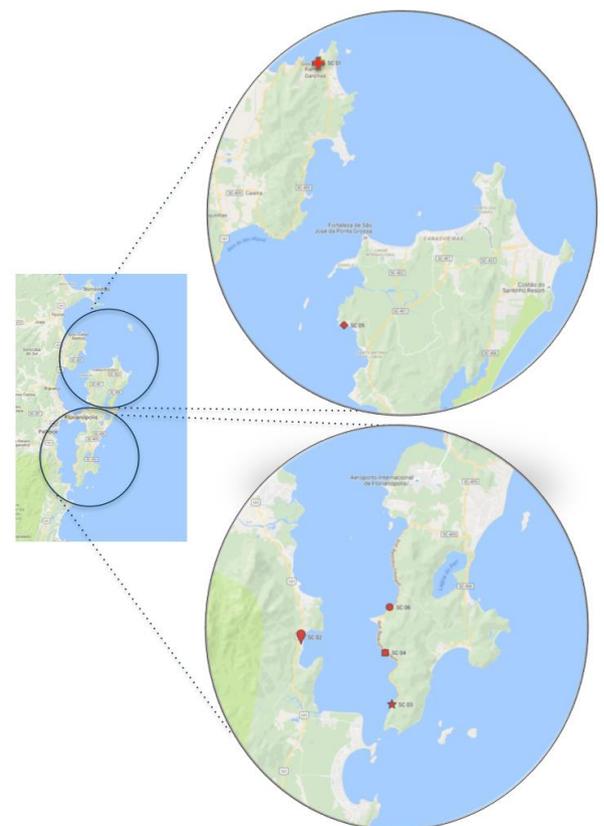
Assim, o objetivo deste estudo foi analisar amostras de colônias típicas de *V. vulnificus*, coletadas de ostras (*Crassostrea gigas*), produzidas no litoral de Santa Catarina, entre os meses de outubro de 2014 a janeiro de 2015, para verificar a presença de cepas potencialmente patogênicas com base na detecção do gene *vcg*, por meio de PCR. O estudo também analisou a possível relação entre parâmetros ambientais como a salinidade e a temperatura da superfície da água e a presença de *V. vulnificus*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Área de estudo

A coleta de ostras para este estudo foram realizadas em áreas costeiras de maior produção do litoral de Santa Catarina, Brasil, indicadas na Figura 4.1.

Figura 4.1 Áreas de coleta de ostras para pesquisa de *V. vulnificus* em ostras, Santa Catarina, Brasil.



Fonte: Desenvolvido pela autora. Google MyMaps. 15 dez 2015.

As coordenadas geográficas dos pontos identificados são apresentadas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de ostras

Pontos de coleta	Coordenadas geográficas (latitude e longitude)
A (SC 02)	-27°78'13'', -48°62'22''
B (SC 01)	-27°30'75'', -48°55'90''
C (SC 04)	-27°80'51'', -48°56'65''
D (SC 05)	-27°49'14'', -48°53'74''
E (SC 06)	-27°75'40'', -48°57'18''
F (SC 03)	-27°81'44'', -48°56'54''

Fonte: Google MyMaps.

4.2.2. Coleta de ostras

Foram coletadas amostras de ostras (*C. gigas*) em seis locais de produção no litoral de Santa Catarina, quinzenalmente, de outubro de 2014 a janeiro de 2015, totalizando sete coletas. Cada coleta de amostra, em cada ponto, era composta por dez ostras de tamanho comercial e 1 litro de água do mar. A amostra de água foi utilizada para analisar parâmetros de salinidade.

As ostras foram coletadas nos locais de produção e colocadas em sacos plásticos identificando o local, data e hora da coleta. A água foi coletada em garrafas plásticas, fazendo-se 3 enxágues antes de completar o volume mínimo de 1 litro. A garrafa foi identificada da mesma forma que as ostras. O material recolhido era mantido e transportado em caixa isotérmica com gelo, sem contato com o mesmo, e levado ao laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LABMICRO, UFSC), sendo analisado no mesmo dia, em média até 4 horas após a coleta.

4.2.3. Coleta de dados de temperatura e salinidade da água do mar

Os dados da temperatura média da superfície da água do mar foram coletados, durante o período de avaliação das amostras de ostras, através do site do *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA): <http://www.noaa.gov/>, que fornece gráficos de temperatura da superfície da água do mar com atualizações diárias coletadas por meio de satélites. A salinidade foi analisada pelo método argentométrico (APHA, 2012), reportado em partes por mil (‰). Os dados de

acumulado pluviométrico nos três dias anteriores à coleta das ostras foram obtidos a partir da informação disponível no *website* do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (<http://www.inmet.gov.br>).

4.2.4. Preparo dos meios de cultivo

Os meios de cultivo usados foram o ágar tiossilfato, citrato, biliar e sacarose (TCBS) e o ágar *Vibrio vulnificus* X-Gal (V VX) (GRIFFITT; GRIMES, 2013). O meio V VX foi proposto por Griffitt e Grimes (2013) e não requer etapa prévia de enriquecimento da amostra. É um meio seletivo para *V. vulnificus* cujas colônias aparecem de coloração azul brilhante pela fermentação de uma substância cromogênica análoga à lactose, o 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal), que é utilizado como fonte carbono pela bactéria.

O preparo do meio de cultivo V VX é feito a partir de 3 soluções. A solução 1 é preparada com extrato de levedura (4 g), NaCl (10 g), MgCl₂ * 6 H₂O (3,6 g), KCl (4 g) em 900 mL de água destilada. O pH é ajustado para 8,5 e são adicionadas 15 g de ágar. A solução é autoclavada por 20 minutos. A solução 2 contém D-celobiose (5 g), lactose * H₂O (0,105 g), colistina metassulfonato (1 x 10⁵ unidades) e polimixina B (1 x 10⁵ unidades) dissolvidos em 100 mL de água destilada. A solução 2 é esterilizada por filtração a vácuo em seringa (0,2 μ m) e adicionada à solução 1 que foi esfriada a 55 a 60°C. Finalmente é preparada a solução 3 que contém 20 mg de X-Gal por mL de dimetil sulfóxido (DMSO), (CH₃)₂SO. Esta solução pode ser previamente preparada e mantida sob refrigeração e protegida da luz. O volume da solução 3 a ser adicionado é 2 mL/L.

4.2.5. Preparo das amostras

As ostras coletadas foram lavadas com escova sob água potável corrente e colocadas em bandeja plástica previamente higienizada e aspergidas com etanol 70°GL. Cada amostra foi preparada a partir de cinco unidades de ostras, que foram abertas com faca apropriada, limpa e lavada em etanol a 70°GL e depois enxaguada em água destilada. As ostras foram retiradas das valvas, desprezando-se o líquido intervalvar, e colocadas em bandejas de poliestireno para pesagem. As amostras foram drenadas, pesadas, diluídas em tampão fosfato salino (PBS) na proporção de 1:1 (peso:volume) e homogêneas em triturador elétrico.

Depois de homogeneizadas, as amostras foram diluídas mais uma vez, a 1:10 em PBS, resultando em diluição final 1:20 e ambas diluições foram plaqueadas em meios de cultivo TCBS e VVX, em duplicata, sendo adicionado 100µL da amostra em cada placa e espalhados com alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas, a 37°C por 18 a 24h.

Após a incubação, foi feita a contagem das colônias típicas nas placas de TCBS (para contagem de *Vibrio* total) e de VVX (contagem de *V. vulnificus* presumidas). Das placas de VVX com crescimento de colônias azuis típicas, foram coletadas, com auxílio de alça microbiológica descartável estéril, cinco colônias de cada placa ou todas, quando havia menos que cinco na placa. Estas colônias foram inoculadas individualmente em microtubos com 100 µL de caldo *Heart Infusion* (HI) estéril em temperatura ambiente (23°C) durante 18 a 24 horas. Em seguida as amostras foram fervidas por 10 min e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos para extração do DNA. As amostras de DNA foram então mantidas congeladas (-20°C), sendo posteriormente liofilizadas e enviadas para o laboratório do *Institute of Marine Science / University of North Carolina (IMS/UNC)* em Morehead City, NC, EUA, onde foram realizadas as análises de reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.2.6. Metodologia de PCR

As amostras de DNA coletadas a partir das placas de VVX foram analisadas através da metodologia de PCR para detecção do gene *rpoA* (DALMASSO et al., 2009; THOMPSON et al., 2005), com o objetivo de identificar o gênero *Vibrio*. As amostras também foram analisadas quanto à presença dos genes *vcgE* e *vcgC* (WARNER; OLIVER, 2008b). Os protocolos e *primers* usados estão descritos no Quadro 4.2.

