



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Escola Superior  
Agrária



Instituto **Nacional de Saúde**  
Doutor Ricardo Jorge

# Detecção de *Vibrio cholerae* patogénicos associados a doenças de origem alimentar utilizando genes de virulência como alvos de PCR

David Miguel Ferreira Lopes

## Orientadores

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professora Doutora Ana Rita Simões Ferraz

Doutora Teresa Maria de Sousa Teixeira Lopes

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à conclusão da Licenciatura em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica das Professoras Cristina Maria Baptista Santos Pintado e Ana Rita Simões Ferraz, ambas da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, e da Doutora Teresa Maria de Sousa Teixeira Lopes do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto.

Julho, 2024



## **Composição do júri**

Presidente do júri

Doutor, José Carlos Dias Duarte Gonçalves

Professor coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Vogais

Doutora, Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professor Adjunto da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Doutor, Carlos Manuel Gaspar dos Reis

Professor Adjunto da Escola Superior Agrária de Castelo Branco



## Agradecimentos

“Miríades de astros e estrelas  
Auguraram o teu nascer.  
Irrequieta por vê-las,  
Rompeste o véu para tê-las  
Ao lado do teu viver”

**Para ti avó, 28/05/2024**

Um especial agradecimento aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio incondicional e pela oportunidade de realizar este estágio no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Agradecer também à minha namorada, pelo apoio constante durante o meu estágio, pelas inúmeras sugestões dadas e pela ajuda prestada. Gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge pelo apoio inestimável durante o meu estágio. Em especial, quero agradecer à Doutora Margarida Saraiva e à Doutora Teresa Lopes, cujas orientações foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. Durante este período, tive a oportunidade de aprender e desenvolver-me de uma maneira que superou todas as minhas expectativas. Estou profundamente grato por todo o apoio e orientação que recebi. Este estágio não só me proporcionou uma aprendizagem valiosa, mas também me inspirou a continuar a perseguir a excelência na área. Levo comigo não apenas conhecimentos técnicos, mas também memórias inesquecíveis e um profundo respeito por todos os profissionais que fazem parte deste instituto. Gostaria também de expressar o meu mais sincero agradecimento às minhas orientadoras de estágio, a Doutora Cristina Pintado e a Doutora Ana Ferraz, da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pelo apoio e orientação extraordinários durante este período. A vossa dedicação, paciência e atenção aos detalhes nas correções foram essenciais para o meu desenvolvimento académico e profissional. O vosso empenho em garantir a qualidade do meu trabalho, bem como a vossa capacidade de transmitir conhecimentos de forma clara e construtiva, fizeram deste estágio uma experiência extremamente enriquecedora e inesquecível.

O meu Obrigado!



## Resumo

Este estudo teve como principal objetivo a detecção de estirpes patogênicas de *Vibrio cholerae* associados a doenças de origem alimentar recorrendo a genes de virulência como alvos de PCR. Um outro objetivo deste estudo foi a implementação de um controlo interno de reação (CIR) garantindo a não existência de falsos negativos. O CIR selecionado foi o plasmídeo *pUC19* com 118 pares de bases.

Foram analisadas 38 amostras de camarão inteiro congelado de venda a granel, recorrendo à Norma ISO 6887-3:2017. As amostras foram adquiridas em 11 superfícies comerciais, representando diferentes proveniências (Equador, Índia, Argentina, Bangladesh, Venezuela, Madagáscar e Moçambique), diferentes calibres e diferentes métodos de produção (aquacultura e meio selvagem). Verificou-se amplificação do fragmento do gene *prVC* em 9 amostras (24%), confirmando-se como positivas para a pesquisa de *Vibrio cholerae*. No entanto, nenhuma destas amostras apresentou amplificação dos fragmentos dos genes de virulência *ctxA* e *ctxB*.

Tendo em conta o país de origem, o maior número de amostras contaminadas pertence à Índia e ao Equador com 3 positivos em 10 amostras analisadas e 5 positivos em 20 amostras analisadas, respetivamente. Já em relação ao método de criação do camarão, das 32 amostras provenientes de aquacultura, 9 testaram positivo a *Vibrio cholerae* e das 6 amostras de camarão selvagem, nenhuma testou positivo a *Vibrio cholerae*.

Os dados obtidos neste estudo levam-nos a questionar a segurança microbiológica do camarão importado de países onde existe *Vibrio cholerae* e cujo consumo cru ou mal cozinhado representa um problema de saúde pública.

## Palavras-chave

Camarão; *pUC19*; *prVC* ; saúde pública; cólera;



## Abstract

The main objective of this study was to detect pathogenic strains of *Vibrio cholerae* associated with food-borne illnesses using virulence genes as PCR targets. Another objective of this study was to implement an internal reaction control (IRC) to ensure that there were no false negatives. The CIR selected was the *pUC19* plasmid with 118 base pairs.

38 samples of frozen whole shrimp sold in bulk were analyzed using ISO Standard 6887-3:2017. The samples were purchased from 11 commercial outlets, representing different origins (Ecuador, India, Argentina, Bangladesh, Venezuela, Madagascar, and Mozambique), different sizes and different production methods (aquaculture and wild). The *prVC* gene fragment was amplified in 9 samples (24%), confirming that they were positive for *Vibrio cholerae*. However, none of these samples showed amplification of the *ctxA* and *ctxB* virulence gene fragments.

