ISOLAMENTO DE *Vibrio* spp DE CAMARÕES COMERCIALIZADOS *IN NATURA* NA CIDADE DE SÃO GONÇALO – RJ.

Michele Guarany Quintanilha Guimarães
Laís Roberto Lopes dos Santos Moura
Rogério Carlos Novais ✉
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Formação de Professores, Departamento de Ciências. Rio de Janeiro – RJ.
✉ rcnovais@yahoo.com.br

RESUMO

Bactérias do gênero *Vibrio* fazem parte da microbiota de camarões, pois têm capacidade de associar-se à quitina presente no exoesqueleto destes animais e ao zooplancton, que por sua vez são consumidos por estes animais. O gênero contém pelo menos 12 espécies patogênicas, incluindo *V. cholerae*, responsável por várias pandemias de cólera. A contaminação humana acontece através do consumo de alimentos, principalmente de origem marinha, crus ou mal cozidos. Por se tratar de um tipo de pescado amplamente consumido pela população, este trabalho teve como objetivo investigar a presença de espécies de *Vibrio* em camarões comercializados *in natura* na cidade de São Gonçalo-RJ. Os camarões foram adquiridos em duas peixarias da cidade e caracterizados por metodologia convencional e molecular; cento e vinte e nove amostras testaram positivamente para as provas bioquímicas realizadas e, destas, cinquenta e duas testaram positivamente para os testes moleculares. Visando investigar a identidade das espécies de *Vibrio*, as amostras foram submetidas ao PCR multiplex para 4 espécies (*V. cholerae, V. mimicus, V. parahaemolyticus, V. vulnificus*). Doze isolados foram identificados como *V. parahaemolyticus* e 9 como *V.cholerae* não O1. Dentre os demais isolados, 31 demonstram se tratar de outras espécies de *Vibrio* spp. O sítio com o maior número de isolados foi a casca, seguida pelo hepatopâncreas/hemolinfa. A ribotipagem por PCR das 21 cepas demonstrou claramente a separação das cepas de *V.parahaemolyticus* e *V.cholerae*. As cepas de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* demonstraram alto índice de resistência a ampicilina (83,33%) e 100% de sensibilidade à nitroflurantoína e tetraciclina. Sete cepas (38,8%) apresentaram perfil de multirresistência a dois antimicrobianos. Nossos resultados demonstram a presença de espécies patogênicas de *Vibrio* em amostras de pescados amplamente consumidos pela população.

Palavras-chave: *Pescado. V.cholerae.V.parahaemolyticus.*

ABSTRACT

Vibrio genus is part of the microbiota of shrimps as they have the ability to join the chitin present in the exoskeleton of these animals and to zooplancton, which are consumed by shrimp. The genus contains at least 12 pathogenic species, which includes V. cholerae, responsible for several pandemics of cholera. Human contamination occurs through the consumption of raw or undercooked seafood. Considering it is a type of fish widely consumed by the population, this study aims to investigate the presence of species of Vibrio in shrimps commercialized in São Gonçalo/RJ. Shrimps were acquired in two local fishmarkets and characterized by conventional and molecular methods. One hundred and twenty nine isolates tested positive in the biochemical tests. Among them, fifty two have tested positive in molecular tests. In order to investigate the

identity of the species of Vibrio, the samples were subjected to the multiplex PCR searching for four species of Vibrio (V. cholerae, V. mimicus, V. parahaemolyticus, V. vulnificus). Twelve isolates were identified as V. parahaemolyticus and 9 as V. cholerae non-O1. Thirty one were classified as Vibrio spp. The site with the largest number of isolates was the shell, followed by the hepatopancreas/hemolymph. The PCR ribotyping clearly separate V. parahaemolyticus strains from V.cholerae strains. The strains of V. cholerae and V. parahaemolyticus showed high ampicillin resistance index (83.33%) and 100% sensitivity to nitrofurantoin and tetracycline. Seven strains (38.8%) had profiles of multiresistence to two antimicrobials. Our results demonstrate the presence of patogenic species of Vibrio in shrimp samples widely consumed by the population.