Quadro 4.2 Protocolos e *primers* usados nas reações de PCR para identificação de *Vibrio* sp e identificação de cepas de *V. vulnificus* nas amostras de ostras

Alvo	<i>Primers</i>	Protocolo PCR	Referências
<i>Vibrio</i> sp.	<i>ipoA</i> -F 5'AAAT-CAGGCTCGGGCCCT-3'	1 ciclo: 3 min a 94°C 35 ciclos: 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/1 min 1 ciclo: 72°C/5 min	Dalmasso et al. (2009)
	<i>ipoA</i> -R 5'GCAATTTT(A/ G)TC(A/G/T)AC(C/T)GG3'		
<i>V. vulnificus</i>	<i>vvgC</i> -F 5'AGCTGCCGATAGCGATCT3'	1 ciclo: 3 min a 94°C 30 ciclos: 94°C/45 seg, 55°C/45 seg, 72°C/45 seg 1 ciclo: 72°C/2 min	Warner; Oliver (2008b)
	<i>vvgC</i> -R 5'TGAGCTAACGCGAGTAGTGAG3'		
	<i>vvgE</i> -F 5'CTCAGAAAAGGCTCAATTGAC3'		
	<i>vvgE</i> -R 5'GATTAACGCTGTAAGGCCCG3'		

Ambas reações de PCR foram preparadas usando GoTaq Green 2x (Promega, Madison, WI) em um termociclador Px2E (ThermoScientific, Waltham, MA). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese (Fischer Scientific FB300, EUA), ajustado para 140 V durante 25 min, em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio a 0,1% e observados sob luz UV (UVP PhotoDoc-It™ Imaging system, Photo/Prep®II, Fotodyne). Em ambos casos foram usados padrões positivos e negativos de cepas padrão pertencentes ao IMS/UNC para garantir a confiabilidade dos resultados. Os padrões positivos de *V. vulnificus* foram as cepas M06 e JY1701, com os genes *vcgC* e *vcgE*, respectivamente. Para a PCR do gene *rpoA* foram usadas as mesmas cepas de *V. vulnificus* citadas, além de *V. alginolyticus* (22.08.78) e uma cepa de *V. furnisii* (NHL). Os padrões negativos foram água *nuclease free*.

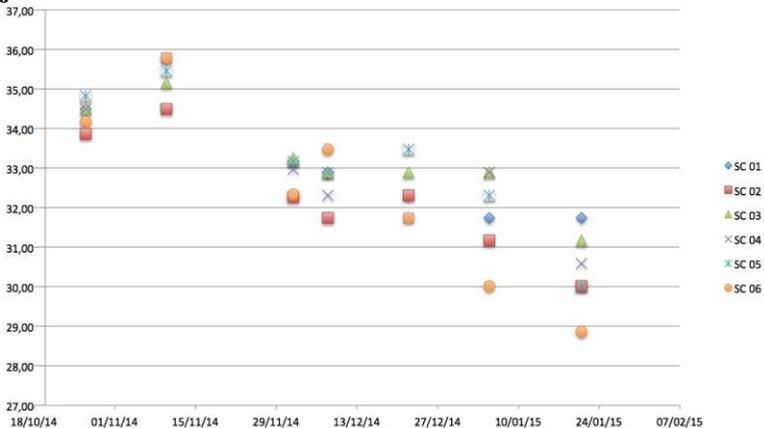
4.2.7. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística de correlação (r), regressão linear e ANOVA, através do *software* Prism 6 for Mac OS X, versão 6.0h (Graphpad Software Inc.), adotando-se $p < 0,05$.

4.2.8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

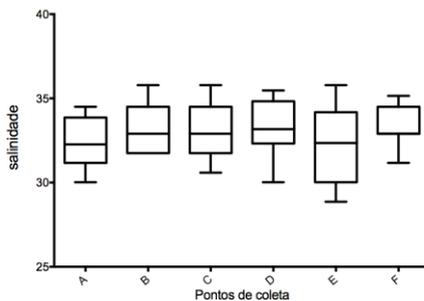
A análise da salinidade entre os pontos de coleta não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$). A apresenta a variação da salinidade por ponto de coleta. O mesmo resultado de ausência de diferença de salinidade entre os pontos foi encontrado por Ramos (2012), no litoral de Santa Catarina.

Figura 4.2 Salinidade (%) nos pontos de coleta de out/2014 a jan/2015.



A Figura 4.3 **Error! Reference source not found.** apresenta a variação da salinidade durante o período de coleta nos pontos. Os resultados observados indicam uma salinidade alta quando comparada com os resultados de Ristori et a. (2007) que obteve valores entre 16 e 21% em medições realizadas no estuário Ariri, no Paraná, entre os meses de outubro a janeiro.

Figura 4.3 Análise da variação da salinidade (%), média e erro padrão da média, por pontos de coleta.



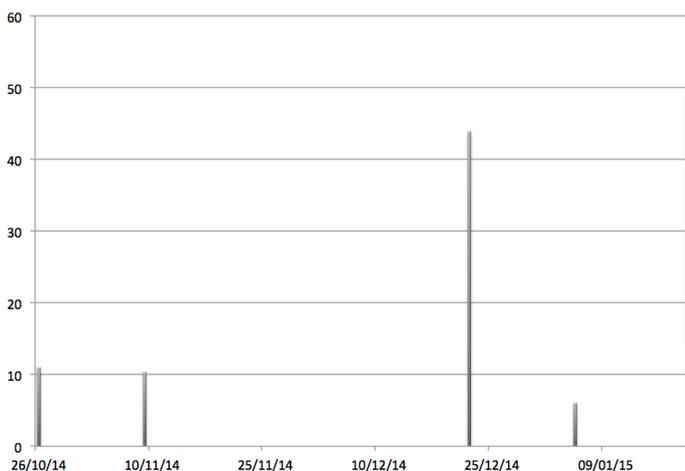
A Tabela 4.1 apresenta os valores médios de salinidade e desvio padrão por ponto de coleta.

Tabela 4.1 Valores médios de salinidade e desvio padrão por ponto de coleta

	Pontos de coleta					
	A	B	C	D	E	F
salinidade média (‰)	32,27	33,17	32,98	33,17	32,35	33,25
erro padrão da média	0,5783	0,5661	0,6523	0,6701	0,9054	0,4847

Outro fator ambiental analisado foi o acumulado pluviométrico nos três dias anteriores à coleta. Esta medição teve como objetivo avaliar o impacto do volume de chuvas na salinidade nas áreas de coleta. A Figura 4.4 apresenta a variação da precipitação durante o período de coleta. A coleta de dados de precipitação refere-se às medições da estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada em São José, SC (Latitude: -27.602530°, Longitude: -48.620096°, altitude: 5 metros), assim os dados coletados não se referem aos pontos específicos de coleta das ostras, por não existir outros equipamentos, havendo apenas um na região da grande Florianópolis.

Figura 4.4 Acumulado pluviométrico (mm) nos 3 dias anteriores à coleta de amostras entre out/2014 a jan/2015.

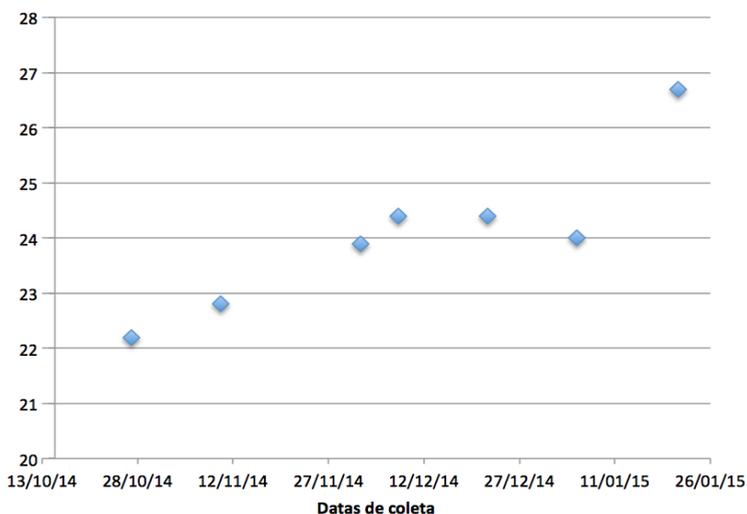


A análise estatística dos dados de acumulado pluviométrico indicou uma fraca correlação entre este parâmetro e a salinidade no período de estudo, mesmo considerando-se valores próximos a 40 mm, como constatado em duas datas de coleta, a salinidade não foi afetada ($r=0,22$).

A temperatura da água do mar por data de coleta está apresentada na Figura 4.5. Os dados coletados apresentaram uniformidade em todos os pontos, ou seja, a mesma temperatura foi observada nas datas de coleta em cada ponto de amostragem.

O acumulado pluviométrico apresentou média correlação ($r=0,40$) com a temperatura da água nos pontos de coleta.

Figura 4.5 Temperatura superficial da água do mar nos pontos de coleta de out/2014 a jan/2015.



As contagens bacterianas não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os pontos de coleta por data, assim, os resultados das contagens bacterianas em meios de cultivo e sua posterior confirmação por PCR foram analisadas como um único grupo de dados.