Considering the country of origin, the highest number of contaminated samples belonged to India and Ecuador, with 3 positives out of 10 samples analyzed and 5 positives out of 20 samples analyzed, respectively. As for the method of shrimp farming, of the 32 samples from aquaculture, 9 tested positive for *Vibrio cholerae* and of the 6 samples from wild shrimp, none tested positive for *Vibrio cholerae*.

The data obtained in this study leads us to question the microbiological safety of shrimp imported from countries where *Vibrio cholerae* is present and whose raw or undercooked consumption represents a public health problem.

## Keywords

Shrimp; *pUC19*; *prVC*; Public health; cholera;

# Índice geral

I. Introdução .....	1
II. Revisão Bibliográfica .....	1
1. Cólera em Portugal e no mundo .....	1
2. Caracterização de <i>Vibrio cholerae</i> .....	3
2.1. Características gerais .....	3
2.2. Serogrupos e biótipos .....	4
2.3. Fatores ambientais que afetam a sobrevivência e multiplicação .....	5
2.4. Genoma de virulência de <i>Vibrio cholerae</i> .....	6
3. Patogenia e fatores de virulência.....	7
3.1. Patogenia .....	7
3.2. Mecanismos de adesão e colonização.....	8
3.3. Principais fatores de virulência ( <i>ctxA</i> , <i>ctxB</i> e <i>TCP</i> ) .....	9
3.4. Toxinas acessórias .....	10
3.5. Resposta imunitária à cólera e vacinas disponíveis.....	10
4. Legislação e valores-guia INSA .....	11
5. Serotipagem e tipificação molecular .....	11
6. Meios de cultura .....	12
III. Materiais e Métodos.....	13
1. Receção e preparação das amostras .....	13
2. Pesquisa de <i>Vibrio cholerae</i> .....	13
2.1. Fluxograma .....	13
2.2. Meios de cultura usados .....	14
2.3. Enriquecimento primário .....	15
2.4. Enriquecimento secundário .....	16
2.5. Isolamento primário .....	16
2.6. Extração de DNA a partir do enriquecimento secundário.....	16
3. PCR ( <i>prVC</i> ).....	17
3.1. <i>Primers</i> .....	17
3.2. Implementação do controlo interno de reação ( <i>pUC19</i> ).....	17
3.3. Composição da mastermix com <i>pUC19</i> implementado .....	18
3.4. Condições de amplificação para a reação de PCR ( <i>prVC</i> ).....	19
3.5. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose .....	19

4. Isolamento secundário.....	20
5. Teste de oxidase .....	20
6. Conservação dos isolados.....	21
7. Extração do DNA de culturas suspeitas após o isolamento secundário .....	21
8. PCR (subunidades <i>ctxA</i> e <i>ctxB</i> ) .....	21
8.1. Primers <i>ctxA</i> e <i>ctxB</i> .....	21
8.2. Composição da mastermix (com <i>pUC19</i> ) do <i>ctxA</i> .....	22
8.3. Condições de amplificação para a reação de PCR ( <i>ctxA</i> ).....	22
8.4. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose 1% ( <i>ctxA</i> )	22
8.5. Composição da mastermix (com <i>pUC19</i> ) do <i>ctxB</i> .....	23
8.6. Condições de amplificação para a reação de PCR ( <i>ctxB</i> ).....	23
8.7. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose 1% ( <i>ctxB</i> )	24
9. Exclusividade.....	24
10. Limite de detecção .....	24
IV. Resultados e Discussão.....	26
1. Amostras positivas/negativas de <i>Vibrio cholerae</i> .....	26
2. Países de origem.....	26
3. Tamanho do camarão.....	27
4. Espécie do camarão.....	28
5. Método de criação do camarão .....	28
6. Superfícies comerciais .....	29
7. Resultado do PCR (exclusividade).....	30
8. Resultado do PCR (limite de detecção).....	31
V. Considerações finais.....	31
Referências Bibliográficas.....	32
Anexo- Vacinas aprovadas e comercializadas. Fonte: Montero <i>et al.</i> (2023).....	34