Keywords: *Fish. V.cholerae. V.parahaemolyticus.*

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Vibrio* pertencem à família *Vibrionaceae* composto por cerca de 80 espécies de bactérias (THOMPSON et al., 2004; KONEMAN, 2012). Encontram-se principalmente em meio aquático e com freqüente associação a animais marinhos (SILVA et al., 2010). Pelo menos 12 espécies podem ser patogênicas, possuindo genes de virulência entre elas, *V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. fluvialis, V. mimicus* e *V. vulnificus* (THOMPSON et al., 2004; REBOUÇAS et al., 2011; BANERJEE et al., 2012). A espécie mais conhecida e estudada, no entanto, é o *Vibrio cholerae,* responsável por diversas epidemias e pandemias de cólera (AUSTIN, 2010).

Camarões fazem parte do ecossistema aquático dos quais podem ser isoladas diversas espécies de micro-organismos da família *Vibrionaceae*, algumas delas com relevante potencial patogênico (AUSTIN, 2010). Bactérias do gênero *Vibrio* permanecem no ambiente aquático através de sua capacidade de associar-se à quitina de animais que compõem o zooplâncton, e pode explicar a afinidade das espécies de *Vibrio* por camarões (AUSTIN, 2010). Estudos recentes apontam que camarões podem apresentar vibriões principalmente na hemolinfa e hepatopâncreas (MENDES et al., 2009).

Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização bioquímica e molecular de bactérias do gênero *Vibrio* sp. presentes em camarões comercializados em peixarias na cidade de São Gonçalo, identificando seus perfis moleculares e de sensibilidade a antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento bacteriano e isolamento de possíveis colônias de *Víbrio* a partir de camarões

As amostras de camarão foram adquiridas em peixarias da cidade de São Gonçalo, em três ocasiões distintas, entre os meses janeiro de 2012 e julho de 2013. Os exemplares foram coletados em sacos plásticos estéreis e transportados imediatamente ao laboratório, a fim de serem analisados em condições assépticas. Os camarões foram dissecados, e divididos em quatro sítios: a) intestino, b) hepatopâncreas mais hemolinfa, c) casca e d) água de lavagem e pesados separadamente em porções de 25 e 50 gramas. Cada amostra foi adicionada a um frasco contendo 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA) acrescida de 1% e 3% de NaCl. A metodologia adotada foi realizada conforme recomendação do Manual de Análise Bacteriológica (KAISNER & DE PAOLA, 2004), da Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA).

Caracterização bioquímica

Após o período de incubação, uma alçada de cada frasco foi estriada em meio seletivo TCBS, para diferenciação de colônias fermentadoras de sacarose. As colônias foram então isoladas em Agar Nutriente (NUT) e testadas para a presença da enzima citocromo oxidase, cuja presença caracteriza a família *Vibrionaceae*. Em etapa posterior, as cepas oxidase-positivas presuntivas de *Vibrio*, foram submetidas a testes bioquímicos adicionais: Agar Kligler (Merck®), Agar Lisina Ferro (LIA) (Merck®) e Meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM) (BioBrás®), sob instruções do Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica da Cólera (BRASIL, 2010). As colônias presuntivas para o gênero *Vibrio* foram ainda testadas para a sensibilidade ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina), nas concentrações de 150µg, que inibe o crescimento de cepas de *Vibrio* spp.

Caracterização molecular PCR gênero-específico

Os iniciadores, utilizados para a amplificação do rRNA 16S, amplificam um fragmento de 663 pares de bases (pb) e pertencem a uma região altamente conservada do DNA da família *Vibrionaceae*. As condições para a amplificação do referido gene estão descritas em TARR e colaboradores (2007). O DNA foi extraído segundo Novais (2012) e a reação foi preparada para um volume final de 20 µL, sendo 1x de solução tampão, 5mMol de dNTP, 3mMol de MgCl2, 2 U de Taq polimerase, 30 ng de DNA estoque, 30 pMol de cada iniciador do gene 16S e água ultrapura estéril (qsp).