O meio TCBS tem pH alcalino (8,6), sais biliares e NaCl (1%) para inibir o crescimento de outras bactérias como membros da família

Enterobacteriaceae, o gênero *Pseudomonas* e bactérias Gram-positivas. É bastante usado no isolamento de *Vibrio* spp. de amostras ambientais e também para diferenciar *V. cholerae* de *V. parahaemolyticus* e de *V. vulnificus* com base na fermentação de sacarose pelo *V. cholerae* (HARWOOD; GANDHI; WRIGHT, 2004). Entretanto o TCBS não diferencia *V. vulnificus* de *V. parahaemolyticus* ou *V. mimicus*. As colônias destes três gêneros, que não fermentam sacarose, aparecem redondas, verdes e com 2 a 3 mm de diâmetro no TCBS, sendo necessários outros métodos para confirmação da espécie, como o uso de testes bioquímicos ou moleculares (KAYSNER; DEPAOLA, 2004). O meio TCBS não é normalmente usado como método principal para identificação de *V. vulnificus* (WILLIAMS; FROELICH; OLIVER, 2013) mas para contagem total de *Vibrio*. Segundo Oliver (2003), a grande desvantagem do meio TCBS é sua pouca seletividade entre as espécies de *Vibrio* e o fato de que vários micro-organismos não *Vibrio* também podem crescer neste meio. Justifica-se o uso de TCBS quando estão sendo pesquisados *Vibrio* spp., mas o que se observa, pelos relatos de vários autores como Williams, Froelich e Oliver (2013), Jones et al. (2013), e Harwood, Gandhi e Wright (2004), Oliver (2003) e Arias et al. (1998), é que quando o objetivo é estudar apenas a presença de *V. vulnificus*, há outros meios mais eficientes para serem usados em substituição ao TCBS. O preparo do meio TCBS foi realizado conforme orientações do fabricante.

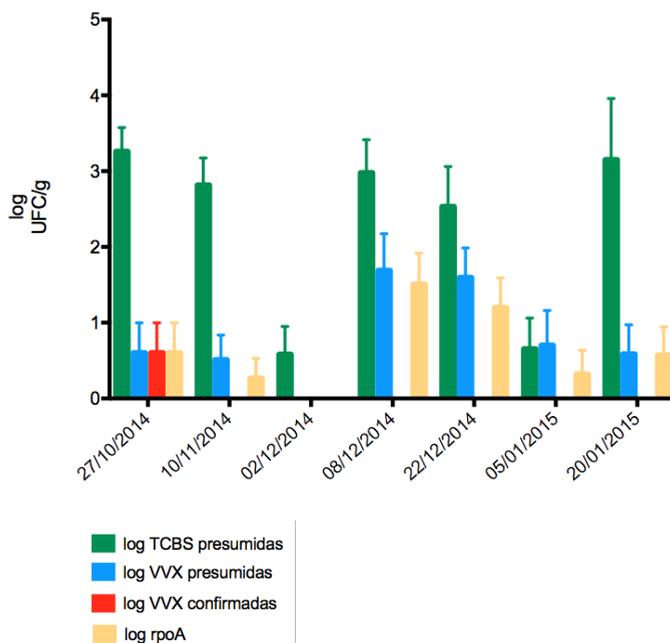
Além dos dados de contagem em placas de TCBS e VVX, foram coletadas 50 colônias morfológicamente típicas de *V. vulnificus* nas placas de VVX. Estas colônias foram tratadas conforme descrito no item de metodologia e analisadas para confirmação por PCR no IMS/UNC. As 59 amostras foram analisadas quanto à presença do gene *rpoA*, específico para o gênero *Vibrio*, resultando em 24 positivas para o gênero. Com relação à detecção do gene *vcg*, uma delas foi confirmada como positiva para o gene *vcgC* e uma foi positiva para o *vcgE*. As amostras positivas foram coletadas na mesma data, mas em pontos de coleta diferentes.

A Figura 4.6 apresenta os resultados de contagem em TCBS, VVX, e os resultados da confirmação por PCR tanto para *Vibrio* total (*rpoA*) como para a identificação de cepas de *V. vulnificus* pelos genes *vcgC* e *vcgE*.

Motes et al. (1998) analisaram o efeito da salinidade e da temperatura em ostras (*C. virginica*) na costa atlântica e do golfo dos EUA e encontraram valores menores de *V. vulnificus* em regiões com salinidade acima de 28‰ e temperatura da água acima de 26°C. Outro

estudo realizado por Motes e DePaola (1996) demonstraram a redução de *V. vulnificus* em ostras com contagens iniciais de 14.019 NMP/g a 1.991 NMP/g que foram reduzidas valores <10 NMP/g após até 17 dias expostas a salinidade acima de 32‰. O efeito da salinidade na população de *V. vulnificus* poderia explicar as baixas contagens encontradas no litoral de Santa Catarina pelo presente estudo e por Ramos et al. (2014) que relatou, em ostras, valores de 0,1 a 1,5 \log_{10} NMP/g e valores médios de salinidade entre 30,7 a 33,9‰. Entretanto, no estudo de Chase e Harwood (2011), comparando o efeito de parâmetros ambientais sobre os biotipos de *V. vulnificus*, indicou que o biotipo I, responsável pelos casos de infecção humana foi menos afetado pela salinidade que os demais biotipos, o que indica que este biotipo possa ser mais bem adaptado a condições ambientais adversas. Assim como a maior suscetibilidade dos biotipos 2 e 3 possam explicar sua especificidade de hospedeiros ou sua limitada distribuição geográfica.

Figura 4.6 Contagem log UFC/g e confirmação por PCR das amostras coletas em Santa Catarina (out/2014 a jan/2015) (média e erro padrão da média)



As análises de correlação (r Pearson) e de regressão linear apresentaram correlação fraca a média entre cada um dos parâmetros ambientais e as contagens bacterianas, tanto em meio de cultivo quanto a presença de *V. vulnificus* confirmada por PCR. No estudo de Ramos (2012), houve correlação positiva entre as contagens de *V. vulnificus* e a temperatura da água do mar, o que pode ser devido a um maior intervalo de coleta e análise de dados.

Outros estudos, no hemisfério norte, em regiões onde a salinidade média é inferior aos valores encontrados no litoral do Brasil, foi constatada uma maior concentração de *V. vulnificus* quando a água do mar estava acima de 20°C e salinidade entre 15 e 25‰ (HØI et al., 1997; KASPAR; TAMPLIN, 1993; STROM; PARANJPYE, 2000). Os estudos realizados no hemisfério norte, por Motes et al. (1998), na Costa do Golfo, indicaram redução na contagem de *V. vulnificus* em condições de alta salinidade (acima de 30‰). Entretanto, os autores não conseguiram confirmar uma relação clara entre salinidade e *V. vulnificus* uma vez que a alta salinidade permanece por pequenos intervalos de tempo na região, não sendo possível um estudo de mais longo prazo nestas condições. No estudo de Froelich et al. (2012), na costa do Atlântico norte, nos EUA, os autores encontraram uma redução da bactéria em condições de alta salinidade. resultados semelhantes foram relatados por outros autores, estimando que 25‰ seja o máximo de salinidade tolerado por *V. vulnificus* (BLACKWELL; OLIVER, 2008; JONES; OLIVER, 2009; MOTES; DEPAOLA, 1996; MOTES et al., 1998). Novamente, é importante destacar que a salinidade no hemisfério sul encontra-se, em média, bem acima destes valores, o que pode explicar a baixa incidência da bactéria na região de estudo.

Os resultados das contagens em placa e das confirmações por PCR não apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de *Tukey*, comparação múltipla ($p > 0,05$) quando considerados os valores totais no período de coleta. Entretanto, analisando por dia de coleta, foram encontradas diferenças significativas entre os meios. Os detalhes são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Resultados das contagens em placa e PCR: valor médio de log UFC/g em cada data de coleta (média \pm erro padrão da média)

	27/10/14	10/11/14	02/12/14	08/12/14	22/12/14	05/01/15	20/01/15
TCBS	3,257 \pm 0,317 ^a	2,813 \pm 0,359 ^a	0,58 \pm 0,369 ^a	2,976 \pm 0,44 ^a	2,529 \pm 0,532 ^a	0,65 \pm 0,411 ^a	3,148 \pm 0,811 ^a
VVX presum	0,60 \pm 0,401 ^b	0,509 \pm 0,328 ^b	0,00 ^a	1,687 \pm 0,488 ^b	1,594 \pm 0,391 ^b	0,70 \pm 0,461 ^a	0,585 \pm 0,388 ^b
VVX confirm	0,60 \pm 0,401 ^b	0 ^b	0 ^a	0 ^c	0 ^c	0 ^a	0 ^b
<i>tpoA</i>	0,60 \pm 0,401 ^{ab}	0,265 \pm 0,265 ^b	0 ^a	1,504 \pm 0,413 ^{b,d}	1,196 \pm 0,396 ^{b,d}	0,317 \pm 0,317 ^a	0,569 \pm 0,374 ^b

Valores estatisticamente diferentes em cada dia de coleta apresentam sub índices (letras) diferentes ($p > 0,05$), 2 way ANOVA, teste de Tukey.

A análise estatística não apresentou nenhuma relação entre as as contagens bacterianas e os parâmetros ambientais.