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Surtos de cólera em Portugal entre 1833-1974. ....	2
<b>Figura 2</b> - Classificação e evolução dos serotipos, serogrupos e biótipos de <i>Vibrio cholerae</i> . ....	4
<b>Figura 3</b> - Cromossomas circulares não homólogos designados por Chr1 e Chr2 de <i>Vibrio cholerae</i> . ....	6
<b>Figura 4</b> - Composição de <i>Vibrio cholerae</i> . ....	8
<b>Figura 5</b> - Colonização do intestino delgado por <i>Vibrio cholerae</i> . ....	9
<b>Figura 6</b> - Colónias típicas de <i>Vibrio cholerae</i> em meio TCBS. 1- Colónia característica de <i>Vibrio cholerae</i> ou <i>Vibrio alginolyticus</i> Fonte: Condalab®.....	12
<b>Figura 7</b> - Colónias típicas no Ágar cromogénico <i>Vibrio</i> , Condalab® 1- colónia característica de <i>Vibrio alginolyticus</i> ;2- colónia característica de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 3- colónia característica de <i>Vibrio cholerae</i> Fonte: Condalab®.....	13
<b>Figura 8</b> - Fluxograma dos procedimentos a seguir na pesquisa de <i>Vibrio cholerae</i> .....	14
<b>Figura 9</b> - Produtos da reação PCR com <i>pUC19</i> . 1- Produto PCR positivo a <i>prVC</i> e positivo a <i>pUC19</i> ; 2- Produtos PCR positivo a <i>pUC19</i> .....	20
<b>Figura 10</b> - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para <i>Vibrio cholerae</i> em função do tamanho do camarão.....	28
<b>Figura 11</b> - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para <i>Vibrio cholerae</i> em função da espécie de camarão.....	28
<b>Figura 12</b> - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para <i>Vibrio cholerae</i> em função do método de criação do camarão.....	29
<b>Figura 13</b> - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para <i>Vibrio cholerae</i> em função da superfície comercial de onde o camarão foi adquirido.....	29
<b>Figura 14</b> -Imagem da esquerda representa os resultados para <i>ctxA</i> e a imagem da direita representa os resultados para <i>ctxB</i> . 1, 2 e 3- Produto de PCR ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ); 4 e 5- Produto PCR ( <i>Vibrio vulnificus</i> ); 6- Produto PCR ( <i>Vibrio alginolyticus</i> ); 7- Produto PCR ( <i>Vibrio cholerae</i> ); 8- Controlo positivo; 9- Produto PCR (branco). ....	30
<b>Figura 15</b> - Resultados da corrida eletroforética ( <i>prVC</i> ) (enriquecimentos). 1 - Produto de PCR (amostra A); 2 - Produto de PCR (amostra B); 3 - Controlo positivo ( <i>prVC</i> );4 - Produto PCR (branco). ....	31
<b>Figura 16</b> - Resultados da corrida eletroforética ( <i>ctxA</i> ) (enriquecimentos). 1-Amostra A negativa a <i>ctxA</i> , 2- Amostra B positiva a <i>ctxA</i> , 3- Controlo positivo <i>ctxA</i> ; 4-Produto PCR (branco). ....	31
<b>Figura 17</b> - Resultados da corrida eletroforética ( <i>ctxB</i> ) (enriquecimentos). 1-Amostra A negativa a <i>ctxB</i> , 2- Amostra B positiva a <i>ctxB</i> , 3- Controlo positivo <i>ctxB</i> ; 4-Produto PCR (branco). ....	31

## Lista de tabelas

Tabela 1- Características fisiológicas de <i>Vibrio cholerae</i> .....	5
Tabela 2-“Valores-guia INSA”: <i>microrganismos patogénicos e toxinas em alimentos prontos para consumo</i> .....	11
Tabela 3 - Meios de cultura usados neste trabalho .....	15
Tabela 4 - Características dos primers <i>prVC</i> e <i>pUC19</i> e produtos de amplificação .....	17
Tabela 5 - Composição da mastermix ( <i>prVC</i> ).....	18
Tabela 6 - Composição da mastermix com <i>pUC19</i> ( <i>prVC</i> ) .....	19
Tabela 7 - Protocolo tempo/temperatura PCR <i>prVC</i> .....	19
Tabela 8 - Primers PCR <i>ctxA</i> e <i>ctxB</i> .....	21
Tabela 9 - Composição da mastermix (com CIR) do <i>ctxA</i> .....	22
Tabela 10 - Protocolo tempo/temperatura PCR <i>ctxA</i> .....	22
Tabela 11 - Composição da mastermix (com CIR) do <i>ctxB</i> .....	23
Tabela 12 - Protocolo tempo/temperatura PCR <i>ctxB</i> .....	24
Tabela 13 - Controlo positivo .....	25
Tabela 14 - Volume/diluição para o microrganismo alvo.....	26
Tabela 15 - Resultados obtidos por país de origem.....	27
Tabela 16 - Resultados obtidos do PCR da exclusividade.....	30



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ACE	<i>Accessory Cholera Enterotoxin</i>
$a_w$	Atividade da água
BGN	Bacilos Gram Negativos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIR	Controlo Interno da Reação
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
HlyA	Hemolisina A
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LPS	Lipopolissacárido
OMP	<i>Outer Membrane Proteins</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSU	Unidades de Salinidade Prática
<i>TCP</i>	<i>Toxin Coregulated Pilus</i>
TSA	Triptona Soja Agar
UFC	Unidades formadoras de colónias
ZOT	<i>Zonula Occludens Toxin</i>





## I. Introdução

A cólera é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Vibrio cholerae* que se traduz numa infeção aguda no intestino delgado, tendo como resultado uma diarreia aquosa intensa e desidratação grave, podendo levar à morte em 48 horas. A doença pode surgir de forma endémica, epidémica ou pandémica e geralmente as infeções ocorrem devido a condições precárias de saneamento e ao consumo de águas e/ou alimentos contaminados como, por exemplo, as ostras e o camarão. Apesar do vasto conhecimento sobre a cólera, a mesma ainda permanece como um grave problema de saúde pública a uma escala global. Dado que a existência predominante de *Vibrio cholerae* é em ambientes marinhos, todos os seus utilizadores sobretudo peixes, crustáceos, entre outros, são suscetíveis à contaminação. Como fazem parte de uma cadeia alimentar, ao serem posteriormente ingeridos crus ou mal confeccionados poderão constituir uma fonte de transmissão.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2023), no ano de 2022 foram relatados aproximadamente 1,3 milhões de casos de cólera e cerca de 21.000 mortes no mundo inteiro, o que gera uma preocupação e um esforço global para o combate e erradicação da mesma.