PCR Multiplex para identificação de quatro espécies de *Vibrio*

Visando a confirmar a identidade das espécies de *Vibrio* (*V. cholerae, V. mimicus, V. parahaemolyticus e V. vulnificus*), as amostras foram submetidas à PCR multiplex. Os genes alvo foram os seguintes: sodB para *V. cholerae e V. mimicus,* flaE para *V. parahaemolyticus*, e hsp para *V. vulnificus*, e os iniciadores utilizados foram descritos por Tarr et al. (2007). As condições das reações de PCR são as mesmas descritas para a amplificação do gene rRNA 16S descrito acima.

Ribotipagem por PCR

Visando a demonstrar variabilidade genética entre os isolados pertencentes às diferentes espécies de *Vibrio*, estes foram submetidos à ribotipagem por PCR, de acordo com condições descritas em Oliveira e colaboradores (2007), tendo como alvo a região espaçadora do gene rRNA, com iniciadores descritos por Jensen et al. (1993). As condições de reação são similares às descritas acima. Todas as reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, com migração dos fragmentos por cerca de 1h a 80 V.

Construção de árvore filogenética através do programa PyEph

O cálculo da distância genética e a construção da árvore filogenética foram realizados a partir do *software* PyElph, que tem por finalidade analisar perfis genéticos produzidos por métodos de caracterização molecular, entre eles, a ribotipagem por PCR (PAVEL & VASILE, 2012).

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

As colônias foram isoladas no meio de cultura não seletivo NUT, acrescido de 1% de NaCl; foi obtida uma suspensão bacteriana, tendo uma concentração de 1-2 x10^8 células por mL. Os antimicrobianos utilizados foram: ampicilina (AMP, 10 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cloranfenicol (CLO, 30 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg), pefloxacino (PEF, 5 µg) e tetraciclina (TET, 30 µg). As placas de Petri, contendo os micro-organismos inoculados, foram incubadas a 37ºC, por 18 a 24h e os halos de inibição ou resistência foram avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de *Vibrio* e testes bioquímicos

Cento e vinte e nove colônias isoladas de camarão testaram positivamente para os testes bioquímicos realizados visando à confirmação do gênero *Vibrio*. Após a realização da PCR multiplex e PCR gênero-específico, 52 isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Vibrio*, sendo 9 *V. cholerae*, 12 *V. parahaemolyticus* e 31 *Vibrio* spp.

Identificação por PCR multiplex espécie específico

Identificação por PCR gênero específico

Para confirmar que as 21 cepas pertenceriam às duas espécies de *Vibrio* (*V.cholerae e V.parahaemolyticus*), estas foram submetidas à reação gênero-específica com o gene 16S do rRNA e o resultado (representativo de algumas amostras) está ilustrado na figura 2.

Trinta e um isolados testaram negativamente para as reações de PCR multiplex, porém amplificaram o fragmento de 663 pb, correspondente ao gênero *Vibrio*, demonstrando se tratar, provavelmente, de outras espécies não investigadas neste trabalho.

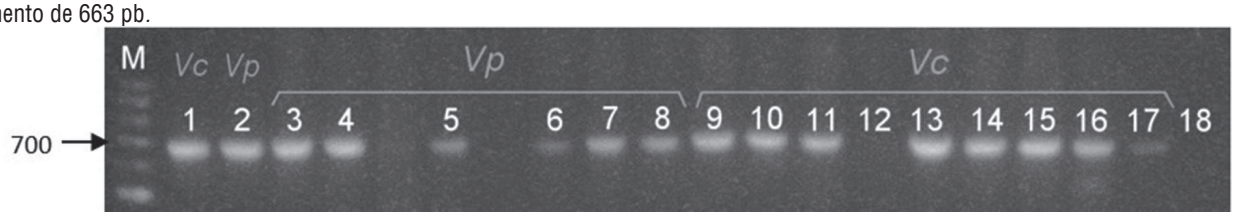
Análise da variabilidade genética

Visando estabelecer uma proximidade genética e molecular entre as cepas isoladas neste trabalho, entre si e em relação às cepas controle, foi utilizado o *software* PyElph, na análise das distâncias genéticas e na construção de árvores filogenéticas (figura 3) a partir dos perfis produzidos por ribotipagem.

