

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

***Vibrio vulnificus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos:
capacidade de formar biofilmes após estresses subletais e resistência frente a
antibióticos e sanitizantes**

Débora Rodrigues Silveira

Pelotas, 2018

Débora Rodrigues Silveira

***Vibrio vulnificus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos:
capacidade de formar biofilmes após estresses subletais e resistência frente a
antibióticos e sanitizantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S587v Silveira, Débora Rodrigues

Vibrio vulnificus isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos : capacidade de formar biofilmes após estresses subletais e resistência frente a antibióticos e sanitizantes / Débora Rodrigues Silveira ; Cláudio Dias Timm, orientador. — Pelotas, 2018.

46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Micropogonias furnieri. 2. Mugil platanus. 3. Paralichthys orbignyanus. 4. Farfantepenaeus paulensis. 5. Hipoclorito de sódio. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Título.

CDD : 641.1

Débora Rodrigues Silveira

Vibrio vulnificus isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos: capacidade de formar biofilmes após estresses subletais e resistência frente a antibióticos e sanitizantes

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestra em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2018

Banca examinadora:

.....
... Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador). Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
.... Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra. Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
.... Profa. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição. Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Resumo

SILVEIRA, Débora Rodrigues. ***Vibrio vulnificus* ISOLADOS DE PESCADOS DO ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS: CAPACIDADE DE FORMAR BIOFILMES APÓS ESTRESSES SUBLETAIS E RESISTÊNCIA FRENTE A ANTIBIÓTICOS E SANITIZANTES.** 2018. 46f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O estuário da Lagoa dos Patos representa uma importante área de criação para várias espécies de peixes e crustáceos de valor comercial, configurando-se como um polo pesqueiro artesanal. O pescado pode ser contaminado no ambiente em que vive ou durante a manipulação após a captura. *Vibrio vulnificus* apesar de sua importância como causador de doenças transmitidas por alimentos, ainda é pouco pesquisado como contaminante de pescados. O principal objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência de *V. vulnificus* em pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos, estabelecer a relação entre formação de biofilme e estresses subletais e verificar a resistência dos isolados frente a antimicrobianos e sanitizantes. Foram analisados 217 isolados característicos de *Vibrio* sp. obtidos a partir de 318 amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos nos anos de 2012 a 2016. Os isolados foram submetidos à identificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase utilizando-se primers para o gene *cth* específico de *V. vulnificus*. Posteriormente os isolados confirmados foram submetidos à verificação da capacidade de formar de biofilme, foi estudado o efeito de estresses subletais (diferentes temperaturas, pH e concentrações salinas) sobre a formação de biofilme e foi avaliada a resistência a antimicrobianos pela técnica de disco-difusão e concentração inibitória mínima, em placas de microtitulação, e concentração bactericida mínima (CBM) com os sanitizantes hipoclorito de sódio e dióxido de cloro. *V. vulnificus* foi isolado de *P. orbignyanus* e de *M. furnieri*. Os isolados foram capazes de formar biofilme. No entanto, essa capacidade foi diminuída ou eliminada após a exposição a estresses subletais. Os isolados apresentaram resistência à maioria dos antimicrobianos testados e não foram sensíveis a nenhum dos antimicrobianos, diferentemente do que se encontra na literatura. Os resultados da CBM mostraram que as concentrações de hipoclorito de sódio e dióxido de cloro necessárias para eliminar *V. vulnificus* são mais elevadas do que aquelas usualmente utilizadas na indústria de pescados. Este é o primeiro relato de isolamento de *V. vulnificus* de pescados capturados na Lagoa dos Patos.

Palavras-chave: *Micropogonias furnieri*; *Mugil platanus*; *Paralichthys orbignyanus*; *Farfantepenaeus paulensis*; hipoclorito de sódio.

Abstract

SILVEIRA, Débora Rodrigues. ***Vibrio vulnificus* ISOLATES FROM FISH FROM LAGOA DOS PATOS ESTUARY: CAPACITY TO FORM BIOFILMES AFTER SUBLETHAL STRESSES AND RESISTANCE AGAINST ANTIBIOTICS AND SANITIZERS.** 2018. 46f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The estuary of the Lagoa dos Patos represents an important breeding ground for several species of fish and crustaceans of commercial value, forming an artisanal fishing pole. Fish may be contaminated in the ocean, and remain in the industry, or after capture. The presence of *Vibrio vulnificus* has been recorded in the waters along the Atlantic coast of South America. However, despite its importance as a cause of foodborne diseases, it is still little researched as a contaminant of fish. The main objective of this study was to determine the occurrence of *V. vulnificus* in fish caught in the Lagoa dos Patos estuary, to establish the relationship between biofilm formation and sublethal stress and to verify the resistance of the isolates to antibiotics and sanitizers. A total of 217 isolates characteristic of *Vibrio* sp. obtained from 318 samples of fish caught in the Lagoa dos Patos estuary from 2012 to 2016. The isolates were submitted to identification by the polymerase chain reaction technique using primers for the *cth* specific gene of *V. vulnificus*, after which the confirmed strains were submitted to verification of the formation of biofilm in microtiter plates with lids, biofilm formation after sublethal stresses with different temperatures, pH and saline concentrations. Subsequently, the confirmed isolates were submitted to the verification of the ability to form biofilm, the effect of sublethal stresses (different temperatures, pH and saline concentrations) on biofilm formation was studied and antimicrobial resistance was evaluated by disc diffusion technique and minimum inhibitory concentration, in microtiter plates, and Minimum Bactericidal Concentration with sanitizers sodium hypochlorite (1%) and chlorine dioxide (7%). *V. vulnificus* was isolated from *P. orbignyanus* and *M. furnieri*. The isolates were able to form biofilm. However, this capacity was decreased or eliminated after exposure to sublethal stress. The isolates showed resistance to most of the antimicrobials tested and were not sensitive to any of the antibiotics, differently from what is found in the literature. The CBM results showed that the concentrations of sodium hypochlorite and chlorine dioxide required to kill *V. vulnificus* are higher than those commonly used in the fish industry. This is the first report of isolation of *V. vulnificus* from fish caught in the Lagoa dos Patos.

Palavras-chave: *Micropogonias furnieri*; *Mugil platanus*; *Paralichthys orbignyanus*; *Farfantepenaeus paulensis*; sodium hypochlorite.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 Introdução..... | 6 |
| 1.1 Revisão bibliográfica..... | 6 |
| 1.1.1 Formação de biofilme por <i>V. vulnificus</i>..... | 10 |
| 1.1.2 Resistência a antimicrobianos..... | 11 |
| 1.1.3 Resistência a sanitizantes..... | 12 |
| 2 Hipótese..... | 12 |
| 3 Objetivos..... | 12 |
| 3.1 Gerais..... | 12 |
| 3.2 Específicos..... | 13 |
| 4 Material e métodos..... | 13 |
| 4.1 Coleta das amostras..... | 13 |
| 4.2 Recuperação dos isolados..... | 14 |
| 4.3 Extração do DNA..... | 15 |
| 4.4 Identificação de <i>V. vulnificus</i>..... | 15 |
| 4.5 Verificação da formação de biofilme em placas..... | 16 |
| 4.6 Formação de biofilme após estresse subletal..... | 17 |
| 4.7 Resistência a antimicrobianos..... | 17 |
| 4.8 Resistência a sanitizantes..... | 18 |
| 5 Resultados e discussão..... | 19 |
| 5.1 Ocorrência de <i>V. vulnificus</i>..... | 19 |
| 5.2 Formação de biofilme em placas e após estresse subletal..... | 20 |
| 5.3 Resistência a antimicrobianos..... | 22 |
| 5.4 Resistência a sanitizantes..... | 24 |
| 6 Conclusões..... | 25 |
| Referências bibliográficas..... | 25 |
| Projeto..... | 33 |

INTRODUÇÃO

1.1 Revisão bibliográfica

O estuário da Lagoa dos Patos, no extremo sul do Brasil, ocupa uma área de 963,8 km² (10% da área total desta laguna), recebendo água dos rios localizados na sua porção norte e da Lagoa Mirim, ao sul, através do Canal São Gonçalo (CALLIARI, 1998). O estuário representa uma importante área de criação para várias espécies de peixes e crustáceos de valor comercial, configurando-se como um polo pesqueiro artesanal de importância destacada no abastecimento de pescados no sul do Brasil (REIS, 1999). Para garantir a qualidade desses alimentos, é necessário o correto manuseio durante a captura, o processamento, a estocagem e a comercialização.

Segundo Baldisserotto (2009), o estuário da Lagoa dos Patos é a região do Rio Grande do Sul com maior representatividade quanto ao número de pescadores artesanais no estado, sendo que boa parte atua sem documentação profissional e a maioria tem baixa escolaridade (GARCEZ & SÁNCHEZ-BOTERO, 2011). Esses fatores podem contribuir para a comercialização informal e para negligências em relação aos cuidados higiênico-sanitários na manipulação dos pescados.

O pescado pode ser contaminado no oceano e assim permanecer após a captura, durante o transporte, manipulação, contato com o gelo, superfícies, equipamentos, processamento na indústria e no ambiente de estocagem e de comercialização (HUSS, 1997; OGAWA & MAIA, 1999; CARDOSO et al., 2003). Os estabelecimentos industriais de carnes e derivados têm exigências específicas de estrutura e produção, de ordem higiênico-sanitária, visando a manter condições favoráveis no sentido de evitar contaminações que causem danos ao produto e/ou ao consumidor (SANTOS et al., 2001).

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são geralmente infecções ou intoxicações causadas por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas que são transmitidos para o homem através de alimentos ou água contaminados. Alguns patógenos alimentares podem causar diarreia grave ou infecções debilitantes,

incluindo meningite e septicemia. As DTA podem levar a incapacidades de longa duração e à morte. Exemplos de alimentos inseguros incluem produtos de origem animal mal cozidos e vegetais contaminados com fezes (WHO, 2015).

Vibrio é um gênero de bactérias Gram-negativas, móveis, geralmente com um único flagelo polar. São microrganismos de ambientes tipicamente marinhos e estuarinos que podem ser isolados de peixes e crustáceos, sendo capazes também de se multiplicar sem hospedeiro em águas marinhas (CDC, 2016). Muitos casos de vibrioses não são detectados, pois a identificação deste microrganismo não costuma fazer parte da rotina laboratorial. *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. mimicus* são as principais espécies reportadas como agentes infecciosos para humanos. *V. vulnificus* é considerado o mais patogênico, podendo causar septicemia e morte (SILVEIRA et al., 2016).