Entende-se que decorre uma pandemia quando um elevado número de pessoas em vários continentes ou mesmo em todo o mundo partilham uma mesma doença. Atualmente, assistimos à sétima pandemia de cólera que já conta com uma durabilidade superior a cinco décadas (Montero *et al.*, 2023).

Nos últimos 50 anos, Portugal tem assistido a uma melhoria significativa na qualidade do saneamento básico, refletindo-se nas melhores condições de saúde pública e qualidade de vida. No entanto, apesar destes avanços substanciais, persiste o risco de importação de produtos contaminados com *Vibrio cholerae*, o que exige uma vigilância contínua e medidas rigorosas de importação com a finalidade de prevenir surtos de cólera e garantir a segurança alimentar.

Tendo em consideração o que foi anteriormente referido, este relatório de estágio tem como objetivo principal a deteção de estirpes patogénicas de *Vibrio cholerae* associadas a doenças de origem alimentar utilizando genes de virulência como alvos de PCR.

## II. Revisão Bibliográfica

### 1. Cólera em Portugal e no mundo

A primeira pandemia de cólera foi descrita pela primeira vez em 1817, a primeira de sete, ao longo dos 150 anos seguintes. Surgiu na Índia onde se propagou para a China, República do Azerbaijão, Cazaquistão, Turquemenistão e Rússia através do Mar Cáspio, tendo tido o seu fim declarado em 1824.

Todas as pandemias seguintes (segunda, terceira, quarta, quinta e sexta) tiveram origem na Índia e estenderam-se entre 1829 e 1923 causando alta mortalidade e morbidade. Em relação à sétima pandemia, a atual, esta teve origem na Indonésia em 1961. Esta pandemia acompanha-nos até aos dias de hoje com vários surtos a decorrer em várias partes do mundo, especialmente em regiões com saneamento precário e acesso limitado a água potável (Montero *et al.*, 2023). Ao contrário do esperado, a frequência, duração e gravidade dos surtos de cólera têm vindo a aumentar. As primeiras seis pandemias de cólera foram causadas por estirpes do biótipo clássico, enquanto a sétima pandemia é associada ao biótipo El Tor (Montero *et al.*, 2023).

Já a nível nacional, como mostra a Figura 1, considera-se que em maio de 1855 a cólera penetrou pelo rio Douro infetando as populações das vilas ribeirinhas até ao Porto e, mais tarde o Algarve, a partir de Andaluzia, Espanha. Dada esta situação, a cidade do Porto isolou-se proibindo feiras, mercados e a própria circulação de pessoas e bens. Em julho desse mesmo ano, o Porto, oficialmente, ficou infetado assim como o Minho e todo o Vale do Douro, situação que durou até novembro, segundo fontes referentes aos editais do fiscal do conselho de saúde pública do reino daquele tempo (Almeida, M. A., 2021). Já o Algarve, apresentou um cenário mais crítico tanto pela falta de médicos como pela falta de assistência, o que originou a desertificação de aldeias e vilas inteiras devido à morte dos seus habitantes ou à fuga dos mesmos. No ano de 1865 a cólera retorna a Portugal continental quando são detetadas novas/os infeções/casos em Lisboa. Graças à rapidez das operações de limpeza com o intuito de eliminar os focos de infeções, a situação ficou rapidamente controlada (Almeida, 2021).

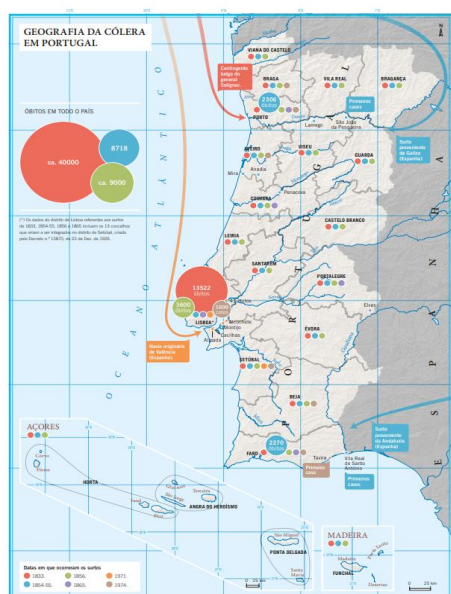


Figura 1- Surtos de cólera em Portugal entre 1833-1974.

Fonte: (Almeida, 2021)

Em 1971, foram detetados casos de cólera em bairros de lata em Lisboa devido a hortas que eram regadas com água contaminada, dando assim, pela primeira vez, especial importância à transmissão do

agente da cólera através de alimentos crus ou mal confeccionados, em Portugal. Esta epidemia foi rapidamente resolvida após a divulgação de medidas de higiene, vacinação dos grupos de maior risco, desinfecção da água com clorina e manutenção da rede pública de esgotos e vigilância dos mercados de hortofrutícolas.

Em 1974, surge um novo surto epidémico em Portugal, atingindo sobretudo Lisboa (com 1600 casos e 41 óbitos), mas também os distritos de Aveiro, Beja, Braga, Porto e Setúbal. Desde então não voltou a ser reportado qualquer surto de cólera em Portugal.

A nível mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2023), são 44 os países que continuam a ter cólera como uma doença endémica. Geralmente, partilham as mesmas características em relação ao acesso a água potável e ausência de saneamento básico. Grande parte destes 44 países localizam-se no continente Africano e Asiático sendo alguns deles o Bangladesh, Índia, Equador, Moçambique, Nigéria, Somália, entre outros. De acordo com WHO (2023), em 2022 foram notificados 472.699 casos e 2.349 mortes. No entanto, é possível que haja uma grande discrepância entre estes números e os reais, devido às limitações no sistema de vigilância e ao receio do impacto no comércio e no turismo dos países afetados.