Com relação às colônias que cresceram no meio VVX e que não foram confirmadas como *V. vulnificus* pela metodologia PCR mas que foram confirmadas pelo gene *rpoA*, sabe-se que outras espécies de vibrios fermentadores de lactose como *V. mimicus*, *V. cholerae* e *V. fluvialis* poderiam crescer no meio, uma vez que este apresenta composição adequada para o desenvolvimento destas espécies. Entretanto, a presença de inibidores faz com que as colônias sejam menores e o tempo de desenvolvimento maior que o necessário para *V. vulnificus*. Além disso, segundo Griffit e Grimes (2013), as colônias de *V. mimicus*, ainda que apareçam, são bem menores que as de *V. vulnificus*. Neste estudo não foi possível identificar as espécies de colônias confirmadas por *rpoA*, sabe-se apenas que são fermentadoras de lactose pela característica da colônia nos meio VVX.

A confirmação de *V. vulnificus* no litoral de Santa Catarina é um fato importante uma vez que na região de estudo está a maior produção de moluscos bivalves do Brasil e que foi confirmada a presença da cepa potencialmente patogênica. Por outro lado, o monitoramento oficial do Programa Nacional de Controle Nacional de Moluscos Bivalves (PNCMB) não inclui a análise de vibrios nas áreas de produção e que somente o padrão microbiológico para *V. parahaemolyticus* para alimentos de origem marinha está previsto na RDC 12 (BRASIL, 2001).

4.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças climáticas indicam tendência de alterações nos parâmetros de salinidade e temperatura da água, levando à necessidade de monitoramento contínuo e mais estudos para identificar o efeito destas mudanças na incidência de *V. vulnificus* no litoral de Santa Catarina.

O estudo revelou uma baixa incidência de *V. vulnificus* entre as amostras de ostras (*C. gigas*) produzidas em Santa Catarina durante os meses de outubro/2014 a janeiro/2015, confirmadas por PCR através do gene *vcg*. Esta baixa incidência pode ser explicada pela alta salinidade na região, que ultrapassa os valores de 34‰. Ao mesmo tempo, há questões relevantes que devem ser consideradas e que impedem a afirmação de que o consumo é seguro na região. Em primeiro lugar deve-se considerar que, mesmo tendo se concentrado na época de maior temperatura da água do mar e de maior consumo do molusco, não foi possível realizar um estudo ao longo do ano para avaliar os parâmetros

que possam afetar a presença da bactéria em outras estações climáticas. Assim, recomenda-se a aplicação de tecnologias de processamentos de alimentos como a depuração ou o tratamento térmico das ostras antes do consumo para garantir a segurança deste alimento de origem marinha.

REFERÊNCIAS

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed.** [s.l.: s.n.].

ARIAS, C. R. et al. A comparison of strategies for the detection and recovery of *Vibrio vulnificus* from marine samples of the western Mediterranean coast. **Systematic and applied microbiology**, v. 21, n. 1, p. 128–34, 1998.

BARROS, L. M. DE O. et al. Víbrios sacarose negativos isolados de ostras *Crassostrea rhizophorae* comercializadas em barracas de praia da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Bol. Téc. Cient. Cepnor**, v. 7, n. 1, p. 9–16, 2003.

BLACKWELL, K. D.; OLIVER, J. D. The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina Estuaries. **The Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 146–153, 2008.

BRACK, J. C. et al. Infecção cutânea por *Vibrio vulnificus*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia.**, v. abr/mai/ju, n. 6, 2004.

BRASIL. ANVISA. **Resolução - RDC Nº 12, de 2 de Janeiro de 2001**Anvisa, 2001.

CHASE, E.; HARWOOD, V. J. Comparison of the effects of environmental parameters on growth rates of *Vibrio vulnificus* biotypes I, II, and III by culture and quantitative PCR analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4200–7, jun. 2011.

CRIM, S. M. et al. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 63, n. 15, p. 328–332, 2014.

DALMASSO, A. et al. Development of a PCR assay targeting the *rpoA* gene for the screening of *Vibrio* genus. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 4, p. 317–324, 2009.

ARAUJO, M. R. E. et al. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo,

Brazil: case report and literature review. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 302–5, abr. 2007.

FRANÇA, J. C. B. et al. *Vibrio vulnificus* infection in Southern Brazil - case report. **An Bras Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 424–426, 2013.

FROELICH, B. A. et al. Apparent loss of *Vibrio vulnificus* from North Carolina oysters coincides with a drought-induced increase in salinity. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 11, p. 3885–9, jun. 2012.

FROELICH, B. A. et al. Development of a matrix tool for the prediction of *Vibrio* species in oysters harvested from North Carolina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 1111–1119, 2015.

FROELICH, B. A.; NOBLE, R. T. Improving predictive tools for management of human *Vibrio* diseases from shellfish. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. In review, 2015.

GARCIA-MORENO, M. L.; LANDGRAF, M. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 17, n. 2, p. 177–180, 1997.

GRIFFITT, K. J.; GRIMES, D. J. A novel agar formulation for isolation and direct enumeration of *Vibrio vulnificus* from oyster tissue. **Journal of microbiological methods**, v. 94, n. 2, p. 98–102, ago. 2013.

HARWOOD, V. J.; GANDHI, J. P.; WRIGHT, A. C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. **Journal of microbiological methods**, v. 59, n. 3, p. 301–16, dez. 2004.

HØI, L. et al. Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 5, 1997.

HORSEMAN, M. A.; SURANI, S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. **International journal of infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. e157–66, mar. 2011.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2013**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2013_v4_1_br.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2015.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. **Research in microbiology**, v. 159, n. 7-8, p. 495–506, 2008.

JONES, J. L. et al. Comparison of plating media for recovery of total and virulent genotypes of *Vibrio vulnificus* in U.S. market oysters. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 3, p. 322–7, 1 nov. 2013.

JONES, M. K.; OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 77, n. 5, p. 1723–33, maio 2009.

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

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA, A. Chapter 9 - *Vibrio*. In: **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. Silver Spring: USDA, 2004. v. 139p. 1–25.

MATTÉ, G. R. et al. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 281–287, 1994.

MENDES, E. S. et al. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1191–1199, 2009.

MOTES, M. L. et al. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1459–1465, 1998.

MOTES, M. L.; DEPAOLA, A. Offshore suspension relaying to reduce levels of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3875–3877, 1996.

NASCIMENTO, S. M. et al. *Vibrio vulnificus* as a health hazard for shrimp consumers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 263–266, 2001.

OLIVA, M. S. DE. **Utilização de marcadores fenogenotípicos de virulência na caracterização de *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) em diferentes pontos do litoral do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Tese, Universidade Federal Rural do Rio de

Janeiro, 2012.

OLIVER, J. D. Chapter 17 - Culture media for the isolation of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. In: CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. (Eds.). . **Handbook of Culture Media for Food Microbiology**. 2nd. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 249–269.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*. In: F. L. THOMPSON; B. AUSTIN; J. SWINGS (Eds.). **The Biology of Vibrios**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2006. p. 349–366.

OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 793–9, maio 2013.

RAMOS, R. J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina**. Florianópolis: Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

RAMOS, R. J. ***Vibrio* sp. em ostras e águas de cultivo da Baía Sul de Santa Catarina: ocorrência, caracterização feno e genotípica, suscetibilidade antimicrobiana e depuração**. Florianópolis: Tese. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

RAMOS, R. J. et al. Occurrence of *Vibrio* spp., positive coagulase staphylococci and enteric bacteria in oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in the south bay of Santa Catarina island, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 478–484, 2012.

RAMOS, R. J. et al. Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. May-Jun, p. 327–333, 2014.

RISTORI, C. A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International journal of environmental health research**, v. 17, n. 4, p. 259–269, 2007.

ROSCHE, T. M.; YANO, Y.; OLIVER, J. D. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 4, p. 381–9, jan. 2005.

SILVA, M. A. C. DA. **Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de moluscos e água de áreas de cultivo de Santa Catarina.** Itajaí: Dissertação de Mestrado. UNIVALI, 2003.

STROM, M. S.; PARANJPYE, R. N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 2, p. 177–188, fev. 2000.

THOMPSON, F. L. et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 9, p. 5107–5115, 2005.

WARNER, E. B.; OLIVER, J. D. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 80–85, 2008a.

WARNER, E. B.; OLIVER, J. D. Multiplex PCR assay for detection and simultaneous differentiation of genotypes of *Vibrio vulnificus* biotype 1. **Foodborne pathogens and disease**, v. 5, n. 5, p. 691–693, 2008b.

WILLIAMS, T. C.; FROELICH, B. A.; OLIVER, J. D. A new culture-based method for the improved identification of *Vibrio vulnificus* from environmental samples, reducing the need for molecular confirmation. **Journal of microbiological methods**, v. 93, n. 3, p. 277–83, jun. 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

Nesta tese foi estabelecida a hipótese de que existem cepas potencialmente patogênicas de *V. vulnificus*, identificadas pelo gene *vcgC*, nas ostras produzidas no litoral de Santa Catarina. A hipótese foi confirmada na análise das amostras coletadas, com confirmação por PCR, indicando a presença de cepas de *V. vulnificus*, portadoras do gene *vcgC*, no litoral catarinense.

O estudo de revisão apresentou a distribuição de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras de água do mar, moluscos bivalves, crustáceos e em outros mamíferos marinhos coletados nos diferentes países, além de registros de casos clínicos e surtos na América do Sul. Os resultados indicam que as infecções causadas por *V. parahaemolyticus* tem sido mais fortemente relacionadas à ingestão de alimentos de origem marinha e mais frequentes na costa do Oceano Pacífico. Por outro lado, *V. vulnificus* é mais frequentemente adquirido por contato de lesões de pele e sua presença é mais comum na costa do Oceano Atlântico.