V. vulnificus é semelhante a *V. parahaemolyticus* em ágar TCBS, mas pode ser diferenciado por várias reações bioquímicas, como a atividade da β -galactosidase ou crescimento em diferentes concentrações salinas. *V. vulnificus* causa septicemia e morte após a ingestão de frutos do mar ou após infecções em ferimentos provenientes do ambiente marinho. Ensaio como PCR foram desenvolvidos para detectar e identificar esse patógeno (KAYSNER & DE PAOLA, 2004).

V. vulnificus é o patógeno alimentar mais fatal nos Estados Unidos, e possivelmente no mundo, com uma taxa de mortalidade de cerca de 50%, representando 95% de todas as mortes relacionadas ao consumo de pescados nos EUA. Estes índices excedem os de outros patógenos alimentares, como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Clostridium botulinum*. Embora a dose infectante não seja conhecida, estipula-se que 100 células ou menos possam ocasionar a doença em indivíduos que tenham algum fator predisponente (OLIVER, 2015). Estudos realizados na América do Sul relatam a necessidade de mais pesquisas relacionadas à detecção de *V. vulnificus*. A presença deste microrganismo tem sido registrada nas águas ao longo da costa atlântica da América do Sul. Porém, apesar de sua importância como causador de DTA, ainda é pouco pesquisado como contaminante de pescados (GIVENS et al., 2014).

No Brasil, os relatos de contaminação por *V. vulnificus* têm sido associados principalmente a ostras. Casos de diarreia e sepse foram relatados nos estados de

São Paulo, Bahia e Ceará (ARAUJO et al., 2007). *V. vulnificus* foi isolado de um peixe, de 21 coletados em mercado público na Bahia, demonstrando sua capacidade de contaminar pescados na costa brasileira e se manter viável no mercado varejista. Os autores atribuíram a contaminação à infraestrutura e refrigeração inadequadas (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2017).

Recentemente, *Vibrio parahaemolyticus*, espécie patogênica que também está associada ao consumo de pescados contaminados, foi isolado de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos, demonstrando a ocorrência da bactéria na região e a consequente contaminação dos pescados. O microrganismo foi isolado de *Micropogonias furnieri* (corvina), *Mugil platanus* (tainha), *Paralichthys orbignyanus* (linguado) e *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa) (ROSA et al., 2016; MILAN et al., 2015). Como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* possuem várias características semelhantes e habitam os mesmos ambientes, a presença de uma dessas espécies pode levantar a possibilidade da ocorrência também da outra (BLACKWELL & OLIVER, 2008).

Existe uma carência de informações relacionadas ao isolamento de *V. vulnificus* em pescados, tanto no estuário da Lagoa dos Patos, quanto em toda a costa brasileira. Devido à importância como patógeno causador de DTA e à alta mortalidade associada a este microrganismo em países onde é pesquisado na rotina laboratorial, é necessário o conhecimento da sua possível ocorrência em pescados na região, assim como das características desses isolados que possam contribuir para seu efetivo controle nas plantas processadoras.

1.1.1 Formação de biofilme por *V. vulnificus*

Biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (DONLAN & COSTERTON, 2002). Existe uma alta prevalência de infecções relacionadas com biofilme, já que as bactérias, quando em biofilmes, podem ser mais resistentes a antibacterianos e alcançar número suficiente para representar uma potencial dose infectante (DAVIES, 2003). Na indústria alimentícia, os biofilmes são associados à contaminação de instalações e equipamentos (GÁMEZ et al., 2004). Conforme as características dos

microrganismos, os biofilmes podem ser produzidos sobre uma variedade de substratos, como aço inoxidável, vidro, borracha, entre outros (PARIZZI et al., 2004).

Em uma revisão realizada por Yildiz & Visick (2008), com espécies de *Vibrio*, com foco em *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. fischeri*, as mais intensamente estudadas quanto à formação de biofilme, foi concluído que os principais polissacarídeos envolvidos na formação de biofilme pelas espécies de *Vibro* são o polissacarídeo capsular (PSC), o exopolissacarídeo (EPS) e o polissacarídeo de *Vibrio* (VPS). Esses autores ainda ressaltam que as porções no genoma que codificam para a produção desses polissacarídeos parecem estar presentes nas espécies estudadas, porém, o que mais influencia na formação efetiva dos biofilmes, não é apenas a presença dos genes codificantes, e sim os mecanismos de regulação que diferem entre espécies e entre cepas, por isso os estudos são, na sua maioria, fenotípicos e moleculares e tentam elucidar os mecanismos de regulação envolvidos na formação dos biofilmes de *Vibrio* em diferentes condições de cultivo.

O principal fator de virulência de *V. vulnificus* é o PSC, que parece estar inversamente relacionado à capacidade de formar biofilme *in vitro* (JOSEPH & WRIGHT, 2004), porém o significado dessas relações para a estabilidade de *V. vulnificus* no ambiente não é conhecida (GULIG et al., 2005). São necessários mais estudos para avaliar a capacidade de formação de biofilme por isolados selvagens, que estão sobre pressão do ambiente, em situações de estresse diferentes.

Isolados de *V. vulnificus* que produzem colônias rugosas possuem menor motilidade, maior resistência ao soro humano e maior formação de biofilme. É possível que a maior formação de biofilme seja devido à perda da motilidade, uma vez que mutações em genes flagelares causam efeitos na expressão de biofilme (JONES & OLIVER, 2009).

Nakhamchik et al. (2008) após explorarem cepas de *V. vulnificus* com colônias translúcidas de mutantes acapsulares para estudo da composição genômica, concluíram que os genes que conferem opacidade poderiam codificar o PSC. Uma das cepas foi capaz de codificar diguanilato ciclase, uma enzima que sintetiza diGMP cíclico (c-di-GMP). O aumento dos níveis de c-di-GMP induziu a produção de EPS, outro polissacarídeo que contribui na formação de biofilme, provocando como consequência aumento na formação de biofilmes e na rugosidade,

de uma maneira independente do PSC. No entanto, o EPS não poderia compensar a perda de produção de PSC necessária para a virulência.

1.1.2 Resistência a antimicrobianos

Bactérias passam por várias divisões celulares e multiplicam-se rapidamente, assim, algumas células podem adquirir mutações genéticas aleatórias e estas podem proporcionar resistência a algum antibiótico, adquirindo assim uma vantagem competitiva quando confrontada com esse antibiótico. A maioria das bactérias é resistente a alguns antibióticos (DECAMP & MORIARTY, 2006).

É importante enfatizar que o antimicrobiano não induz a resistência e sim atua como um agente de seleção das estirpes mais resistentes em meio de uma população. A resistência pode ser natural ou adquirida, sendo que a natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

Após análise do perfil de resistência à antibióticos de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nos Estados Unidos, Itália, Brasil, Filipinas, Malásia, Tailândia, China, Índia, Irã, África do Sul e Austrália concluiu-se que a resistência antimicrobiana desses dois agentes patogênicos não está tão bem documentada comparando-se com outras bactérias patogênicas transmitidos pelos alimentos. Os perfis de resistência aos antibióticos mais frequentemente observados envolveram ampicilina e tetraciclina, independentemente do país. A presença de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos em pescados e em ambientes aquáticos é uma preocupação importante pelo risco iminente à saúde humana (ELMAHDI et al., 2016).

Os antibióticos recomendados nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013) para tratar infecções causadas por *Vibrio* em adultos, de modo geral, são considerados eficazes na supressão do crescimento bacteriano, enquanto alguns antimicrobianos recomendados para tratamento pediátrico não são efetivos contra alguns isolados de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* recuperados no país (SHAW et al., 2014). Como no Brasil o isolamento de *Vibrio* não faz parte da rotina laboratorial, nem de amostras de alimentos, nem de amostras clínicas, a escolha do antimicrobiano para tratamento pode ser errônea, diferindo a sensibilidade aos antimicrobianos de outras regiões.

Uma técnica utilizada para a determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos é o antibiograma pelo método de difusão em disco também denominada teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA). O teste fornece resultados qualitativos. É uma das técnicas de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizada pelos laboratórios de microbiologia. O princípio básico é a semeadura do microrganismo em estudo sobre a superfície de um ágar e posterior colocação de discos impregnados com os antimicrobianos a fim de determinar a sensibilidade (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2013).

1.1.3 Resistência a sanitizantes

O hipoclorito de sódio é o sanitizante mais utilizado na indústria de pescados pela alta eficiência e baixo custo. A concentração da solução pode variar de acordo com o local, objetivo da aplicação e a legislação. Os compostos clorados possuem o mesmo mecanismo de ação, com exceção do dióxido de cloro. A quantidade de cloro disponível varia conforme o pH da solução. Na forma mais utilizada, o hipoclorito de sódio encontra-se acima de pH 7,6 (MOHAMMADI, 2008; ESTRELA et al., 2002). O hipoclorito de sódio é de ação rápida, não colorífico e barato. Seu uso é limitado pelo efeito corrosivo e pela sua relativa instabilidade (QUINN et al., 2005).

O dióxido de cloro age realizando a transferência de elétrons, afetando a estabilidade da membrana celular e provocando desidratação e oxidação dos componentes internos dos microrganismos, sem causar ações tóxicas ao ser humano como a maioria dos compostos de cloro (ANDRADE & MACEDO, 1996). O dióxido de cloro vem sendo utilizado como uma alternativa ao uso do hipoclorito de sódio, uma vez que gera uma quantidade reduzida de subprodutos, como trihalometanos e cloraminas. O Dioxiplus® é um produto comercial a base de dióxido de cloro estabilizado a 7% e destinado a sanitização de alimentos e equipamentos, fabricado pela Dioxide Indústria Química LTDA. Não existem relatos da utilização deste produto em indústrias de pescados, nem da sua ação, na forma líquida, frente a *V. vulnificus*.

Estudos vêm sendo realizados a fim de determinar métodos de desinfecção eficientes contra cepas de *V. vulnificus* formadoras de biofilme. Recentemente, a

proteína CabA, uma proteína da matriz extracelular responsável por deixar os biofilmes mais robustos, vem sendo estudada quanto ao aumento de resistência frente a hipoclorito de sódio. Os biofilmes formados por mutantes CabA (cujo gene que codifica a proteína foi deletado) em ostras são defeituosos em biomassa e apresentam resistência ao desprendimento e desinfecção com hipoclorito de sódio 10 ppm. As células bacterianas nos biofilmes de tipo selvagem são agrupadas por filamentos, e resistem ao sanitizante (PARK et al., 2016).