Com base na atualização mensal por parte do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC, 2024), desde 1 de janeiro de 2024 até 29 de fevereiro de 2024 foram notificados, em todo o mundo, 66 530 casos de cólera e 946 mortes. Os países com maior número de casos reportados foram o Afeganistão (8402 casos), República Democrática do Congo (4830 casos), Zimbabué (3992 casos) e Somália (1537 casos). Portugal não reportou qualquer novo caso de cólera.

## **2. Caracterização de *Vibrio cholerae***

### **2.1. Características gerais**

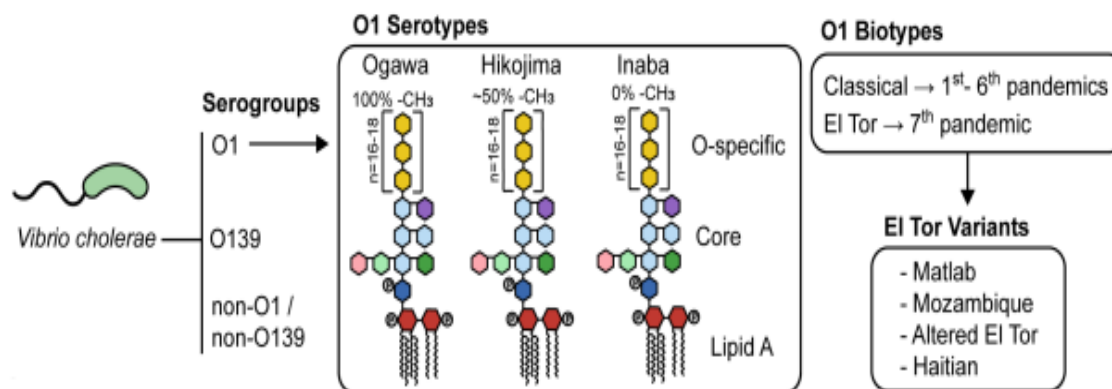
*Vibrio cholerae* é uma bactéria da família *Vibrionaceae*, um bacilo curvo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, oxidase positivo e halófilo. Estas bactérias são frequentemente encontradas em ambientes aquáticos (águas costeiras, estuários e sedimentos) e, muitas delas, estão associadas a organismos marinhos como os peixes de água salgada, os moluscos e os crustáceos. *Vibrio cholerae* apresenta também a capacidade de infetar todos os animais incluindo os humanos (Krauss *et al.*, 2003; Austin, 2010). É relevante salientar que, para além dos produtos da pesca, a presença de *Vibrio cholerae* foi detetada em outros alimentos. Nesses casos, a contaminação geralmente ocorre durante o processamento em ambientes não higiénicos ou por contacto com manipuladores infetados. Embora menos comum, alimentos como arroz, papas de milho e vegetais contaminados foram associados a surtos epidémicos (Budiman *et al.*, 2022). Além disso, carne e produtos lácteos também representam potenciais fontes de transmissão da cólera (Clemens *et al.*, 2017).

## 2.2. Serogrupos e biótipos

Mais de 220 serogrupos de *Vibrio cholerae* do antígeno O foram identificados, mas somente o serogrupo O1 e o serogrupo O139 (Figura 2) foram sinalizados como causadores de epidemias e pandemias de cólera. Os antígenos O são polissacáridos constituintes dos lipopolissacáridos (LPS) presentes na parede celular das bactérias Gram negativas. Dentro da vasta panóplia de genes produzidos, recebe destaque o gene *ctx* (com as subunidades *ctxA* e *ctxB*) que expressa a produção da toxina da cólera, nomeadamente nas estirpes dos serogrupos O1 e O139. Trata-se de um importante fator de virulência e responsável pela diarreia característica (Montero *et al.*, 2023).

Dentro do serogrupo O1 existem três serotipos (Figura 2) designados por Ogawa, Inaba e Hikojima que estão agrupados de acordo com o estado de metilação da perosamina terminal do lipopolissacárido (LPS). Consideramos, desta forma, as estirpes Ogawa como metilada, a estirpe Inaba não metilada e a estirpe Hikojima podendo expressar antígenos O metilados e não metilados (Montero *et al.*, 2023).

O biótipo é igualmente importante para a classificação das estirpes de *Vibrio cholerae*. O biótipo clássico e o biótipo El Tor (Figura 2) podem ser distinguidos de acordo com os marcadores fenotípicos e genéticos que cada um apresenta. Inclusive os biótipos apresentam diferentes padrões de infeção sendo que se considera as estirpes El Tor mais eficientes na transmissão entre hospedeiros e associadas a uma maior capacidade de sobrevivência no ambiente e no intestino humano (comparando com a estirpe clássica) (Montero *et al.*, 2023).



**Figura 2** - Classificação e evolução dos serotipos, serogrupos e biótipos de *Vibrio cholerae*.

**Fonte:** Montero *et al.* (2023)

### 2.3. Fatores ambientais que afetam a sobrevivência e multiplicação

A capacidade de sobrevivência de *Vibrio cholerae* é regida essencialmente pela temperatura da água e pela salinidade da mesma. De acordo com Thompson *et al.* (2004), a multiplicação de *Vibrio cholerae* na água e nos animais marinhos tem uma maior incidência no verão.