O estudo indica que o fenômeno *El Niño* exerce influência no aumento de casos de *V. parahaemolyticus* na costa do Pacífico. Entretanto, são necessários mais estudos para confirmar a importância de fatores ambientais na presença e virulência da bactéria nesta região.

Os casos de infecção causada por *V. vulnificus* são restritos basicamente às áreas sul e sudeste da América do Sul, exceto pelo caso recente registrado em fevereiro de 2016, na região nordeste do Brasil e por três casos de gastroenterite no Peru e dois no Equador. Uruguai é o país com o maior número de casos na América do Sul, todos na região estuarina da *Baía de la Plata*.

Mesmo considerando uma possível subnotificação e a presença concomitante de cepas de ambas bactérias em amostras ambientais na costa do Atlântico e do Caribe, a distribuição de cepas patogênicas merece mais estudos. É necessário que sejam realizadas mais pesquisas para determinar se existem fatores ambientais ou genéticos que expliquem a distribuição de cepas patogênicas de *V. vulnificus* e de *V. parahaemolyticus*, pois é evidente que o continente apresenta condições ambientais que são permissivas para ambas bactérias.

Os registros de casos e as características ambientais da América do Sul não podem ser ignoradas, há um risco demonstrado de infecção por *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* pela água e por alimentos de origem marinha. Apesar do número de casos ser muito baixo, a

morbidade, a mortalidade e a associação destes casos com os alimentos de origem marinha e água do mar justificam a instalação de um programa de monitoramento e vigilância para todos os países da América do Sul, a fim de proteger a saúde pública e prevenir surtos.

Como foi dito acima, esta tese confirmou a hipótese da presença de cepa patogênica de *V. vulnificus* no litoral de Santa Catarina. Este é um fato importante, uma vez que na região de estudo está a maior produção de moluscos bivalves do Brasil.

O estudo revelou uma baixa incidência de *V. vulnificus* entre as amostras de ostras (*C. gigas*) produzidas em Santa Catarina durante os meses de outubro/2014 a janeiro/2015, confirmadas por PCR através do gene *vcg*. Esta baixa incidência pode ser explicada pela alta salinidade na região, que ultrapassa os valores de 34‰. Ao mesmo tempo, há questões relevantes que devem ser consideradas e que impedem a afirmação de que o consumo seja seguro na região. Em primeiro lugar deve-se considerar que, mesmo tendo se concentrado na época de maior temperatura da água do mar e de maior consumo do molusco, não foi possível realizar um estudo ao longo do ano para avaliar os parâmetros que possam afetar a presença da bactéria em outras estações climáticas. Deve-se considerar ainda que, para pessoas portadoras de fatores predisponentes, o risco é alto mesmo em baixas concentrações da bactéria. Além disso, não pode ser ignorada a possibilidade de cepas *vcgE* causarem infecção cutânea nestes indivíduos.

Na análise da performance dos meios usando cepas puras de *V. vulnificus* de genótipos conhecidos *vcgC* e *vcgE*, o meio VVX apresentou o maior percentual de recuperação e crescimento bacteriano para o genótipo *vcgC* e para *V. vulnificus* total, mas sem diferença estatística significativa ao ser comparado com os meios SDS, CAV, CPC+ e HI, assim, considerando-se a performance para *V. vulnificus* total, todos os meios analisados apresentaram performance satisfatória.

O meio TCBS apresentou o pior percentual de crescimento bacteriano para *V. vulnificus* total e especialmente considerando o genótipo *vcgC*, o que o torna não recomendável para uso em diagnóstico de casos de infecção humana onde há prevalência deste genótipo de *V. vulnificus*.

Com relação à avaliação da performance dos meios para isolamento e enumeração de *V. vulnificus* em amostras ambientais, o meio CPC+ apresentou a melhor performance quando usado para isolamento e enumeração. Assim, este estudo conclui que, para a detecção e enumeração de *V. vulnificus* em amostras de casos clínicos, os meios seletivos SDS, VVX, CAV ou CPC+ podem ser utilizados,

mas a confirmação por PCR é fundamental para a certeza do diagnóstico e definição do tratamento mais adequado.

Assim, em vista das mudanças climáticas que estão sendo observadas, um programa de monitoramento formal deveria ser implementado para quantificar *Vibrio* sp., e para desenvolver modelos preditivos que indiquem a ocorrência de condições ambientais favoráveis para as formas patogênicas destas bactérias. O monitoramento também serviria para coletar informações suficientes para determinar o impacto do ENSO e outros fenômenos climáticos globais na incidência de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Finalmente, ele permitiria o estabelecimento de planos de controle para minimizar o aparecimento de novos casos e reduzir o impacto de surtos, especialmente de *V. parahaemolyticus* na costa do Pacífico durante os anos em que o ENSO incide na região.

Assim, mesmo tendo em conta a ausência de relatos de casos de infecção humana na região litorânea de Santa Catarina e os fatores citados, é fundamental a criação de um programa de monitoramento contínuo para avaliar a presença da bactéria e o impacto dos fatores ambientais na sua prevalência, assim como a adoção de um procedimento de comunicação para pessoas portadoras de condições predisponentes e para profissionais de saúde, para que possam orientar seus pacientes e que possam realizar o diagnóstico e consequente tratamento de pessoas acometidas. Também recomenda-se a adoção de tecnologias de processamento de alimentos como a depuração ou o tratamento térmico das ostras antes do consumo, além da adoção de metodologias mais precisas, rápidas e específicas para detecção de cepas potencialmente patogênicas, como a detecção do gene *vcg* por PCR, especialmente nos casos de diagnóstico de casos suspeitos, garantindo maior precisão e eficácia de tratamento.

RECOMENDAÇÕES

- Implementar programa de monitoramento formal para quantificar *Vibrio* sp. nas áreas de produção de moluscos de Santa Catarina;
- Desenvolver modelos preditivos que indiquem a ocorrência de condições ambientais favoráveis para as formas patogênicas destas bactérias;
- Aplicar tecnologias de processamento de alimentos como o tratamento térmico ou a depuração com o objetivo de eliminar o patógeno *V. vulnificus* das ostras, antes do consumo;
- Adotar procedimento de comunicação para pessoas portadoras de condições predisponentes e para profissionais de saúde, para que possam orientar seus pacientes e que possam realizar o diagnóstico e posterior tratamento de pessoas acometidas;
- Adotar metodologias mais precisas, rápidas e específicas para detecção de cepas potencialmente patogênicas, como a detecção do gene *vcg* por PCR, especialmente para diagnóstico de casos suspeitos, garantindo maior precisão e eficácia de tratamento.

ANEXO A

The first report of a potentially pathogenic strain of *Vibrio vulnificus* in oysters from Brazil

Artigo enviado para *Letters in Applied Microbiology*.

Simone M. Raszl^a, Brett A. Froelich^b, Cleide R. W. Vieira^a, A. Denene Blackwood^b and Rachel T. Noble^b

^a Federal University of Santa Catarina (UFSC), Department of Food Science and Technology, Florianopolis, Brazil

^b The University of North Carolina at Chapel Hill (UNC-CH), Institute of Marine Sciences, Morehead City, North Carolina, USA.

Address correspondence to Rachel T. Noble, rtnoble@email.unc.edu

Significance and impact of this study

Vibrio vulnificus is a marine bacterial species found worldwide that can cause infection through either open wounds or ingestion. This is the first report, confirmed by polymerase chain reaction (PCR), of a potentially pathogenic strain of *V. vulnificus*, identified by the *vcgC* gene, in oysters from Brazil and also in South America. Despite the small number of potentially pathogenic strains found in the oyster samples, the recent reports of human infections in South America combined with the morbidity of such infections and the confirmed presence of potentially pathogenic *V. vulnificus* strains in this report all highlight the need for a continuous monitoring program to protect public health.

Abstract

Vibrio vulnificus, a species of bacteria native to estuaries worldwide, is also a human pathogen that can infect through either open wounds or ingestion. Biotype I strains with the “C” allele of the virulence correlated gene (*vcg*) have been found to be associated with clinical cases of human infection. The aim of this paper is to document, for the first time, the presence of potentially virulent, *vcgC* positive *V. vulnificus* from the shellfish collected off the coast of Brazil. Oyster

(*Crassostrea gigas*) samples were collected during the spring and summer in Santa Catarina state, Brazil (2014-2015). Of 50 presumptive isolates subjected to PCR confirmation, two (4%) were confirmed as *V. vulnificus*; one was identified as a potentially virulent *vcgC*-positive strain and the other was determined to be a *vcgE*-positive (environmental) strain. To determine which areas of Brazil harbor dangerous forms of *V. vulnificus*, we recommend a continuous monitoring program with confirmatory steps for pathogenic strain detection and quantification to be initiated.

Key-words: *Vibrio vulnificus*; oyster; polymerase chain reaction; Brazil.