Grau et al. (2008), após a realização de ensaios de resistência ao hipoclorito de sódio 3 µg/mL, constataram que as cepas opaca lisa e opaca rugosa, ou seja encapsuladas, foram eliminadas, enquanto as cepas translúcida lisa e translúcida rugosa, não encapsuladas, sobreviveram. Os autores estabeleceram uma correlação entre a expressão de CPS e a sensibilidade ao cloro de *V. vulnificus* nos biofilmes, enfatizando a importância do CPS para a virulência de *V. vulnificus*.

Os estudos que relacionam hipoclorito de sódio e *V. vulnificus* são direcionados ao combate de biofilmes deste patógeno, não havendo resultados disponíveis sobre o combate das células planctônicas. Quanto ao dióxido de cloro, há maior carência de informações, já que não é um composto clorado comumente utilizado no combate de microrganismos veiculados pelos pescados. Por esses motivos, são necessários mais estudos quanto à sensibilidade de *V. vulnificus* aos dois compostos clorados para verificação da utilidade dos sanitizantes no combate ao patógeno.

2 HIPÓTESE

V. vulnificus capazes de formar biofilme em diferentes condições de estresse, são resistentes a antimicrobianos e a sanitizantes e podem ser isolados de pescados capturados na Lagoa dos Patos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar a ocorrência de *V. vulnificus* em pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos e verificar a capacidade de formar biofilmes e a resistência a antibióticos e sanitizantes dos isolados.

3.2 Específicos

Isolar *V. vulnificus* de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos.

Verificar a capacidade dos isolados formarem biofilme.

Submeter os isolados a diferentes tipos de estresse e verificar possíveis efeitos na formação de biofilme.

Verificar a resistência dos isolados a antimicrobianos.

Verificar a sensibilidade dos isolados aos sanitizantes hipoclorito de sódio e dióxido de cloro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Foram analisados 217 isolados característicos de *Vibrio* sp. obtidos nos trabalhos de Milan et al. (2016), Rosa et al. (2016) e Rosa et al. (2017) a partir de 318 amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos nos anos de 2012 a 2016 (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados característicos de *Vibrio* sp. em meio Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia, Mumbai, Índia) obtidos a partir de amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos utilizados no presente estudo.

| Espécie | Referências | Nº de isolados | Nº de amostras |
|--|---------------------|----------------|----------------|
| <i>Mugil platanus</i> (tainha) | Milan et al. (2016) | 11 | 10 |
| | Rosa et al. (2016) | 38 | 30 |
| | Rosa et al. (2017) | 21 | 50 |
| | Total | 70 | 90 |
| <i>Micropogonias furnieri</i> (corvina) | Milan et al. (2016) | 9 | 10 |
| | Rosa et al. (2016) | 56 | 60 |
| | Rosa et al. (2017) | 8 | 35 |
| | Total | 73 | 105 |
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> (linguado) | Milan et al. (2016) | 12 | 20 |
| | Rosa et al. (2016) | 42 | 40 |
| | Rosa et al. (2017) | 2 | 35 |
| | Total | 66 | 95 |
| <i>Netuna barba</i> (bagre) | Milan et al. (2016) | 0 | 3 |
| | Total | 0 | 3 |
| <i>Farfantepenaeus paulensis</i> (camarão-rosa) | Milan et al. (2016) | 16 | 13 |
| | Rosa et al. (2017) | 2 | 12 |
| | Total | 2 | 12 |

4.2 Recuperação dos isolados

Os isolados, mantidos a -20 °C em Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) com 1% de cloreto de sódio (APA 1% NaCl) e 20% de glicerol, foram recuperados em APA 1% NaCl durante 24 h a 37 °C, em duas culturas consecutivas, sempre que necessário.

4.3 Extração de DNA

Os DNAs dos isolados foram extraídos conforme Sambrook & Russel (2001). Resumidamente, o pellet obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em foi ressuspendido em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -20 °C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4), foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído foi estocado a -20 °C.

4.4 Identificação de *V. vulnificus*

Para identificação de *V. vulnificus*, os isolados de *Vibrio* foram analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa do gene *cth*, que codifica especificamente citolisina em *V. vulnificus*, conforme Hill et al. (1991), com os *primers* recomendados por Kaysner & de Paola (2004) (Tabela 2). Cada reação teve um volume final de 25 µL. Foram utilizados 12,5 µL de Master Mix, 1,25 µL de cada *primer*, 2 µL de DNA e 8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94 °C por 10 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min e 45 seg, anelamento dos *primers* a 67 °C por 2 min, extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,8%. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *V. vulnificus* ATCC 27562.

Tabela 2. *Primers* utilizados na identificação de *V. vulnificus*.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' a 3') | Tamanho da amplificação (pb) | Referência |
|---------------|----------------------|------------------------------|---------------------------|
| Vvh-785F | CCGCGGTACAGGTTGGCGCA | 519 | Kaysner & de Paola (2004) |
| Vvh-1303R | CGCCACCCACTTTCGGGCC | | |

4.5 Verificação da formação de biofilme em placas

Os isolados foram avaliados, em triplicata, quanto à sua capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica descrita por Janssens et al. (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *V. vulnificus*. Foram colocados 100 µL de APA 1% NaCl em cada poço da placa de microtitulação e adicionados 100 µL de culturas *overnight* em APA 1% NaCl de cada isolado padronizados em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo APA 1% NaCl, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. A tampa foi colocada sobre a placa, que foi incubada durante 48 h a 37 °C sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes se formaram sobre a superfície das filodades das tampas. Após o período de incubação, as tampas foram lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material que permaneceu ligado à tampa foi corado durante 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa foi seca em temperatura ambiente por 30 min. O corante que permaneceu ligado ao biofilme foi extraído para nova placa com ácido acético glacial 30% (200 µL). Para quantificação da formação de biofilmes, a DO₅₇₀ de cada poço foi medida utilizando leitor de placas de microtitulação. Cada isolado foi classificado como não formador de biofilme, fracamente formador, moderadamente formado ou fortemente formador, de acordo com os procedimentos sugeridos por Stepanovic et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles e a classificação foi determinada conforme segue.

DO ≤ DOc = não formador

DOc < DO ≤ 2 x DOc = fraco formador

$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ = moderado formador

$4 \times DOc < DO$ = forte formador

4.6 Formação de biofilme após estresse subletal

Concomitantemente aos testes de avaliação da capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação, foram testadas culturas dos isolados após serem submetidos a estresse subletal, também em triplicata. Para a preparação das células aos choques de calor e frio, culturas *overnight* em APA 1% NaCl foram mantidas em banho-maria a 42 °C por 45 min e em 20 °C durante 4 h, de acordo com os métodos descritos por Chang et al. (2004) e Lin et al. (2004), respectivamente. As células também foram estressadas a 4 °C durante 4 h. Os procedimentos descritos por Wong et al. (1998) foram utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em APA 1% NaCl tiveram seu pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e foram incubadas a 37 °C durante 30 min. Para o teste em diferentes concentrações salinas, culturas *overnight* em APA 1% NaCl foram submetidas às concentrações de 0%, 2,5% e 5% de NaCl e incubadas a 37 °C durante 30 min. Essas concentrações salinas foram determinadas por Rosa et al. (2017) no estuário da Lagoa dos Patos, local de origem dos pescados utilizados neste estudo. Após estes procedimentos realizou-se a verificação da formação de biofilme da forma já descrita no item 4.5.

4.7 Resistência à antimicrobianos

Para a determinação da sensibilidade a antimicrobianos foi utilizada a técnica de disco-difusão com adaptações. As culturas em APA 1% NaCl foram padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de DO. Com o auxílio de zaragatoas estéreis, foi realizada semeadura uniformemente distribuída na superfície de ágar Mueller Hinton (Kasvi, Roseti Degli Abruzzi, Itália) com 1% de NaCl (ágar MH 1% NaCl). Com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, foram colocados os discos impregnados com os antimicrobianos sobre a superfície do meio inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003).

Para o teste de sensibilidade, foram selecionados antimicrobianos já utilizados em outros estudos e alguns outros adicionais: cloranfenicol 30 µg (HAN et al., 2007; OTTAVIANI et al., 2001; SUDHA et al., 2014), tetraciclina 30 µg (HAN et al., 2007; SUDHA et al., 2014), gentamicina 10 µg (HAN et al., 2007; SHAW et al., 2014; SUDHA et al., 2014), ampicilina 10 µg (HAN et al., 2007, SUDHA et al., 2014), ciprofloxacina 5 µg (HAN et al., 2007; BAKER-AUSTIN et al., 2009), norfloxacina 10 µg (OKOH & IGBINOSA, 2010), neomicina 30 µg, penicilina G 10 µg, enrofloxacin 5 µg e amicacina 30 µg.

Interpretação dos diâmetros das zonas de inibição seguiu as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (2008) ou o recomendado pelos fornecedores dos antimicrobianos.

Os testes foram realizados em triplicata.

4.8 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CIM e da CBM, foram utilizadas as técnicas descritas no documento National Committee for Clinical Laboratory Standards (2008), com adaptações, testando-se os sanitizantes hipoclorito de sódio a 1% e dióxido de sódio a 7%.

Para a realização do teste de CIM, os isolados foram semeados em Ágar Padrão para Contagem (PCA, Kasvi, Roseti Degli Abruzzi, Itália) com 2% de NaCl (PCA 2% NaCl) e incubados a 37 °C por 24 h. O ágar PCA não possui impedimentos e a concentração salina de 2% foi considerada ideal para cultivo neste meio após testes com diferentes concentrações (dados não mostrados). O inóculo foi preparado utilizando-se as colônias obtidas no PCA 2% NaCl, que foram diluídas em solução salina 1% e padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de DO que corresponde a concentração 10^8 UFC/mL. Após o ajuste, 0,5 mL da solução foi passada para 4,5 mL de caldo Mueller Hinton (MH, Kasvi, Roseti Degli Abruzzi, Itália) com 1% de NaCl (caldo MH 1% NaCl). Foram depositados 100 µL de caldo MH 1% NaCl em placas de microtitulação de 96 poços e adicionados 100 µL do sanitizante testado na primeira coluna. A partir desta, foram passados 100 µL sucessivamente para os demais poços, até dez diluições seriadas. Do último poço

de cada série, 100 µL foram descartados. O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se APA 1% NaCl, para verificar se há diferença entre a utilização destes meios. Foram considerados controles negativos os poços contendo apenas caldo MH 1% NaCl ou APA 1% NaCl, conforme o caso, e sanitizante e controles positivo os poços contendo caldo MH 1% NaCl ou APA 1% NaCl e água estéril em substituição ao sanitizante adicionados dos inóculos das culturas. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h, após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro considerando a presença ou ausência de turbidez do meio de cultura.