Na Tabela 1 encontram-se os valores médios da resposta de *Vibrio cholerae* aos principais fatores que condicionam a sua sobrevivência e multiplicação, nomeadamente a temperatura, o pH, a atividade da água e a concentração de NaCl e a salinidade.

**Tabela 1- Características fisiológicas de *Vibrio cholerae*.**

Características Fisiológicas	<i>Vibrio cholerae</i>
Intervalo de temperatura (°C)	10-43
Temperatura ótima (°C)	30-37
Temperatura de inativação (°C)	>70
Intervalo de pH	5-9,7
pH ótimo	7,6
Atividade mínima de água ( $a_w$ )	0,97
NaCl (%)	<4,0
Unidades de Salinidade Prática (PSU)	0-20

Fonte: Adaptado de Sampaio *et al.* (2022)

Como anteriormente referido, estirpes de *Vibrio cholerae* estão amplamente presentes em ambientes aquáticos tornando-se assim um dos agentes patogênicos com maior associação ao consumo de diferentes tipos de seres aquáticos (Vaz, 2013; Castello *et al.*, 2022).

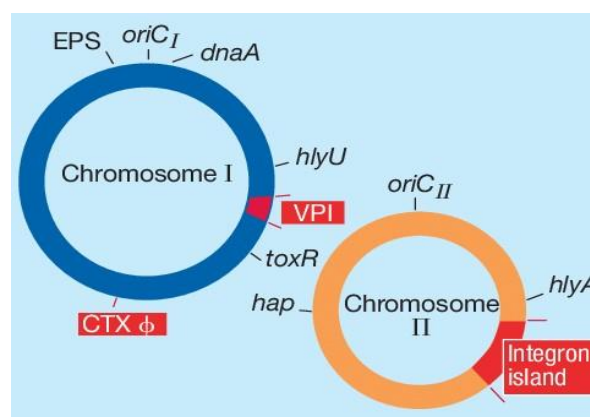
Após a sua ingestão, o *Vibrio cholerae* possui mecanismos que permitem a perceção das condições ambientais, respondendo através da ativação de uma ampla série de genes que visam à colonização e ao estabelecimento da bactéria no hospedeiro. A cólera ganha maior destaque em desastres ambientais como as cheias, verificando-se nesta situação um aumento do número de casos. O aumento da temperatura da água e o seu grau de salinidade levam também a um aumento da incidência da cólera, com implicações importantes na epidemiologia da doença. *Vibrio cholerae* desenvolve-se tanto em águas salgadas como em águas doces, mas a sua multiplicação é mais favorável na presença de sal. Em águas doces, é necessário que a temperatura seja mais elevada e que haja nutrientes orgânicos, como, por exemplo, zooplâncton e conchas, utilizando a quitina presente nesses organismos como fonte de carbono e azoto (Vaz, 2013; Fernández-Delgado *et al.*, 2016).

Tendo em conta estes dados, conseguimos entender melhor e prever a probabilidade de um possível surto.

## 2.4. Genoma de virulência de *Vibrio cholerae*

O género *Vibrio* apresenta normalmente dois cromossomas circulares não homólogos designados por Chr1 e Chr2 (Figura 3). O cromossoma Chr1 tem 2,96 Mb (2,96 milhões de pares de bases) e contém um grande número de genes para funções celulares essenciais, como a replicação do DNA, a transcrição, a tradução e a biossíntese da parede celular, genes de virulência que codificam toxinas, adesinas e antigénios de superfície. Já o cromossoma Chr2 tem 1,07 Mb (1,07 milhões de pares de bases) e apresenta um integrão (conjunto de elementos genéticos presente em genomas bacterianos, especialmente de Gram-negativos, que servem como mecanismos genéticos para a aquisição, acumulação e expressão diferencial de novos genes, que permitem às bactérias adaptarem-se e evoluírem rapidamente, estando implicados na aquisição de resistência a antibióticos. Estes genes adquiridos estão incrustados numa estrutura genética específica chamada cassette de genes (cassete de Integrão) muito grande, que inclui genes com diversas funções. A compreensão e análise destes 2 cromossomas revelou a presença de um conjunto de elementos genéticos móveis, incluindo prófagos, ilhas genómicas e elementos de integração e conjugação. A plasticidade genómica de *Vibrio cholerae* e a sua capacidade de trocar genes através da transformação natural, conjugação e transdução são características desta bactéria. A sua evolução é contínua devido à aquisição ou perda de segmentos genómicos (Montero *et al.*, 2023).

Sabe-se que esta aquisição de elementos genéticos móveis é o principal motor de evolução da virulência de *Vibrio cholerae* e um fator determinante da divergência genética entre estirpes ambientais e pandémicas. A compreensão dos eventos evolutivos que levam ao aparecimento de clones pandémicos de *Vibrio cholerae* pode proporcionar novas abordagens para o controlo deste agente (Montero *et al.*, 2023)