Introduction

Vibrio vulnificus is a species of bacteria that is native to estuaries worldwide (Fukushima & Seki 2004; Vinh et al. 2006; Maugeri et al. 2006; Kirs et al. 2011; Ji et al. 2011; Cantet et al. 2013; Bier et al. 2013). The organism is also a human pathogen; remarkable because infections can occur via two modes of entry, open wounds or ingestion. Infections by ingestion often result from consumption of raw or undercooked seafood (especially shellfish) and are most common in people with preexisting conditions as diabetes or liver disease, which are not required predisposing conditions for wound infections (Gulig et al. 2005). In susceptible individuals, the bacteria are able to cross intestinal barriers and enter into the bloodstream where they rapidly reproduce, causing septicemia and often death. The mortality rate is ~50%, the highest among foodborne disease (Starks et al. 2000; Gulig et al. 2005; Jones & Oliver 2009).

Global changes in climate, among other factors, are causing increases in seawater temperatures and dramatic variations in salinity, affecting the habitats of estuarine microbiota (Baker-Austin et al. 2012; Froelich et al. 2013; Levy 2015). In the USA, from 2013-2014, *Vibrio* related infections increased 173% compared with period of time from 1996-1998 (Crim et al. 2014). A significant trending increase in total *Vibrio* concentrations has also been shown in a North Carolina (NC) estuary over the past decade (Froelich et al. 2014). It has been postulated that this increase could be related to climate change or to improved surveillance (Tirado et al. 2010; Martínez-Urtaza 2011).

Currently, identification and confirmation of *V. vulnificus* biotypes is based on genetic, biochemical, or serological tests (Warner & Oliver 2008). While *V. vulnificus* can be divided into 3 biotypes as related to

pathogenicity, human disease is most often associated with *V. vulnificus* biotype 1, which can be further classified into two distinct genotypes according to unique genetic variations, namely the clinical ("C") genotype, and the environmental ("E") genotype. Biotype 1 strains with the "C" allele of the virulence correlated gene (*vcg*) have been found to be associated with clinical cases of human infection (Rosche et al. 2005; Warner & Oliver 2008). It is known that *vcgC* gene may serve as a biomarker to detect potentially virulent *V. vulnificus* strains (Han et al. 2011). Although *vcgE* genotypes can also cause human wound infections, they are much less common (Rosche et al. 2010). However, according to Warner and Oliver (2008), the proportion of *V. vulnificus* that are the *vcgE* genotype is higher than that of *vcgC* genotypes in estuarine water samples (Rosche et al. 2005; Warner & Oliver 2008; Jeong et al. 2011; Bier et al. 2013).

In Brazil, the southern state of Santa Catarina produces 98% of the country's farmed oysters and mussels, which are then distributed and sold throughout Brazil (IBGE 2013). Previous studies have isolated *V. vulnificus* from oysters (*Crassostrea gigas*) grown along the coast of Santa Catarina (Silva 2003; Ramos et al. 2012), as well as in other molluscan shellfish, crustaceans, and seawater in other coastal Brazilian states (Garcia-Moreno & Landgraf 1997; Vieira et al. 2011; Oliva 2012). However, despite the reports of *V. vulnificus* in water and seafood samples, none of the studies included any molecular analyses to confirm the presence of markers that indicate virulence, such as the *vcgC* gene. Because current culture-based techniques for *Vibrio* sp. quantification are prone to false positives (Froelich Weiss Noble 2014), molecular confirmation of potentially virulent strains is an important step towards detecting public health threats in the area, as only a subset of *V. vulnificus* strains can cause disease.

Beyond microbiological analyses, there have been three documented cases of *V. vulnificus* infection in Brazilian states: Rio de Janeiro and Sao Paulo, both in 2004, and in Parana, in 2012 (Brack et al. 2004; Araujo et al. 2007; França et al. 2013). All three infections evolved to septicemia and, ultimately, death. The case that occurred in Rio de Janeiro state (Brack et al. 2004) was related to seawater contact, while the case from Sao Paulo (Araujo et al. 2007) was reported to be caused by seafood ingestion. The case occurring in Parana (França et al. 2013) did not report the source of the infection. Furthermore, recently, during the summer season 2014-2015, Uruguay reported 4 cases of *V. vulnificus* infection, with two deaths (Uruguay 2015), all in the same area, the Rio de la Plata estuary. That area is characterized by lower

salinity (~5-25‰) and seawater temperatures in December and January that ranged from 20.4 to 22.7°C (Fossati & Piedra-Cueva 2008; Simionato et al. 2010; www.seatemperature.org). These temperatures were roughly 2°C above the average that was observed during the 2014 summer season, according to data from NASA and NOAA (Cole & McCarthy 2015). Although the data collected to date are few on this important pathogen, the potential exists that modified estuarine temperature and salinity conditions are playing a role in *V. vulnificus* ecology.

The aim of this paper is to document and place into context an additional set of microbiological analyses from oyster samples from Santa Catarina State. In addition, for the first time, this study reports the confirmed presence of potentially virulent *V. vulnificus* strains from the coast of Brazil, by PCR confirmation using the *vcgC* gene. This information strengthens the argument for more detailed monitoring systems.

Results and discussion

Of the 42 oyster samples analyzed, 18 (43%) were found to contain presumptive *V. vulnificus* colonies on *V. vulnificus* X-Gal (VVX) medium (Griffitt & Grimes 2013), varying in concentration from 1.93×10^1 to 3.53×10^3 CFU g⁻¹. Another study from the same oyster production area reported lower levels of *V. vulnificus* that varied from 0 to 7 MPN g⁻¹ using TCBS and biochemical tests (Ramos et al. 2012). In other published studies, using TCBS and biochemical tests, the results were presented only as % of positive samples. Barros et al. (2003) found 8.3 and 14% of *V. vulnificus* from different sites, while Pereira et al. (2007) found 4.4% of samples to be positive for *V. vulnificus* in fresh mussels. Silva (2003) and Ristori et al. (2007) used cellobiose, polymyxin and colistin (CPC) agar, which is a selective media to isolate and enumerate *V. vulnificus*. Silva (2003) found 16.6% of samples as *V. vulnificus*, varying from <30 to 2760 MPN g⁻¹ in mussels and oysters, and Ristori et al. (2007) found <3.0 to 6.1 MPN g⁻¹ in oyster samples. None of the studies mentioned performed PCR to confirm the species or to test for virulence. Oliva (2012) is, until now, the only researcher that performed PCR using the *vvhA* gene (Panicker et al. 2004) for *V. vulnificus* species identification in mussels from Rio de Janeiro, Brazil, but the plating results from TCBS are also presented as % of positive samples. Due to the varying methodological approaches in each of the discussed reports, it is difficult to compare the results obtained from the

current study with other South American studies. Table 1 shows the results from environmental parameters collected from each site and the total *Vibrio* counting obtained from TCBS plates, *V. vulnificus* presumptive data (VVX), and confirmed enumeration from PCR confirmation.

Table 1 Results from environmental and microbiology data from each site (mean \pm SEM).

Site	Salinity (%)	TCBS (CFU g ⁻¹)	VVX presumed (CFU g ⁻¹)	VVX confirmed PCR (CFU g ⁻¹)
A	32.3 \pm 0.6	7.57 x 10 ² \pm 4.53 x 10 ²	2.77 x 10 ¹ \pm 1.88 x 10 ¹	0.0
B	33.2 \pm 0.6	7.89 x 10 ³ \pm 4.77 x 10 ³	7.0 x 10 ¹ \pm 6.63 x 10 ¹	0.0
C	33.0 \pm 0.6	2.78 x 10 ³ \pm 2.03 x 10 ³	3.86 x 10 ¹ \pm 3.54 x 10 ¹	0.0
D	33.2 \pm 0.7	4.06 x 10 ³ \pm 3.8 x 10 ³	3.41 x 10 ¹ \pm 2.77 x 10 ¹	1.99 x 10 ²
E	32.3 \pm 0.9	2.76 x 10 ³ \pm 1.87 x 10 ³	9.29 x 10 ¹ \pm 7.99 x 10 ¹	1.99 x 10 ¹
F	33.2 \pm 0.5	6.06 x 10 ³ \pm 4.5 x 10 ³	5.53 x 10 ² \pm 4.97 x 10 ²	0.0

There was no significant statistical difference between the data found ($p > 0.05$).