A CBM foi realizada de acordo com o descrito por Santurio et al. (2007). Foram retirados 10 µL dos poços sem crescimento, semeados em PCA 2% NaCl e incubados a 37 °C por 24 h. Após o período, a leitura foi realizada considerando-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano.

O experimento foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ocorrência de *V. vulnificus*

Dos 217 isolados analisados, obtidos dos 318 pescados amostrados, 3 (1%) foram identificados como *V. vulnificus*. Os pescados que albergavam o patógeno eram dois exemplares da espécie *P. orbignyanus* e um de *M. furnieri*. Os pescados contaminados estavam inteiros (amostras não evisceradas) e foram capturados nos meses de outubro e novembro de 2013. Este é o primeiro relato da ocorrência de *V. vulnificus* em *P. orbignyanus* e *M. furnieri* e o primeiro isolamento do patógeno de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos.

De Paola et al. (1994) quantificaram *V. vulnificus* em peixes, ostras, caranguejos, sedimentos e águas da Costa do Golfo do México e encontraram baixas densidades de *V. vulnificus* no inverno, tendo todos os isolamentos ocorridos na primavera, verão ou outono. Também no nosso estudo não houve isolamento durante o inverno, todas os isolados foram obtidos de pescados capturados durante a primavera. No estudo de Paola et al. (1994), o microrganismo foi mais frequentemente isolado de peixes *Archosargus probatocephalus* (sargo-de-dentes)

do que de sedimentos e água do mar. As densidades de *V. vulnificus* foram maiores (2 a 5 logs) em peixes estuarinos do que nas águas circundantes, sedimentos ou ostras e crustáceos. Esses achados também são compatíveis com o nosso estudo, no qual *V. vulnificus* foi encontrado apenas em peixes, não tendo sido obtido nenhum isolado do crustáceo *F. paulensis*.

O gênero *Paralichthys* é classificado como de peixes bentônicos (DE ASTARLOA & MUNROE, 1998), ou seja, que habitam o fundo das águas, apesar de terem a capacidade de natação, e estão em constante contato com o substrato que se encontra precipitado no fundo. Em estudo realizado por de Paola et al. (1994), *V. vulnificus* foi mais encontrado no conteúdo intestinal de peixes de alimentação de fundo, inclusive com contagens superiores a outras fontes pesquisadas. Da mesma forma, dois dos três isolados de *V. vulnificus* obtidos no nosso estudo foram encontrados em *P. orbignyanus*.

Já *M. furnieri*, segundo Denadai et al. (2015), na região sudeste do Brasil, alimenta-se basicamente de crustáceos e poliquetas, sendo a ingestão de bivalves considerada um comportamento oportunista, devido à grande presença desses organismos na área de estudo, o que demonstra que *M. furnieri* pode ser considerado um carnívoro, com preferência por organismos bentônicos. O estudo de Denadai et al. (2015) é o mais próximo à região sul do Brasil e confirma que *M. furnieri* possui hábitos alimentares demersais e também está em contato constante com o substrato e possivelmente com o *V. vulnificus* no fundo das águas.

Há carência de informações adequadas que permitam distinção entre cepas patogênicas e não patogênicas de *V. vulnificus*. Devido a isso, todas as cepas de *V. vulnificus* são consideradas igualmente patogênicas (STELMA JUNIOR et al., 1992). Apesar da ocorrência do patógeno ter sido baixa, o simples fato de este microrganismo ser encontrado viável em pescados em situação de comercialização, já é um risco para os consumidores pelo potencial de patogenicidade e pelo alto grau de mortalidade atribuído a *V. vulnificus*.

5.2 Formação de biofilme em placas e após estresse subletal

Os testes posteriores à identificação molecular foram realizados apenas com os isolados de *P. orbignyana*, aqui identificados como “37” e “38”, uma vez que o terceiro isolado foi perdido em função de problemas durante a estocagem.

Os dois isolados foram capazes de formar biofilme quando não submetidos a estresses subletais, sendo um isolado, 37, considerado fraco formador e o outro, 38, forte formador de biofilme. Não houve formação de biofilme pelo isolado 37 quando submetido às diferentes condições de estresse usadas no estudo. Já o isolado 38, quando submetido à temperatura de 4 °C tornou-se um fraco formador de biofilme, o mesmo aconteceu quando submetido à concentração de 0% de NaCl. Quanto às outras condições de estresse, também não foi observada formação de biofilme pelo isolado 38.

Jefferson (2004) relata que uma motivação por trás da formação do biofilme é a defesa, sendo uma resposta contra condições de estresse. Porém, nesse estudo foi observada maior formação de biofilme em condições ótimas de multiplicação.

Este é o primeiro estudo realizado com isolados selvagens de *V. vulnificus*, para avaliar o efeito destes fatores de estresse sobre a formação de biofilme. No entanto, um estudo semelhante realizado por Rosa et al. (2017) avaliou a formação de biofilme por *V. parahaemolyticus* submetido aos mesmos fatores de estresse usados no nosso trabalho e foi observado que a maioria dos isolados testados manteve a capacidade de formar biofilme inalterada e 25% dos isolados aumentaram sua capacidade de formar biofilme, ao contrário do que foi encontrado no presente estudo em que a formação de biofilme foi reduzida ou anulada após o estresse.

Estudos similares também foram realizados com outros microrganismos. Galvão et al. (2012) testaram a capacidade de formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* em diferentes concentrações de inóculo, disponibilidade de nutrientes, concentração de NaCl, tempo de incubação e pH e não encontraram relação entre fatores estressantes e aumento da adesão. Por outro lado, Lianou & Koutsoumanis (2012), avaliando *Salmonella enterica* isoladas de humanos e bovinos, observaram maior formação de biofilme em condições de pH, temperatura e concentração de NaCl menos favoráveis ao desenvolvimento desse

microrganismo. Esses resultados distintos demonstram que cada espécie apresenta suas particularidades frente a ambientes hostis, podendo formar ou não biofilme.

5.3 Resistência a antimicrobianos

O isolado 37 apresentou sensibilidade intermediária ao cloranfenicol e o isolado 38 à ciprofloxacina e à norfloxacina. Os dois isolados foram resistentes a todos os demais antimicrobianos testados.

De acordo com um levantamento realizado por Elmahdi et al. (2016) em diversos países, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* possuem perfis de resistência a antimicrobianos semelhantes. Há maior resistência frente aos antimicrobianos ampicilina, penicilina e tetraciclina independentemente do país de isolamento. Nossos resultados confirmam a afirmação desses autores, pois os dois isolados de *V. vulnificus* obtidos a partir de pescados capturados no Estuário da Lagoa dos Patos também apresentaram resistência a estes antimicrobianos, com halos de inibição de 0 mm de diâmetro. Os autores especulam que a resistência a antimicrobianos semelhantes, tanto ambientais como clínicos, não necessariamente seja gerada pela utilização errônea e/ou indiscriminada de antimicrobianos, mas sim que seja uma característica própria das espécies.

Tetraciclina era o antibiótico considerado de eleição em casos de infecções por *Vibrio* (MORRIS & TENNY, 1985). No entanto, estudos recentes apontam que tanto *V. parahaemolyticus* quanto *V. vulnificus* desenvolveram resistência a tetraciclina (LABELLA et al., 2013; PAN et al., 2013), o que foi corroborado pelo nosso trabalho que evidenciou a resistência à tetraciclina em ambos os isolados (Figura 1). Rebouças et al. (2011), após analisarem 31 isolados de *Vibrio* de fazendas de camarão (*Litopenaeus vannamei*) no Brasil e testarem a sensibilidade a 11 antimicrobianos pelo método de disco-difusão, demonstraram que os casos mais frequentes de resistência foram à ampicilina (45.2% dos isolados) e à tetraciclina (38.7%). Em nosso estudo, ambos os isolados foram resistentes também à ampicilina não havendo a presença de halos de inibição.

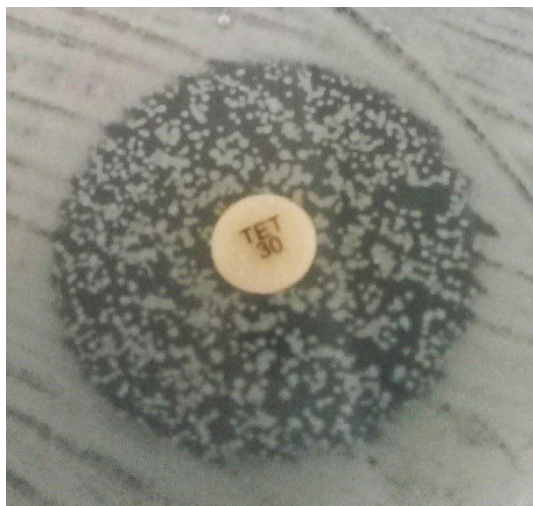


Figura 1: Teste de disco-difusão com *V. vulnificus* resistente à tetraciclina 30µg.

HAN et al (2007) testou através de CIM a sensibilidade de 319 cepas de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* frente a cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacina e ampicilina e constatou que os isolados de *V. vulnificus* eram suscetíveis a estes antimicrobianos. Os resultados indicaram que os medicamentos de primeira linha permanecem eficazes contra *V. vulnificus*. No nosso trabalho foram obtidos resultados diferentes, os dois isolados foram resistentes à tetraciclina, gentamicina e ampicilina, o isolado 38 apresentou resistência e o isolado 37 teve resistência intermediária ao cloranfenicol, o isolado 37 foi resistente e o isolado 38 intermediário à ciprofloxacina (Figura 1). Esses resultados distintos podem ter ocorrido pela diferença entre cepas ou pelo método e concentrações dos antimicrobianos utilizados.