Figura 1 – PCR Multiplex (representativo de algumas amostras) demonstrando a amplificação de dois fragmentos, a partir de amostra de camarão: 897 pb correspondente ao DNA de *Vibrio parahaemolyticus* e 248 pb correspondente ao de *V. cholerae.*

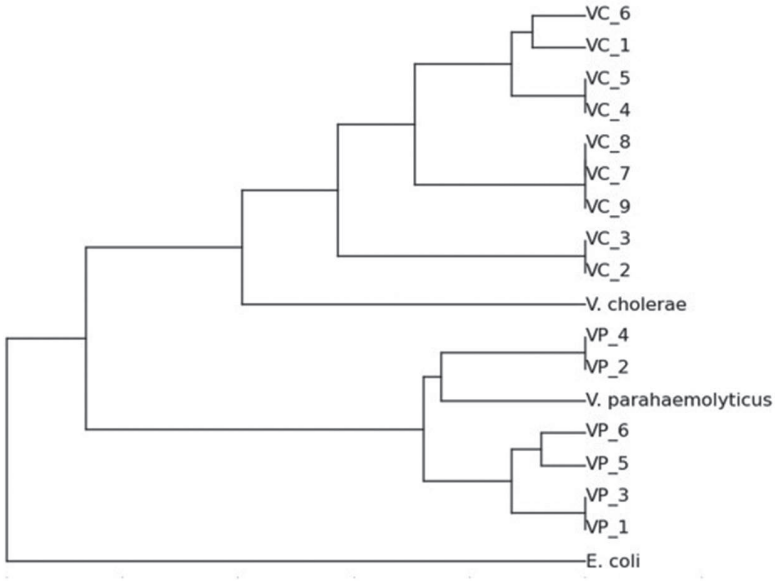
Legendas: 1 e 2: controles positivos de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, respectivamente. 5 a 10: cepas de *V. parahaemolyticus*. 11 a 19: cepas de *V. cholerae*. 3 e 4: amostras não identificadas. 20: controle negativo.M: marcador de peso molecular 100pb ladder (Axygen).

Figura 2 – PCR gênero-específico confirmando o gênero das cepas de *V.cholerae* e *V. parahaemolyticus* e após amplificação de um fragmento de 663 pb.



Legendas: 1 e 2: Controles positivos, Vibrio cholerae e Vibrio parahaemolyticus, respectivamente. 3 a 8: cepas de V.parahaemolyticus; 9 a 17: cepas de V.cholerae. 18: controle negativo da reação. 12: sem amplificação. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder (Axygen).

Figura 3 – Árvore filogenética construída a partir dos perfis de ribotipagem de cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* isoladas neste trabalho.



Legenda: VP: cepas de V. parahaemolyticus isoladas neste trabalho. VC: cepas de V. cholerae isoladas neste trabalho.

Tabela 1 – Cepas de *Vibrio* detectadas nas amostras de camarão, de acordo com os sítios.

	V. cholerae	*V. parahaemolyticus*	*Vibrio* spp
Água de lavagem *	0	1	4
Água de lavagem **	0	0	3
Casca *	0	3	0
Casca **	0	1	13
Hepatopânceas e hemolinfa *	0	0	1
Hepatopânceas e hemolinfa **	0	3	10
Intestino *	3	4	0
Intestino **	6	0	0
Total	**9**	**12**	**31**

Legenda: * crescimento a 1% de NaCl. ** Crescimento a 3% de NaCl.

Em relação à arvore filogenética produzida (figura 3) pelo *software* PyElph, foi utilizado o método de agrupamento UPGMA, que demonstrou uma nítida separação entre as cepas de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus.*

Avaliaram-se quatro diferentes potenciais sítios de localização de *Vibrio* em camarões (casca, hepatopâncreas/hemolinfa, água de lavagem e intestino), baseado em pesquisas anteriores (LIU e col., 2011) que demonstram a incidência de *Vibrio* nestes sítios. O sítio preferencial observado nesta pesquisa foi a casca (17/52). No intestino, também foi verificado um grande número de isolados (13/52), neste sítio foi onde encontrou-se maior número de espécies identificadas, sendo 9 isolados de *V. cholerae* e 4 de *V. parahaemolyticus.* Todos os isolados de *V. cholerae* foram provenientes do intestino, isto pode ser explicado pelo processo de colonização de *V. cholerae,* cuja via de acesso é a mucosa intestinal. A presença de vibrios na casca pode ser explicada pela afinidade dos vibriões com a quitina presente na carapaça dos artrópodes, como já constatado anteriormente por Austin (2010).