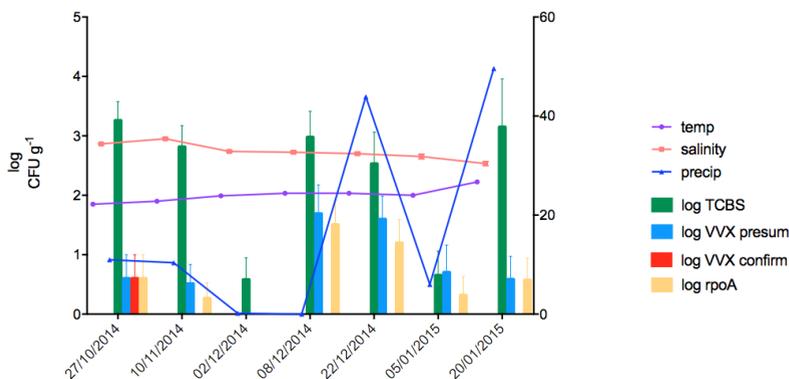
The means of temperature and precipitation are the same in all sites. The temperature mean was $24.1^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ and the mean cumulative precipitation for the 72 h before sampling was $17.3 \text{ mm} \pm 7.8$ (Figure 1). In our study, 50 presumptive isolates were subjected to PCR confirmation. Two (4%) were confirmed as *V. vulnificus*, resulting in an estimated concentration of $2.2 \times 10^2 \text{ CFU g}^{-1}$ *V. vulnificus* in the oysters analyzed. One of the samples was confirmed via molecular methods to be the potentially virulent *vcgC*-positive strain. The other was determined to be a *vcgE*-positive strain. This is the first report of a *vcgC* strain of *V. vulnificus* in Brazil and in South America. The number of virulent strains from oysters in Brazil is very low compared to the results obtained from Warner & Oliver (2008), who found 15.6% of *vcgC* in oysters from NC, USA. However, this is only a single study conducted in a single region, and given the importance of oysters to the seafood industry in Brazil, the result is still a cause for concern. As mentioned before, the only previous study that performed PCR in South America to confirm *V. vulnificus* in marine samples was performed by Oliva (2012) in mussels from the state of Rio de Janeiro, Brazil. The researcher found a prevalence of 12.4% of *V. vulnificus*, but the gene used was *vvhA*, which is able to confirm the presence of *V. vulnificus*, but does not identify virulence.

Both of the confirmed *V. vulnificus* samples found in our study were collected on the same day, October 27th, 2014, but from different sites (Figure 1). For both, the seawater temperature was 22.2°C . The strain confirmed as *vcgC* was collected at site D (Figure 2), where salinity was 34‰, while the *vcgE* strain was collected from site E (Figure 2), and the salinity was 35‰. Interestingly these salinities are higher than those typically reported for *V. vulnificus* (Froelich & Noble 2014).

A weak correlation between cumulative precipitation and salinity ($r=0.22$, $p>0.05$) was observed. Figure 1 shows the concentration of total *Vibrio*; presumed, and confirmed *V. vulnificus*, as well as all environmental parameters, in different collection dates. The figure presents salinity, seawater temperature and precipitation in each period. Bars in Figure 1 represent counting total values from all sites, per collection day, showing total *Vibrio* measured from TCBS plates; presumed *V. vulnificus* measured from VVX plates; and confirmed *V. vulnificus* from PCR. Lines show environmental parameters as temperature (triangle), salinity (square) and cumulated precipitation (circle) in each collection day. It worth mention that the 2-way ANOVA

showed no statistical difference between sampling sites per collection day, which explain the use of all data as a single group per day.

Figure 1 Concentration (log CFU g⁻¹) for TCBS and VVX, along with estimated concentrations of confirmed *Vibrio vulnificus* according to PCR confirmation results from oyster samples collected in Santa Catarina state, Brazil, Oct/2014 to Jan/2015, and related environmental parameters (salinity, seawater temperature and cumulative precipitation 72 h before sampling).



The relatively higher salinities from sites where the samples were collected could explain the lower levels of *V. vulnificus* in Brazil. Similarly, the recent cases in Uruguay may be explained by the low salinity in the Rio de la Plata Estuary, which has a summer salinity average of 5-25‰ (Fossati & Piedra-Cueva 2003; Uruguay 2015) in conjunction with the abnormally warm water temperatures during the summer season of 2014-2015 (Cole & McCarthy 2015). Salinity is an important limiting factor of the presence and concentration of *V. vulnificus*, as demonstrated previously (e.g. Chase & Harwood 2011; Froelich et al. 2012; Froelich et al. 2013; Froelich & Oliver 2013).

In this study, we report concentrations of *V. vulnificus* from a range of oyster samples collected in Brazil, as well as confirmation of a single *vcgC* isolate and a single *vcgE* isolate of *V. vulnificus*. Both are relevant to public health. As mentioned before, even though a single *vcgC* confirmed strain is reported, it is an important result given the combined importance of raw shellfish consumption and morbidities associated

with *V. vulnificus* infections. Also, it is known that *vcgE* genotypes can cause wound infections, so while this may seem to be a small-scale result, the potential impact is substantial for those with predisposing health conditions such as high serum iron concentrations (Jones & Oliver 2009). These people should be warned about the risks of eating raw or undercooked seafood from areas with elevated *V. vulnificus* concentrations. In order to determine which areas in Brazil harbor dangerous forms of *V. vulnificus*, a continuous quantitative monitoring program with confirmation steps for pathogenic strain detection should be initiated.

Material and methods

Oysters (*C. gigas*) and seawater samples were collected from October 2014 to January 2015 at six oyster growing sites in SC, Brazil (Figure 2). The geographic coordinates from each site are listed on Table 2.

Figure 2 Oyster sampling sites, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

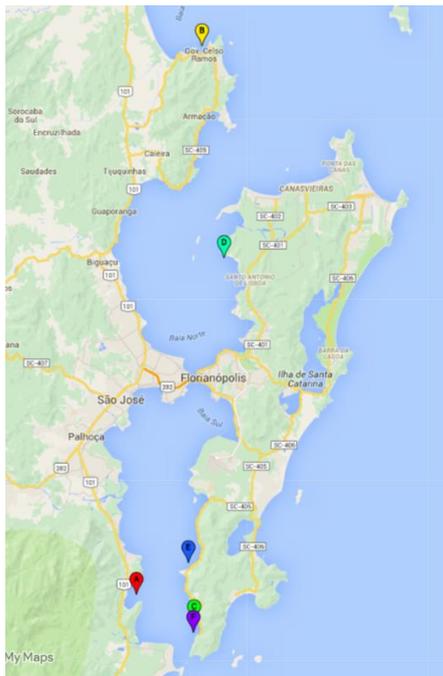


Table 2 Geographic coordinates from sampling sites.

Site	Geographic coordinates (latitude and longitude)
A	-27°78'13'', -48°62'22''
B	-27°30'75'', -48°55'90''
C	-27°80'51'', -48°56'65''
D	-27°49'14'', -48°53'74''
E	-27°75'40'', -48°57'18''
F	-27°81'44'', -48°56'54''

Oysters were collected from lantern nets at production areas. Note that this method of oyster production keeps the oysters under the surface of the seawater constantly, and the shellfish are not exposed during low tide. Seawater was collected in sterilized plastic bottles from the water surface (<0.5 m depth) and salinity was measured by argentometric method (APHA 2012), reported as parts per thousand (‰). Seawater temperature data was collected from the National Center Environmental Prediction/ Marine Modeling and Analysis Branch at <http://polar.ncep.noaa.gov/sst/ophi/>. Cumulative precipitation in the 72 hours prior to sample collection was measured, to check its influence on salinity once the area is an estuary and potential impacts of runoff during this season that is characterized by high levels of precipitation. Precipitation data was collected from the historical data available at *Instituto Nacional de Meteorologia* (INMET) (<http://www.inmet.gov.br>). Oysters and seawater samples were stored in thermal boxes with ice packs and transported to the laboratory at UFSC and processed on the same day, within a maximum of 4 h. Oyster samples were washed and sprayed with ethanol 70°GL before shucking. The samples were prepared using oyster meat from 5 samples, per site, which were homogenized with the same volume per weight of phosphate buffered saline (PBS), followed by a 1:10 dilution prepared using PBS. From both dilutions, 100µL was spread plated in duplicate on VVX and TCBS, and both plates were incubated for 18-24h at 37°C. TCBS was used to quantify total *Vibrio* concentrations. After incubation, five presumptive *V. vulnificus* colonies were selected from each VVX plate for each sample/site and these transferred, using sterile technique, to 100µL of heart infusion (HI) broth, and grown overnight at 23°C. After growth, the tubes were boiled for 10 min, and centrifuged at 10,000 × g for 10 min. The resulting DNA was frozen at -20°C,

lyophilized, and shipped to IMS/UNC for later PCR analysis, which was performed as described by Warner & Oliver (2008) using *vcgC* and *vcgE* primers (Table 3), allowing for simultaneous confirmation and genotyping of presumptive *V. vulnificus* isolates (Garrido-Maestu et al. 2014).

Table 3 Primers used in this study (Warner & Oliver 2008).

Primer	Sequence
<i>vcgE</i> -F	5' CTCAGAAAGGCTCAATTGAC 3'
<i>vcgE</i> -R	5' GATTAACGCTGTAAGGCCG 3'
<i>vcgC</i> -F	5' AGCTGCCGATAGCGATCT 3'
<i>vcgC</i> -R	5' TGAGCTAACGCGAGTAGTGAG 3'

Per manufacturer's instructions, PCR reactions were prepared using GoTaq Green 2x (Promega, Madison, WI) in a Px2E thermocycler (ThermoScientific, Waltham, MA) using the following parameters: a 3 min initial denaturing step at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 45 s, and a final extension cycle of 72°C for 2 min (Warner & Oliver 2008). PCR products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel, stained with 0.1% ethidium bromide, and visualized under UV light. All negative and positive controls were conducted simultaneously and provided the expected results indicating appropriate data quality.