Sudha et al. (2014) avaliaram a sensibilidade de isolados de *V. vulnificus* obtidos de camarão, caranguejo e mariscos na Índia frente a diversos antimicrobianos e verificaram sensibilidade a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e gentamicina, diferentemente de nossos isolados. Encontraram resistência intermediária frente à ciprofloxacina, como o isolado 38 no nosso trabalho, e resistência a cloranfenicol e gentamicina, como o isolado 38 quanto ao cloranfenicol e ambas frente à gentamicina. Outros trabalhos destacam a sensibilidade de *V. vulnificus* frente a cloranfenicol (OTTAVIANI et al., 2001), gentamicina (SHAW et al., 2014), ciprofloxacina (BAKER-AUSTIN et al., 2009) e norfloxacina (OKOH & IGBINOSA, 2010), diferentemente de nosso trabalho, demonstrando, mais uma vez, variação entre a sensibilidade das cepas de *V. vulnificus*.

Quanto à ação de neomicina, penicilina G, enrofloxacina e amicacina, não existem relatos na literatura, mas no presente trabalho demonstramos serem antimicrobianos inadequados para o tratamento de infecções por *V. vulnificus*.

5.4 Resistência a sanitizantes

A CIM foi determinada de acordo com a última diluição que não apresentou turbidez nas três repetições e a CBM foi determinada após semeadura das três últimas diluições que não apresentaram turbidez no teste de CIM em PCA com 1% NaCl (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM), em ppm, dos sanitizantes hipoclorito de sódio e dióxido de cloro frente a *V. vulnificus*.

| Cepa | Hipoclorito de sódio | | | | Dióxido de cloro | | | |
|-----------|-------------------------|-------|--------------------------|-------|------------------|-------|-------------|-------|
| | MH 1% NaCl ^a | | APA 1% NaCl ^b | | MH 1% NaCl | | APA 1% NaCl | |
| | CIM | CBM | CIM | CBM | CIM | CBM | CIM | CBM |
| 37 | 1.250 | 2.500 | 2.500 | 2.500 | 2.187 | 8.750 | 1.093 | 2.187 |
| 38 | 1.250 | 5.000 | 1.250 | 1.250 | 1.093 | 8.750 | 2.187 | 2.187 |

^a Caldo Mueller Hinton com 1% de NaCl; ^b Água Peptonada Alcalina com 1% de NaCl

Conforme os resultados obtidos nos métodos CIM e CBM, observou-se que os isolados multiplicaram-se melhor em caldo MH 1% NaCl do que no APA 1% NaCl (comumente utilizado para este método), sendo necessárias maiores concentrações de sanitizantes para eliminação do patógeno quando aquele meio foi utilizado. MH 1% NaCl é, portanto, o meio mais apropriado para a realização da CIM e da CBM de *V. vulnificus*.

A concentração da solução de hipoclorito de sódio recomendada pela legislação brasileira para a água de abastecimento é de 2 ppm de Cl₂ (BRASIL, 2017) e as concentrações comumente utilizadas na indústria de pescados para lavagem de filés, lavagem externa dos pescados e desinfecção de superfícies são

de 2, 5 e 20 ppm de Cl₂, respectivamente. Nenhuma delas foi eficiente no combate a *V. vulnificus* no nosso estudo. Esses resultados ressaltam a importância da revisão, por parte das indústrias de pescados, dos manuais de boas práticas com vistas ao controle da contaminação por *V. vulnificus*.

Alguns manuais, como o dos Centros Comunitários de Produção para entreposto de pescados (ELETROBRAS, 2015), recomendam a etapa de sanitização e desinfecção com hipoclorito de sódio, que pode ser realizada por contato por escoamento, imersão e/ou aspersão das partes, com uma solução a 100 ppm (para imersão) ou 200 ppm (para aspersão). Os materiais devem permanecer em contato com a solução por 15 minutos e após deve ser feito enxague com água. O objetivo é reduzir significativamente o número de microrganismos deteriorantes e eliminar os patogênicos, no entanto nosso estudo demonstrou que essa concentração não é suficiente para inibição de *V. vulnificus*, quiçá para a eliminação do microrganismo.

6 CONCLUSÕES

V. vulnificus pode ser isolado de *P. orbignyana* e de *M. furnieri* capturados no Estuário da Lagoa dos Patos. Os isolados testados, embora com intensidade distinta, são capazes de formar biofilme em condições favoráveis à multiplicação microbiana, no entanto, essa capacidade é diminuída ou eliminada após a exposição a estresses subletais.

V. vulnificus apresentou resistência à maioria dos antimicrobianos testados, confirmando a dificuldade de se encontrar antimicrobianos capazes de combater infecções causadas por esses microrganismos. As concentrações de hipoclorito de sódio e dióxido de cloro necessárias para eliminar *V. vulnificus* são mais elevadas do que aquelas usualmente utilizadas na indústria de pescados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. N.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

ARAUJO, M. R. E.; AQUINO, C.; SCARAMAL, E.; CIOLA, C. S.; SCHETTINO, G.; MACHADO, M. C. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and

literature review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 302- 305, 2007.

BAKER-AUSTIN, C.; MCARTHUR, J. V.; LINDELL, A. H.; WRIGHT, M. S.; TUCKFIELD, R. C.; GOOCH, J.; WARNER, L.; OLIVER, J.; STEPANAUSKAS, R. Multi-site analysis reveals widespread antibiotic resistance in the marine pathogen *Vibrio vulnificus*. **Microbial ecology**, v. 57, n. 1, p. 151-159, 2009.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Memorando nº 26/2017/CGPE/DIPOA/MAPA/SDA/MAPA. Orientações ao SIF sobre verificação oficial de água de abastecimento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 jul. 2017. Seção 1, p.1.

CALLIARI, L. J. O ambiente e a biota do Estuário da Lagoa dos Patos. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J. P. **Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil**. Rio Grande: Ecoscientia, 1998. p. 13-18.

CARDOSO, N. L. C.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de carne de peixe comercializada em supermercados da cidade de Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 109, p. 81-87, 2003.

CAZORLA, A. L.; FORTE, S. Food and feeding habits of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenyns, 1842) in Bahia Blanca Estuary, Argentina. **Hydrobiologia**, v. 549, n. 1, p. 251-257, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Vibrio* species causing vibriosis. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vibrio/faq.html>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. *Vibrio vulnificus*: General Information. In: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases DoF, Waterborne, and Environmental Disease, editor. 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vibrio/index.html>> Acesso em: 05 dez. 2017.

CHANG, C. M.; CHIANG, M. L.; CHOU, C. C. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2183-2188, 2004.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews**. Drug discovery, v. 2, n. 2, p.114, 2003.

DE ASTARLOA, J. M. D. & MUNROE, T. A. Systematics, distribution and ecology of commercially important paralichthyid flounders occurring in Argentinean-Uruguayan waters (*Paralichthys*, *Paralichthyidae*): an overview. **Journal of Sea Research**, v. 39, n. 1-2, p. 1-9, 1998.

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W. P. A segurança dos probióticos para a aquicultura. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 8, n. 2, p. 40-41, 2006.

DE PAOLA, A.; CAPERS, G. M.; ALEXANDER, D. Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the US Gulf Coast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 984-988, 1994.

DENADAI, M. R.; SANTOS, F. B.; BESSA, E.; FERNANDEZ, W. S.; LUVISARO, C.; TURRA, A. Feeding habits of whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Perciformes: Sciaenidae) in Caraguatatuba Bay, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 63, n. 2, p. 125-134, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

ELETROBRAS. 2015. Centro Comunitário de Produção para o Entrepósito de Pescado. Entrepósito de Pescado. Disponível em: <<http://www.iicabr.iica.org.br/wp-content/uploads/2015/11/Manual-CCP-Entrepósito-de-Pescado.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

ELMAHDI, S.; da SILVA, L. V.; PARVEEN, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. **Food microbiology**, v. 57, p. 128-134, 2016.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. L. C; MARCHESAN, M. A. PÉCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz Dent J.**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; DAMACENA, S. S.; CARDOSO, L. G.; MARQUES, V. F.; SILVA, I. P. Condições higiênicas sanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em Cachoeira, Bahia. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 60-74, 2017.

GALVÃO, N. N.; CHIARINI, E.; DESTRO, M. T.; AGUIAR FERREIRA, M. de; NERO, L. A. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. **Meat science**, v. 92, n. 4, p. 635-43, 2012.

GÁMEZ, C. I.; GALAVÍZ, J. R. G.; SILVA, L. G.; GARZA, Z. J. M.; VELARDE, M. S. T. Detección y prevalencia de *Vibrio* spp em cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Sonora durante o ciclo 2003. **Revista Salud Pública y Nutrición**, n. 6, 2004. Disponível em: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2004/resumenes_juany/70.htm>. Acesso em: 7 abr. 2017.

GARCEZ, D. S.; SÁNCHEZ-BOTERO, J. I. Comunidades de pescadores artesanais no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Atlântica**, v. 27, n. 1, p. 17-29, 2011.

GIVENS, C. E.; BOWERS, J. C.; DE PAOLA, A.; HOLLIBAUGH, J. T.; JONES, J. L. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*—potential roles for fish, oyster, sediment and water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 503-510, 2014.

GRAU, B. L.; HENK, M. C.; GARRISON, K. L.; OLIVIER, B. J.; SCHULZ, R. M.; O'REILLY, K. L.; PETTIS, G. S. Further characterization of *Vibrio vulnificus* rugose variants and identification of a capsular and rugose exopolysaccharide gene cluster. **Infection and immunity**, v. 76, n. 4, p. 1485-1497, 2008.

GULIG, P. A.; BOURDAGE, K.; STARKS, A. M. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 118-131, 2005.

HAN, F.; WALKER, R. D.; JANES, M. E.; PRINYAWIWATKUL, W.; GE, B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 7096-7098, 2007.

HILL, W. E.; KEASLER, S.P.; TRUCKSESS, M. W.; FENG, P.; KAYSNER, C. A.; LAMPEL, K. A. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 707–711, 1991.

HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v. 8, n. 2, p. 91-98, 1997.

JANSSENS, J. C.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D.; VERHOEVEN, T. L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; VOS, D. E.; KEERSMAECKER, S. C. J. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6639–6648, 2008.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm?. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.