**Figura 3** - Cromossomas circulares não homólogos designados por Chr1 e Chr2 de *Vibrio cholerae*.

**Fonte:** Waldor e RayChaudhuri (2000)

### 3. Patogenia e fatores de virulência

#### 3.1. Patogenia

A cólera foi das primeiras infeções a ter o seu modo de transmissão compreendido e, devido a esse facto, foi também das primeiras a apresentar medidas efetivas e eficazes de prevenção. John Snow, médico britânico, propôs (entre 1849 e 1854) que a cólera fosse uma doença transmissível e que as fezes continham material infeccioso que rapidamente poderiam contaminar locais de abastecimento de águas de consumo com conseqüente transmissão da doença. A ingestão de água contaminada, ou produtos de pesca, crus ou mal confeccionados e exposição de feridas à água são as fontes mais comuns de infeção por *Vibrio cholerae*. Pessoas que tenham cancro, diabetes, VIH, que estejam a receber terapêutica imunossupressora, que estejam a tomar medicação para diminuir os níveis de ácido gástrico e que tenham sido recentemente submetidas a uma cirurgia ao estômago apresentam um maior risco. A forma cultivável do vibrião é o principal fator que contribui para a transmissão no decorrer de uma epidemia na população humana, mas a grande parte de *Vibrio cholerae* presente nos reservatórios aquáticos está associado a biofilmes, que estão sobre uma forma ativa ou viável, mas não cultivável, que tem um importante papel no ressurgimento da cólera enquanto se desenrola um surto. Nas fezes a excreção de *Vibrio cholerae* decorre durante vários dias (doentes assintomáticos) e poderá decorrer durante semanas (doentes sintomáticos), podendo verificar-se de duas formas: como células planctónicas ou como agregados de biofilmes. O vibrião após excretado encontra-se num “estado híper infeccioso”, cuja dose infetante é 10 a 100 vezes inferior à dos microrganismos não excretados por humanos. Desta forma persiste na água entre 5 a 24 horas. O efeito de diluição no ambiente acaba por condicionar uma queda na sua infecciosidade. Analisando este parâmetro podemos sugerir que os microrganismos transmitidos pessoa-a-pessoa podem apresentar uma maior infecciosidade do que aqueles que são provenientes do ambiente e que estão adaptados a ele. Realça-se assim um foco na relevância da educação das populações para cuidados higiénico-sanitários. Outros fatores que implicam na patogenia da cólera são também a concentração de *Vibrio cholerae* O1 ou *Vibrio cholerae* O139 nas fezes, as diferenças de infecciosidades entre as células planctónicas e os agregados de biofilmes, a rapidez da transmissão pessoa-a-pessoa e a concentração na água das formas ativas não cultiváveis (Vaz, 2013).

O tempo de incubação da cólera pode variar entre 12 h a 5 dias e uma vez ingerido o alimento ou água contaminada, o *Vibrio cholerae* tem de se adaptar rapidamente ao sistema digestivo humano. Para o fazer, a bactéria utiliza uma rede complexa de transdução de sinais que tem como finalidade regular a expressão genética em resposta a diferentes ambientes e estímulos ao longo do trato gastrointestinal. A sua passagem através do mesmo é difícil uma vez que *Vibrio cholerae* é altamente

sensível ao pH baixo e para isso utiliza recursos que dão uma resposta de tolerância ao ácido (tanto ao ácido inorgânico como ao ácido orgânico). Estas respostas de tolerância ao ácido (RTA) envolvem várias proteínas, incluindo a porina OmpU e os reguladores de transcrição CadC e HepA, entre outros. Apesar da RTA, o número final de vibriões que chegam ao intestino delgado é bastante reduzido, e para causar uma cólera grave em humanos saudáveis é necessária uma dose infecciosa elevada ( $10^8$  bactérias). Considera-se que seja suficiente uma dose mais baixa ( $10^5$  bactérias) caso seja administrada em conjunto com antiácidos com a capacidade de neutralizar o ácido gástrico (Montero *et al.*, 2023).

### 3.2. Mecanismos de adesão e colonização

Após chegar ao intestino delgado, o principal local de colonização, a sua adaptação a agentes antimicrobianos como os sais biliares e péptidos antimicrobianos é crucial. Para esse efeito, a bactéria adapta o seu perfil proteico através da ativação de uma via de sinalização fortemente regulada conhecida por *ToxR Regulon*. Na presença de sais biliares, a bactéria é capaz de regular positivamente a expressão de OmpU e negativamente a expressão de OmpT, sendo estas as OMPs mais abundantes em *Vibrio cholerae* (Figura 4). A OmpU e a OmpT apresentam propriedades distintas: A OmpU é mais seletiva para catiões do que a OmpT e a atividade da porina OmpT é bloqueada pelo sal biliar ácido desoxicólico (não afeta a atividade da OmpU). Consequentemente, a OmpU confere resistência aos sais biliares e aos péptidos antimicrobianos, desempenhando assim um papel fundamental na colonização e na sobrevivência de *Vibrio cholerae* no intestino delgado.

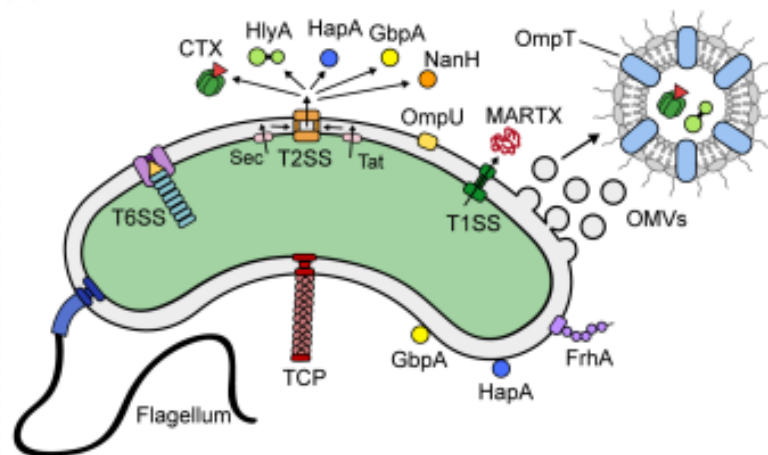


Figura 4 - Composição de *Vibrio cholerae*.