O crescimento em uma salinidade de 3% foi a que conferiu melhor crescimento das cepas de *Vibrio* (36/52). Curiosamente, *V. parahaemolyticus*, que tem o seu crescimento ótimo a 2-3% de NaCl (SILVA et al., 2010), apresentou-se em maior número quando utilizou-se uma concentração salina de 1%: 8 das 12 cepas de *V. parahaemolyticus* foram isolados nesta concentração.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Todas as cepas das espécies *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*testadas (18 cepas) se mostraram sensíveis aos antimicrobianos nitrofurantoína e tetraciclina, mas apenas duas cepas apresentaram 100% de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Apenas três cepas se mostraram sensíveis à ampicilina. Todas as cepas de *V. cholerae* foram resistentes à ampicilina.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram isolados de camarão, 21 cepas do gênero *Vibrio,* sendo 9 de *V. cholerae* não-O1e 12 de *V. parahaemolyticus*, além de 31 cepas de *Vibrio* spp. O principal sítio de isolamento em camarão foi a casca com 17 isolados em um total de 52. As cepas de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* mostraram total sensibilidade à nitrofurantoína e à tetraciclina. Detectaram-se sete cepas multirresistentes a três antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

AUSTIN, B. Vibrios as casual agentes of zoonoses, **Veterinary Microbiology**, 140, p.310- 317, 2010

BANERJEE, S; OOI, MC; SHARRIFF, M; KHATOON, H. 2012. Antibiotic resistant Salmonella and Vibrio associated with farmed Litopenaeus vannamei, **The Scientific World Journal**, p.130-136, 2012

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

JENSEN, MA; WEBSTER, JA; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied And Environmental Microbiology.** p. 945-952. 1993.

KAISNER, CA & DePAOLA, AJ. Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus and other Vibrio spp. **In: FDA Bacteriological Analytical Manual,** 8th edition, chapter 9. AOAC International. Gaithersburg. 2004

LIU, H; WANG, L; LIU, M; WANG, B; JIANG, B; MA, S; LI, Q. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (Fenneropenaeus chinensis) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. **Aquaculture,** v.317, p.32–36, 2011.

MENDES, EM; LIRA, SF; GÓES, LMNB; DOURADO, J; MENDES, PP; ALVES, CAB. Vibrio spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**. 10 (4): 1191-1199, 2009.

NOVAIS, RC. **Contaminação de ecossistemas aquáticos: Monitoramento do *Vibrio cholerae* na estação de tratamento de esgoto de São Gonçalo**. In: SANTOS, MG. (Org.). Estudos ambientais em regiões metropolitanas: São Gonçalo. Editora Uerj. p. 135 - 164. 2012

PAVEL, AB & VASILE, CI. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. **BMC Bioinformatics**, v.13, n.9, 2012.

REBOUÇAS, RH; SOUSA, OV; LIMA, AS; VASCONCELOS, FR; CARVALHO, PB; VIEIRA, RHSF. Antimicrobial resistance profile of Vibrio species isolated from marine shrimp farming environments (Litopenaeus vannamei) at Ceará, Brazil, **Environmental Research**, 111, p.21–24, 2011.

SILVA, N; JUNQUEIRA, VCA; SILVEIRA, NFA; TANIWAKI, MH; SANTOS, RFS; GOMES, RAR. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Livraria Varela, 4 ed., 2010.

TARR, CL; PATEL, JS; PUHR, ND; SOWERS, EG; BOPP, CA; STROCKBINE, NA. Identification of Vibrio isolates by multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. **Journal Of Clinical Microbiology**. 45 (1): 134-140, 2007.

THOMPSON, FL; IIDA, T; SWINGS, J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.68, n.3; p.403-431, 2004.