JONES, M. K.; OLIVER, J. D. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 77, n. 5, p. 1723-1733, 2009.

JOSEPH, L. A.; WRIGHT, A. C. Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 889-893, 2004.

KAYSNER, C. A.; DE PAOLA Jr. *Vibrio*. U.S. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**, 2004. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070830.htm>>
. Acesso em: 12 abr. 2018.

LABELLA, A.; GENNARI, M.; GHIDINI, V.; TRENTO, I.; MANFRIN, A.; BORREGO, J. J.; LLEO, M. M. High incidence of antibiotic multi-resistant bacteria in coastal areas dedicated to fish farming. **Marine pollution bulletin**, v. 70, n. 1, p. 197-203, 2013.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171-8, 2012.

LIN, C., YU, R. C., CHOU, C. C. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 207-215, 2004.

MILAN, C.; AGOSTINETTO, A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; GONZALEZ, H. L.; TIMM, C. D. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 642-646, 2015.

MILAN, C.; SILVEIRA, D. R.; DA ROSA, J. V. & TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 2, p. 151-155, 2016.

MOHAMMADI, Z. Sodium hypochlorite in endodontics: na update review. **Int Dent J.**, v. 58, p. 329-341. 2008.

MORRIS, J. G.; TENNEY, J. Antibiotic therapy for *Vibrio vulnificus* infection. **Journal of American Medical Association**, v. 253, n. 8, p. 1121-1122, 1985.

NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. NCCLS document M7-6, Wayne, Pennsylvania. 2008.

NAKHAMCHIK, A.; WILDE, C.; ROWE-MAGNUS, D. A. Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 13, p. 4199-4209, 2008.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pescas**: Ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Varela, 1999. 430 p.

OKOH, A. I. & IGBINOSA, E. O. Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 143, 2010.

OLIVER, J. D. The biology of *Vibrio vulnificus*. **Microbiol Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1-2, 2015.

OTTAVIANI, D.; BACCHIOCCHI, I.; MASINI, L.; LEONI, F.; CARRATURO, A.; GIAMMARIOLI, M.; SBARAGLIA, G. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **International journal of antimicrobial agents**, v. 18, n. 2, p. 135-140, 2001.

PAN, J.; ZHANG, Y.; JIN, D.; DING, G.; LUO, Y.; ZHANG, J.; MIE, L.; ZHU, M.; Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Vibrio vulnificus* in retail shrimps in Hangzhou, People's Republic of China. **Journal of food protection**, v. 76, n. 12, p. 2063-2068, 2013.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. D.; SILVA, C. A. D. S.; SOARES, N. D. F. F., SILVA, E. A. M. D. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PARK, J. H.; LEE, B.; JO, Y.; CHOI, S. H. Role of extracellular matrix protein CabA in resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to decontamination strategies. **International journal of food microbiology**, v. 236, p. 123-129, 2016.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. & LEONARD, F. C. 2005. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora.

REBOUÇAS, R. H.; DE SOUSA, O. V.; LIMA, A. S.; VASCONCELOS, F. R.; DE CARVALHO, P. B.; DOS FERNANDES VIEIRA, R. H. S. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environmental research**, v. 111, n. 1, p. 21-24, 2011.

REIS, E. G. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: História e administração pesqueira. In: ALVES, F. N. **Por uma história multidisciplinar do Rio Grande**. Rio Grande: FURG, 1999. p. 81-84.

ROSA, J. V.; DA SILVA, C. J.; BARBOSA, F.; BAIROS, J.; DUVAL, E. H.; HELBIG, E.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolates in fish species captured from the Lagoa dos Patos estuary. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1345-1354, 2016.

ROSA, J. V. da; KAËFER, K.; CONCEIÇÃO, N. V. da; CONCEIÇÃO, R. C. S da; TIMM, C. D. Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 339-345, 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SANTOS, I. F. dos; SOUZA, E. R. de; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. v. 1. Goiânia: UFG, 2001. 623p.

SANTURIO M. J.; SANTURIO D. F.; POZZATI P.; MORAES C.; FRANCHIN P. R.; ALVES S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e

canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SHAW, K. S.; GOLDSTEIN, R. E. R.; HE, X.; JACOBS, J. M.; CRUMP, B. C.; SAPKOTA, A. R. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. **PLoS One**, v. 9, n. 2, e. 89616. 2014.

SILVEIRA, D. R.; MILAN, C.; DA ROSA, J. V.; TIMM, C. D. Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 01-07, 2016.

STELMA JUNIOR, G. N.; REYES, A. L.; PEELER, J. T.; JOHNSON, C. H.; SPAULDING, P. L. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2776-2782, 1992.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

SUDHA, S.; MRIDULA, C.; SILVESTER, R.; HATHA, A. A. M. Prevalence and antibiotic resistance of pathogenic vibrios in shellfishes from Cochin market. **Indian Journal of Geo-Marine Science**, v. 43, n. 5, p. 815-824, 2014.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.

WONG, H. C.; PENG, P. Y.; HAN, J. M.; CHANG, C. Y.; LAN, S. L. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3066-3071, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Food safety**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 25 abr. 2017.

YILDIZ, F. H.; VISICK, K. L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. **Trends in microbiology**, v.17, n.3, p.109-118, 2009.

Anexos



LABORATÓRIO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS

DE ORIGEM ANIMAL - LIPOA

Faculdade de Veterinária
Universidade Federal de Pelotas
Campus Capão do Leão, prédio 34
Capão do Leão, RS, CEP: 96010-900

Web: www.ufpel.tche.br/veterinaria/inspleite



PROJETO DE PESQUISA

1. TÍTULO

Isolamento de *Vibrio vulnificus* de pescados do estuário da Lagoa dos patos e teste de formação de biofilme e resistência a sanitizantes dos isolados

2. EQUIPE

Cláudio Dias Timm

Débora Rodrigues Silveira

Janaína Viana da Rosa

3. RESUMO

O estuário da Lagoa dos Patos representa uma importante área de criação para várias espécies de peixes e crustáceos de valor comercial, configurando-se como um polo pesqueiro artesanal de importância destacada no abastecimento de pescados no sul do Brasil. O pescado pode ser contaminado no oceano, e permanecer na indústria, ou após a captura, durante o transporte, manipulação, contato com o gelo, superfícies, equipamentos, e no ambiente de estocagem e de comercialização. Estudos realizados na América do Sul relatam a necessidade de mais pesquisas relacionadas à detecção de *Vibrio vulnificus*. A presença deste micro-organismo tem sido registrada nas águas ao longo da costa atlântica da América do Sul. Porém, apesar de sua importância como causador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), ainda é pouco pesquisado como contaminante de pescados. O principal objetivo deste estudo é determinar a ocorrência de *V. vulnificus* em pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos e estabelecer a relação entre formação de biofilme e estresses subletais. Serão analisados 217 isolados característicos de *Vibrio* sp. obtidos a partir de 318 amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos nos anos de 2012 a 2016. Os isolados

serão submetidos à identificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos para a espécie, posteriormente as cepas confirmadas serão submetidas à verificação da formação de biofilme em placas de microtitulação com tampas, formação de biofilme após estresses subletais com diferentes temperaturas e pH, verificação da formação de biofilme em diferentes superfícies, e por fim, testes de sensibilidade a desinfetantes. Os dados obtidos serão analisados estatisticamente.

Palavras-chave: *Micropogonias furnieri*, *Mugil platanus*, *Paralichthys orbignyanus*, *Farfantepenaeus paulensis*, hipoclorito de sódio, iodo.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DO TEMA E JUSTIFICATIVA

O estuário da Lagoa dos Patos, no extremo sul do Brasil, ocupa uma área de 963,8 km² (10% da área total desta laguna), recebendo água dos rios localizados na sua porção norte e da Lagoa Mirim, ao sul, através do Canal São Gonçalo (CALLIARI, 1998). O estuário representa uma importante área de criação para várias espécies de peixes e crustáceos de valor comercial, configurando-se como um polo pesqueiro artesanal de importância destacada no abastecimento de pescados no sul do Brasil (REIS, 1999). Para garantir a qualidade desses alimentos, é necessário o correto manuseio durante a captura, o processamento, a estocagem e a comercialização.

Segundo Baldisserotto (2009), o estuário da Lagoa dos Patos é a região do Rio Grande do Sul com maior representatividade quanto ao número de pescadores artesanais no estado, sendo que boa parte atua sem documentação profissional e a maioria tem baixa escolaridade (GARCEZ & SÁNCHEZ-BOTERO, 2011). Esses fatores podem contribuir para a comercialização informal e para negligências em relação aos cuidados higiênico-sanitários na manipulação dos pescados.

O pescado pode ser contaminado no oceano e permanecer após o processamento na indústria, ou após a captura, durante o transporte, manipulação, contato com o gelo, superfícies, equipamentos, e no ambiente de estocagem e de comercialização (HUSS, 1997; OGAWA & MAIA, 1999; CARDOSO et al., 2003). Os estabelecimentos industriais de carnes e derivados têm exigências específicas de estrutura e produção, de ordem higiênico-sanitária, visando a manter condições favoráveis no sentido de evitar contaminações que causem danos ao produto e/ou ao consumidor (SANTOS et al., 2001).

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são geralmente infecções ou intoxicações causadas por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas que são transmitidos para o homem através de alimentos ou água contaminados. Alguns patógenos alimentares podem causar diarreia grave ou infecções debilitantes, incluindo meningite e septicemia. As DTA podem levar a incapacidades de longa duração e à morte. Exemplos de alimentos inseguros incluem alimentos não cozidos de origem animal, frutas e vegetais contaminados com fezes e crustáceos crus (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Vibrio é um gênero de bactérias Gram-negativas, móveis, geralmente com um único flagelo polar. São micro-organismos de ambiente tipicamente marinho e estuarino que podem ser isoladas de peixes e crustáceos, sendo capazes também de se multiplicar sem hospedeiro em águas marinhas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). Muitos casos de vibrioses não são detectados, pois a identificação deste micro-organismo não costuma fazer parte da rotina laboratorial. *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. mimicus* são as principais espécies reportadas como agentes infecciosas para humanos. *V. vulnificus* é considerado o mais patogênico, podendo causar septicemia e morte (SILVEIRA et al., 2016).