Statistical analysis was performed using the software Prism 6 for Mac OS (version 6.0h, GraphPad Software Inc.®). The comparison between variables was done by ANOVA and the correlation was calculated by r^2 . The microbiological data from colony counting were transformed to log and the P value was 0.05.

Acknowledgements

This study was carried out with financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC)/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

References

APHA, 2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed*,

Araujo, M.R.E. et al., 2007. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and literature review. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 11(2), pp.302–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625784>.

Baker-Austin, C. et al., 2012. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*, 3(1), pp.73–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nclimate1628>.

Barros, L.M. de O. et al., 2003. Víbrios sacarose negativos isolados de ostras *Crassostrea rhizophorae* comercializadas em barracas de praia da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. *Bol. Téc. Cient. Cepnor*, 7(1), pp.9–16.

Bier, N. et al., 2013. Genotypic diversity and virulence characteristics of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates from the Baltic Sea region. *Applied and environmental microbiology*, 79(12), pp.3570–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3675912&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 30, 2014].

Brack, J.C. et al., 2004. Infecção cutânea por *Vibrio vulnificus*. *Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia.*, abr/mai/ju(6). Available at: www.dermato.med.br/ufrrj2004/Infec%20cut%20nea.pdf.

Cantet, F. et al., 2013. Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. *Research in Microbiology*, 164(8), pp.867–874.

Chase, E. & Harwood, V.J., 2011. Comparison of the effects of environmental parameters on growth rates of *Vibrio vulnificus* biotypes I, II, and III by culture and quantitative PCR analysis. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), pp.4200–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131657&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 12, 2014].

Cole, S. & McCarthy, L., 2015. NASA, NOAA Find 2014 Warmest Year in Modern Record. *NASA*. Available at: <http://www.nasa.gov/press/2015/january/nasa-determines-2014-warmest-year-in-modern-record> [Accessed February 6, 2016].

Crim, S.M. et al., 2014. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2006-2013. *Morbidity and mortality weekly report*, 63(15), pp.328–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739341>.

Fossati, M. & Piedra-Cueva, I., 2008. Numerical modelling of residual flow and salinity in the Río de la Plata. *Applied Mathematical Modelling*, 32(6), pp.1066–1086.

Fossati, M. & Piedra-Cueva, I., 2003. Salinity simulations of the Rio de la Plata. *International Conference on Estuaries and Coasts*, pp.604–610. Available at: <http://www.irtces.org/pdf-hekou/075.pdf>.

França, J.C.B. et al., 2013. *Vibrio vulnificus* infection in Southern Brazil - case report. *An Bras Dermatologia*, 88(3), pp.424–426.

Froelich, B., Ayrapetyan, M. & Oliver, J.D., 2013. *Vibrio vulnificus* integration in marine aggregates and subsequent uptake by the oyster *Crassostrea virginica*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 79, pp.1454–1458.

Froelich, B.A. et al., 2012. Apparent loss of *Vibrio vulnificus* from North Carolina oysters coincides with a drought-induced increase in salinity. *Applied and environmental microbiology*, 78(11), pp.3885–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2014].

Froelich, B.A. et al., 2013. Mechanistic and statistical models of total *Vibrio* abundance in the Neuse River Estuary. *Water research*, 47(15), pp.5783–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948561> [Accessed May 26, 2014].

Froelich, B.A. & Noble, R.T., 2014. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(80), pp.7454–7459.

Froelich, B.A. & Oliver, J.D., 2013. The interactions of *Vibrio vulnificus* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Microb Ecol*, 65(4),

pp.807–816. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23280497> [Accessed August 8, 2014].

Froelich, B.A., Weiss, M.J. & Noble, R.T., 2014. The evaluation of four recent culture-based methods for the isolation and enumeration of *Vibrio vulnificus* bacteria from oyster meat. *Journal of microbiological methods*, 97(1), pp.1–5. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.004> [Accessed May 26, 2014].

Fukushima, H. & Seki, R., 2004. Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. *FEMS microbiology ecology*, 48(2), pp.221–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712405> [Accessed May 26, 2014].

Garcia-Moreno, M.L. & Landgraf, M., 1997. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 17(2), pp.177–180.

Garrido-Maestu, A. et al., 2014. In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). *Food Control*, 37, pp.371–379. Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513004726> [Accessed May 26, 2014].

Griffitt, K.J. & Grimes, D.J., 2013. A novel agar formulation for isolation and direct enumeration of *Vibrio vulnificus* from oyster tissue. *Journal of microbiological methods*, 94(2), pp.98–102. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701213001437> [Accessed August 20, 2014].

Gulig, P.A., Bourdage, K.L. & Starks, A.M., 2005. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *The Journal of Microbiology*, 43(February), pp.118–131.

Han, F., Wang, F. & Ge, B., 2011. Detecting potentially virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Applied and environmental microbiology*, 77(8), pp.2589–95. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3126371&to>

ol=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed July 4, 2014].

IBGE, 2013. Produção da Pecuária Municipal 2013. *Prod. Pec. Munic., Rio de Janeiro*, 41, p.108. Available at: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2013_v41_br.pdf [Accessed January 1, 2015].

Jeong, H.S. et al., 2011. Genotypic characterization of *Vibrio vulnificus* clinical isolates in Korea. *Osong public health and research perspectives*, 2(1), pp.8–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3766911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Ji, H. et al., 2011. Occurrence and characteristics of *Vibrio vulnificus* in retail marine shrimp in China. *Food Control*, 22(12), pp.1935–1940. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713511001903> [Accessed May 26, 2014].

Jones, M.K. & Oliver, J.D., 2009. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infection and immunity*, 77(5), pp.1723–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2681776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2014].

Kirs, M. et al., 2011. A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), pp.149–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.012> [Accessed May 26, 2014].

Levy, S., 2015. How climate shapes *Vibrio* ecology. *Environmental Health Perspectives*, 123(4), pp.A82–A89.

Martínez-Urtaza, J., 2011. Cambio climático y patógenos en el agua: el fenómeno El Niño y su impacto en la salud. *Rev. Salud Ambient.*, 11(1-2), pp.46–51.

Maugeri, T.L. et al., 2006. Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. *Research in Microbiology*, 157(2), pp.194–200. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250805001592>.

Oliva, M.S. de, 2012. *Utilização de marcadores fenogenotípicos de virulência na caracterização de Vibrio spp. isolados a partir de*

mexilhões (*Perna perna*) em diferentes pontos do litoral do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Panicker, G., Myers, M.L. & Bej, A.K., 2004. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1), pp.498–507.

Pereira, C.S. et al., 2007. *Vibrio* spp. isolados de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Ciênc. tecnol. Aliment.*, 27(2), pp.387–390.

Ramos, R.J. et al., 2012. Occurrence of *Vibrio* spp., positive coagulase staphylococci and enteric bacteria in oysters (*Crassostrea gigas*) harvested in the south bay of Santa Catarina island, Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(3), pp.478–484.

Ristori, C.A. et al., 2007. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. *International journal of environmental health research*, 17(4), pp.259–269.

Rosche, T.M., Binder, E.A. & Oliver, J.D., 2010. *Vibrio vulnificus* genome suggests two distinct ecotypes. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), pp.128–132. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23766007>.

Rosche, T.M., Yano, Y. & Oliver, J.D., 2005. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiology and Immunology*, 49(4), pp.381–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840964>.

Silva, M.A.C. da, 2003. *Ocorrência e caracterização de Vibrio vulnificus isolados de amostras de moluscos e água de áreas de cultivo de Santa Catarina*. Itajaí: Dissertação de Mestrado. UNIVALI.

Simionato, C.G. et al., 2010. Patterns of sea surface temperature variability on seasonal to sub-annual scales at and offshore the Rio de la Plata estuary. *Continental Shelf Research*, 30(19), pp.1983–1997.

Starks, A. M. et al., 2000. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infection and Immunity*, 68(10), pp.5785–5793.

Tirado, M.C.C. et al., 2010. Climate change and food safety: A review.

Food Research International, 43(7), pp.1745–1765. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910002231> [Accessed May 25, 2014].

Uruguay, 2015. Bacteria *Vibrio vulnificus*: MSP recomienda no ingresar al agua marina a personas con lesiones en la piel, fundamentalmente si son adultas mayores y con patologías preexistentes. *Ministerio de Salud Pública de Uruguay*. Available at: <http://www.msp.gub.uy/comunicado/comunicado-la-poblaci?n-bacteria-vibrio-vulnificus-msp-recomienda-no-ingresar-al-agua> [Accessed June 15, 2015].

Vieira, R.H.S.F. et al., 2011. Kanagawa-negative, *tdh*- and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. *Current Microbiology*, 63(2), pp.126–130.

Vinh, D.C. et al., 2006. *Vibrio vulnificus* septicemia after handling tilapia species fish: a Canadian case report and review. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 17(2), pp.129–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2095056&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Warner, E. & Oliver, J.D., 2008. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), pp.80–85.

Warner, E.B. & Oliver, J.D., 2008. Multiplex PCR assay for detection and simultaneous differentiation of genotypes of *Vibrio vulnificus* biotype 1. *Foodborne pathogens and disease*, 5(5), pp.691–693.