V. vulnificus é o patógeno alimentar mais fatal nos Estados Unidos, e possivelmente no mundo, com uma taxa de mortalidade de cerca de 50%, representando 95% de todas as mortes relacionadas ao consumo de pescados nos EUA. Estes índices excedem o de outros patógenos alimentares, como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Clostridium botulinum*. Embora a dose infectante não seja conhecida, estipula-se que 100 células ou menos possam ocasionar a doença em indivíduos que tenham algum fator predisponente (OLIVER, 2015). Estudos realizados na América do Sul relatam a necessidade de mais pesquisas relacionadas à detecção de *V. vulnificus*. A presença deste micro-organismo tem sido registrada nas águas ao longo da costa atlântica da América do Sul. Porém, apesar de sua importância como causador de DTA, ainda é pouco pesquisado como contaminante de pescados (GIVENS et al., 2014).

No Brasil, os relatos de contaminação por *V. vulnificus* têm sido associados principalmente a ostras. Casos de diarreia e sepse foram relatados nos estados de São Paulo, Bahia e Ceará (ARAÚJO et al., 2007). *V. vulnificus* foi isolado de um peixe, de 21 coletados em mercado público na Bahia, demonstrando sua capacidade de contaminar pescados na costa brasileira e se manter viável no mercado varejista. Os autores atribuíram a contaminação a infraestrutura e refrigeração inadequadas (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2017).

Recentemente, *Vibrio parahaemolyticus*, espécie patogênica que também está associada ao consumo de pescados contaminados, foi isolado de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos, demonstrando a ocorrência da bactéria na região e a consequente contaminação dos pescados. O micro-organismo foi isolado de *Micropogonias furnieri* (corvina) e *Mugil platanus* (tainha), *Paralichthys orbignyanus* (linguado) e *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa) (ROSA et al., 2016; MILAN et al., 2015). Como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* possuem várias características semelhantes e habitam os mesmos ambientes, a presença de uma dessas espécies pode levantar a possibilidade da ocorrência também da outra (BLACKWEL & OLIVER, 2008).

Biofilme é uma comunidade de micro-organismos sésseis caracterizada por células que se aderem a uma superfície, embebidas em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (DONLAN & COSTERTON, 2002). Existe uma alta prevalência de infecções relacionadas com biofilme, já que as bactérias, quando em biofilmes, podem ser até 1000 vezes mais resistentes a antibacterianos e pode conter número suficiente de bactérias para representar uma potencial dose infectante (DAVIES, 2003). Na indústria alimentícia, os biofilmes são associados à contaminação de instalações e equipamentos (GÁMEZ et al., 2004). Conforme as características dos micro-organismos, os biofilmes podem ser produzidos sobre uma variedade de substratos, como aço inoxidável, vidro, borracha, entre outros (PARIZZI et al., 2004).

O principal fator de virulência de *V. vulnificus* é seu polissacarídeo capsular, que parece estar inversamente relacionada à sua capacidade de formar biofilme *in vitro* (JOSEPH & WRIGHT, 2004), porém o significado dessas relações para a estabilidade de *V. vulnificus* no ambiente não é conhecida (GULIG et al., 2005). São necessários mais estudos para elucidar a capacidade de formação de biofilme por cepas selvagens, que estão sobre pressão do ambiente, tanto em superfícies como em situações de estresse diferentes.

Existe uma carência de informações relacionadas ao isolamento de *V. vulnificus* em pescados, tanto no estuário da Lagoa dos Patos, quanto em toda a costa brasileira. Devido à importância como patógeno causador de DTA e à alta mortalidade associada a este micro-organismo em países onde é pesquisado na rotina laboratorial, é necessário o conhecimento da sua possível ocorrência em pescados na região, assim como das características desses isolados que possam contribuir para seu efetivo controle nas plantas processadoras.

Hipótese

V. vulnificus pode ser isolado de peixes e camarão capturados na Lagoa dos Patos, alguns isolados podem formar biofilme em diferentes superfícies e serem resistentes a determinados sanitizantes.

5. OBJETIVOS

Geral

Determinar a ocorrência de *Vibrio vulnificus* em pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos e estabelecer a relação entre formação de biofilme e estresses subletais e sanitizantes.

Específicos

- Verificar a capacidade dos isolados formarem biofilme;
- Submeter os isolados a diferentes tipos de estresse e verificar possíveis efeitos na formação de biofilme.
- Verificar a formação de biofilme em diferentes superfícies de materiais usualmente utilizados em equipamentos industriais;
- Verificar a capacidade dos isolados formarem biofilme na superfície do exoesqueleto de camarões e dos opérculos dos peixes;
- Verificar se a formação de biofilme por *V. vulnificus* aumenta a resistência a sanitizantes.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

4.1. Coleta das amostras

Serão analisados 217 isolados característicos de *Vibrio* sp. obtidos nos trabalhos de MILAN et al. (2016), ROSA et al. (2016) e ROSA et al. (2017), a partir de 318 amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos nos anos de 2012 a 2016. A pesca na região se dá de maneira artesanal bem como a evisceração no caso dos pescados eviscerados. Sendo 25 amostras de *F. paulensis* e 293 de peixes, das espécies *M. furnieri*, *M. platanus*, *P. orbignyanus* e *Netuna barba* (bagre) (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados característicos de *Vibrio* sp. em meio TCBS, obtidos a partir de amostras de pescados capturados no estuário da Lagoa dos Patos.

| Espécie | Nº de isolados | Nº de amostras | Processamento da amostra | Referências |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------------------|---------------------|
| | | | Nº Inteiros/nº eviscerados | |
| <i>Mugil platanus</i> | 11 | 10 | 10/0 | Milan et al. (2016) |

| | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|--------|--------------------|
| <i>Micropogonias furnieri</i> | 9 | 10 | 10/0 | |
| <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 12 | 20 | 20/0 | |
| <i>Netuna barba</i> | 0 | 3 | 3/0 | |
| <i>Farfantepenaeus paulensis</i> | 16 | 13 | 13/0 | |
| <i>Mugil platanus</i> | 38 | 30 | 15/15 | Rosa et al. (2016) |
| <i>M. furnieri</i> | 56 | 60 | 30/30 | |
| <i>P. orbignyanus</i> | 42 | 40 | 20/20 | |
| <i>M. platanus</i> | 21 | 50 | 50/0 | Rosa et al. (2017) |
| <i>M. furnieri</i> | 8 | 35 | 35/0 | |
| <i>P. orbignyanus</i> | 2 | 35 | 35/0 | |
| <i>F. paulensis</i> | 2 | 12 | 12/0 | |
| Total | 217 | 318 | 253/65 | |

4.2. Obtenção dos isolados

A pesquisa de *Vibrio* spp. foi realizada conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration - FDA (KAYSNER & DE PAOLA, 2004) por Milan et al. (2016), Rosa et al. (2016) e Rosa et al. (2017). Colônias características de *Vibrio* sp. em ágar Tissulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Acumedia) foram selecionadas e estocadas em Água Peptonada Alcalina, com 1% de cloreto de sódio e 20% de glicerol, e armazenadas a -20 °C para posteriores análises moleculares.

4.3. Extração de DNA

Os isolados serão recuperados em tubos de 3 mL de Água Peptonada Alcalina (com 1% de cloreto de sódio), durante 24 h a 37 °C, duas vezes consecutivas.

Os DNAs dos isolados serão extraídos conforme Sambrook & Russel (2001). Resumidamente, o *pellet* obtido por centrifugação de 1 mL de cultura em APA será ressuspendido em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6]. Adicionado 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura será centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante será coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -20 °C por 30 min. Uma nova centrifugação será realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Após eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4), será adicionado 1 µL de RNase (10 µg/µL). O DNA extraído será estocado a -20 °C.

4.4. Identificação de *V. vulnificus*

Os isolados de *Vibrio* serão analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa do gene *cth* (Tabela 2), para identificação de *V. vulnificus*, conforme Hill et al. (1991), com os *primers* recomendados por Kaysner & de Paola (2004). Cada reação terá um volume final de 25 µL. Serão utilizados 12,5 µL de Master Mix, 1,25 µL de cada *primer*, 2 µL de DNA e 8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação será realizada em termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min e 45 seg, anelamento dos *primers* a 67°C por 2 min, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da PCR serão corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese será realizada em gel de agarose a 1,8%. Como controle positivo, será utilizada a cepa de *V. vulnificus* ATCC 27562.

Tabela 2. *Primers* utilizados na identificação de *V. vulnificus*.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' a 3') | Tamanho da amplificação (pb) | Referência |
|---------------|----------------------|------------------------------|---------------------------|
| Vvh-785F | CCGCGGTACAGGTTGGCGCA | 519 | Kaysner & de Paola (2004) |
| Vvh-1303R | CGCCACCCACTTTCGGGCC | | |

4.5. Verificação da formação de biofilme em placas

Os isolados serão avaliados quanto à sua capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica descrita por Janssens et al. (2008), com modificações, de forma a adaptar o método para *V. vulnificus*. Serão colocados 100 µL de Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) em cada poço da placa de microtitulação e adicionados 100 µL de culturas *overnight* em APA de cada cepa padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,5 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de caldo APA, sem cultura bacteriana, serão utilizados como controle. A tampa será colocada sobre a placa, que será incubada durante 48 h a 37 °C sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes irão se formar sobre a superfície das cavidades, nas tampas. Para quantificação da formação de biofilmes, as tampas serão lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material que permanecer ligado à tampa será corado durante 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa será seca em temperatura ambiente por 30 min.

O corante que permanecer ligado ao biofilme será extraído para nova placa com ácido acético glacial 30% (200 µL). A DO₅₇₀ de cada poço será medida utilizando leitor de placas de microtitulação. Cada cepa será classificada como não formadora de biofilme, fracamente formadora, moderadamente formadora ou fortemente formadora, de acordo com os procedimentos sugeridos por Stepanovic et al. (2000). O ponto de corte (DOc) será definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles e a classificação será determinada conforme segue.

$DO \leq DOc$ = não formadora

$DOc < DO \leq 2 \times DOc$ = fraca formadora

$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ = moderada formadora

$4 \times DOc < DO$ = forte formadora

4.6. Formação de biofilme após estresse subletal

Concomitantemente aos testes de avaliação da capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação, serão testadas culturas dos isolados após serem submetidos a estresse subletal. Para a preparação das células aos choques de calor e frio, culturas *overnight* em APA serão mantidas em banho-maria a 42 °C por 45 min e em 20 °C durante 4 h, de acordo com os métodos descritos por Chang et al. (2004) e Lin et al. (2004), respectivamente. As células também serão estressadas a 4 °C durante 4 h. Os procedimentos descritos por Wong et al. (1998) serão utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em APA terão seu pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e serão incubadas a 37 °C durante 30 min. Para o teste em diferentes concentrações salinas, culturas *overnight* em APA serão submetidas às concentrações de 0%, 2,5% e 5% de NaCl, já detectadas no estuário por Rosa et. al. (2017), e incubadas a 37 °C durante 30 min.

4.7. Verificação da formação de biofilme em diferentes superfícies

Os isolados considerados formadores de biofilme nas placas de microtitulação serão testados quanto à capacidade de formarem biofilme em diferentes superfícies, conforme técnica utilizada por Milan et al. (2015). Serão utilizadas placas de superfícies planas com 4 cm² de plástico (polietileno de alta densidade), poliestireno transparente, aço inoxidável e vidro estéreis. Também serão utilizadas placas planas de 1 cm² de exoesqueletos de *F. paulensi* e opérculos de *M. furnieri*, preparadas de acordo com o método aplicado por Castro-Rosas e Escartín (2002). Os opérculos e exoesqueletos serão removidos manualmente, lavados durante 30 s com agitação para remover qualquer líquido remanescente e tecidos moles, cortados assepticamente no tamanho adequado e armazenados a -20 °C até a sua

utilização. Todas as diferentes superfícies serão colocadas em um Becker contendo 200 mL de APA e 4 mL de cultura *overnight* de cada isolado. A cada 48 horas de incubação, as placas serão lavadas suavemente duas vezes com PBS - 3% NaCl para remoção de células não aderidas e novamente inseridas em Becker com 200 mL de APA, porém sem inóculo. Após cinco repetições do procedimento, serão passadas zaragatoas estéreis sobre toda a superfície de cada placa e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de PBS - 3% NaCl. A partir desta, serão feitas diluições seriadas para contagem dos microrganismos em TCBS. Uma cepa não formadora de biofilme será utilizada como controle negativo.

4.8. Sensibilidade a desinfetante

A eficiência do sanitizante hipoclorito de sódio será testada em diferentes concentrações, serão utilizadas soluções contendo 2 ppm, 5 ppm, 20ppm e 100 ppm de Cl_2 , e será avaliada frente às bactérias nos biofilmes formados sobre a superfície dos diferentes materiais utilizados. O mesmo processo descrito anteriormente será repetido com os isolados que formaram biofilme e os materiais em que houve formação de biofilme. Após a última lavagem, as placas com biofilme serão imersas em frascos contendo sanitizantes, onde permanecerão durante 10 e 20 minutos. Alcançado o tempo de contato estabelecido, as placas serão imersas em solução neutralizante ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1 M) por 30 segundos. Após lavagem com PBS, será passada uma zaragatoa estéril na superfície de cada placa e realizada contagem em TCBS. Como controles, biofilmes formados pelos mesmos isolados, porém sem entrar em contato com os sanitizantes, serão objeto de contagens em TCBS. A sensibilidade dos isolados na forma planctônica também será avaliada. Culturas *overnight* a 37 °C em APA dos isolados formadores de biofilme, após coleta de alíquotas para contagem em TCBS, serão adicionadas dos sanitizantes, de forma a se obter as concentrações finais de 2 ppm, 5 ppm, 20 ppm e 100 ppm e Cl_2 . Após 10 e 20 minutos, será adicionada solução neutralizante e alíquotas serão obtidas para diluição seriada e contagem em TCBS.

4.9. Análise dos dados

Todos os experimentos serão realizados em triplicata. Será feita análise de variância das contagens e as médias das contagens de células planctônicas e nos biofilmes na avaliação da sensibilidade a sanitizantes, bem como submetidas a estresse ou não, serão avaliadas pelo teste de Tukey, com uso do programa STATISTIX® (2003).

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Ano I

| Atividades | Meses | | | | | | | | | | | |
|--|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Redação do projeto | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| Coleta e processamento das amostras para isolamento bacteriano | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| Realização de PCR para identificação da espécie | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Ano II

| Atividades | Meses | | | | | | | | | | | |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Verificação da formação de biofilme em placas | X | X | X | | | | | | | | | |
| Formação de biofilme após estresse subletal | | X | X | X | | | | | | | | |
| Verificação da formação de biofilme em diferentes superfícies | | | X | X | X | | | | | | | |
| Sensibilidades a desinfetantes | | | | X | X | X | | | | | | |
| Análise dos dados e redação do artigo | | | | | X | X | X | | | | | |

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, M.R.E.; AQUINO, C.; SCARAMAL, E.; CIOLA, C.S.; SCHETTINO, G.; MACHADO, M.C. *Vibrio vulnificus* infection in São Paulo, Brazil: case report and literature review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v.11, n.2, p.302- 305, 2007.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.1, p.291-299, 2009.

CALLIARI, L.J. O ambiente e a biota do Estuário da Lagoa dos Patos. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J.P. *Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil*. Rio Grande: Ecoscientia, 1998. p.13-18.

CARDOSO, N.L.C.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; SERAFINI, A.B. Avaliação microbiológica de carne de peixe comercializada em supermercados da cidade de Goiânia, GO. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.17, n.109, p.81-87, 2003.

CASTRO-ROSAS, J.; ESCARTÍN, E.F. Increased tolerance of *Vibrio cholerae* O1 to temperature, pH, or drying associated with colonization of shrimp carapaces. *International Journal of Food microbiology*, v.102, n.2, p.195– 201, 2005.

CHANG, C.M.; CHIANG, M.L.; CHOU, C.C. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. *Journal of Food Protection*, v.67, n.10, p.2183-2188, 2004.

DA ROSA, J.V.; DA SILVA, C.J.; BARBOSA, F.; BAIRROS, J.; DUVAL, E.H.; HELBIG, E.; TIMM, C.D. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolates in fish species captured from the Lagoa dos Patos estuary. *Semina: Ciências Agrárias*, v.37, n.3, p.1345-1354, 2016.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews. Drug discovery*, v.2, n.2, p.114, 2003.

DONLAN, R.M & COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; DAMACENA, S.S.; CARDOSO, L.G.; MARQUES, V.F.; SILVA, I. P. Condições higiênicas sanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em Cachoeira, Bahia. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.11, n.1, p.60-74, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Vibrio*. Bacteriological Analytical Manual Chapter 9. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070830.htm>>. Acesso em: 07 de abril 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Draft report of quantitative risk and benefit assessment of consumption of commercial fish, focusing on fetal neurodevelopmental effects (Measured by Verbal Development in Children) and on coronary heart disease and stroke in the general population. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/metals/ucm088794.htm>>. Acesso em: 07 de abril 2017.

GÁMEZ, C.I.; GALAVÍZ, J.R.G.; SILVA, L.G.; GARZA, Z.J.M.; VELARDE, M.S.T. Detección y prevalencia de *Vibrio* spp em cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en Sonora durante o ciclo 2003. *Revista Salud Pública y Nutrición*, n. 6, 2004. Disponível em: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2004/resumenes_juany/70.htm>. Acesso em: 07 de abril 2017.

GARCEZ, D.S. & BOTERO, J.I.S. Comunidades de pescadores artesanais no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Atlântica (Rio Grande)*, v.27, n.1, p.17-29, 2011.

GIVENS, C.E.; BOWERS, J.C.; DEPAOLA, A.; HOLLIBAUGH, J.T.; JONES, J.L. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*—potential roles for fish, oyster, sediment and water. *Letters in applied microbiology*, v.58, n.6, p.503-510, 2014.

HILL, W.E.; KEASLER, S.P.; TRUCKSESS, M.W.; FENG, P.; KAYSNER, C.A.; LAMPEL, K.A. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *App. Environ. Microbiol.* v.57, n.3, p.707–711, 1991.

HUSS, H.H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control*, v.8, n.2, p. 91-98, 1997.

KAYSNER, C.A.; DEPAOLA Jr. *Vibrio*. U.S. Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>>. Acesso em: 18 de março 2015

LIMA, F.C. *Vibrios marinhos II. Vibrios não coléricos. Revista Higiene Alimentar*, v.11, n.49, p.8-13, 1997.

LIN, C., YU, R.C., CHOU, C.C. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *International Journal of Food Microbiology*, v.92, n.2, p.207-215, 2004.

LOPES, IG., DE OLIVEIRA, RG., RAMOS, FM. Perfil do consumo de peixes pela população brasileira. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v.6, n.2, p.62-65, 2016.

MILAN, C.; AGOSTINETTO, A.; CONCEIÇÃO, R.C S.; GONZALEZ, H.L.; TIMM, C.D. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.67, n.2, p.642-646, 2015.

MILAN, C.; SILVEIRA, D.R.; DA ROSA, J.V. & TIMM, C.D. *Vibrio Parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.74, n.2, p.151-155, 2016.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. *Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Varela, 1999. 430p.

OLIVER, J. D. The biology of *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Spectrum*. v.3, n.3, p.1-2, 2015.

SANTOS, I.F. dos; SOUZA, E.R. de; PARDI, H. S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. v.1. Goiânia: UFG, 2001. 623p.

PARIZZI, S.Q.F.; ANDRADE, N.J.D.; SILVA, C.A.D.S.; SOARES, N.D.F.F., SILVA, E.A.M.D. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian Archives of Biology Technology*. v.47, n.1, p.77-83. 2004.

REIS, E.G. Pesca artesanal na Lagoa dos Patos: História e administração pesqueira. In: ALVES, F.N. *Por uma história multidisciplinar do Rio Grande*. Rio Grande: FURG, 1999. p.81-84.

SANTURIO M.J.; SANTURIO D.F.; POZZATI P.; MORAES C.; FRANCHIN P.R.; ALVES S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

SAMBROOK, J & RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

JANSSENS, J.C.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; ...; VANDERLEYDEN, J. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, v.74, n.21, p.6639–6648, 2008.

SILVEIRA, D.R.; MILAN, C.; DA ROSA, J.V.; TIMM, C.D. Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico*. v.83, p.01-07, 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Food safety and foodborne illness. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en> . Acesso em: 04 de abril 2017.

WONG, H.C.; PENG, P.Y.; HAN, J.M.; CHANG, C.Y.; LAN, S.L. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, v.66, n.7, p.3066-3071, 1998.