Fonte: Montero *et al.* (2023).

Para a colonização no intestino delgado ser bem-sucedida, *Vibrio cholerae* tem de penetrar uma camada de muco altamente viscoso com cerca de 100-400  $\mu\text{m}$  de espessura (ou cerca de 30-130 vezes o tamanho da bactéria). Para isso, os vibriões recorrem ao seu flagelo para se impulsionarem através dessa camada de muco e conseguirem alcançar a superfície epitelial (Figura 5). Os vibriões

que não apresentam esta capacidade (vibriões não-móveis) são significativamente menos eficientes na colonização ou até mesmo considerados avirulentos. Um grupo de enzimas como, por exemplo, a HapA e a TagA, são responsáveis pela facilitação na penetração da camada de muco sendo que as mesmas hidrolisam as mucinas. Os vibriões que não obtêm sucesso na penetração da camada de muco e desta forma não colonizam as mucosas intestinais são posteriormente eliminados nas fezes devido à recorrente produção e reposição contínua de muco. Depois da sua fixação ao epitélio intestinal, *Vibrio cholerae* diminui a sua motilidade, prolifera e cria microcolônias, na sua maioria originárias de células únicas de vibrião. Os vibriões colonizadores das estirpes O1 e O139 expressam de seguida *ctx* e *TCP* que são os principais fatores de virulência desta bactéria (Montero *et al.*, 2023).

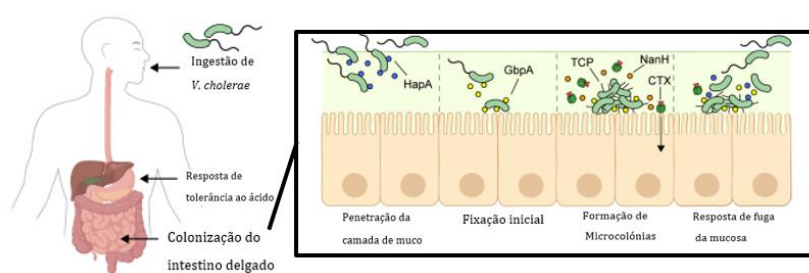


Figura 5 - Colonização do intestino delgado por *Vibrio cholerae*.

Fonte: Montero *et al.* (2023).

### 3.3. Principais fatores de virulência (*ctxA*, *ctxB* e *TCP*)

A toxina da cólera *ctx* pertence a uma família de enterotoxinas relacionadas pela sua estrutura e função, que consistem em dois polipéptidos. A subunidade A é responsável pela ativação da adenilato ciclase nas células epiteliais do intestino delgado, induzindo a secreção ativa de água e sais, o que causa a enorme perda de fluidos associada à cólera. A subunidade B é constituída por cinco elementos idênticos responsáveis pela ligação ao recetor de superfície das células epiteliais. Os genes que exprimem as subunidades A e B são designados *ctxA* e *ctxB*, respetivamente. São expressos como uma única unidade de transcrição e os genes estruturais sobrepõem-se numa base (Montero *et al.*, 2023).

De acordo com Fields *et al.* (1993), a toxina *ctx* é uma proteína de 85 kDa (kiloDalton) composta por duas unidades funcionais, uma subunidade A enzimática de 27 kDa e uma subunidade B com ligação ao recetor intestinal constituída por 5 péptidos idênticos de 11,6 kDa.

O *TCP* (*Toxin-Coregulated Pilus*) apresenta uma estrutura filamentosa composta por subunidades proteicas chamadas de pilinas. Desempenha um papel crucial na adesão inicial de *Vibrio cholerae* às células intestinais do hospedeiro e é regulada de forma coordenada com a da toxina *ctx*. Apresenta também um importante papel na formação de biofilmes cedendo proteção às bactérias contra o

sistema imunológico e antimicrobiano do hospedeiro. Estirpes deficientes em *TCP* são incapazes de colonizar o intestino humano e de outros animais (Montero *et al.*, 2023).

### 3.4. Toxinas acessórias

As bactérias da espécie *Vibrio cholerae* apresentam a capacidade de produzir outras toxinas, para além de *ctx*. As mesmas desempenham um papel fundamental na patogénese e na adaptação da bactéria podendo atuar em sinergia com a toxina colérica (*ctx*) para maximizar os efeitos patogénicos da infeção.

A *Zonula Occludens Toxin (ZOT)* tem a capacidade de afetar a estrutura dos microfilamentos de actina, conduzindo a um aumento da permeabilidade das junções estreitas das células epiteliais, resultando na passagem de grandes moléculas através de uma via paracelular (contribui diretamente para a diarreia aquosa característica da cólera).

A *Accessory Cholera Enterotoxin (ACE)* é uma proteína integral de membrana que altera o transporte de iões e é responsável por causar uma diarreia ligeira. A mesma pode causar uma secreção intestinal inicial antes da ação da toxina *ctx*, estimulando o  $\text{Cl}^-$  (ião cloreto) /  $\text{HCO}_3^-$  (ião hidrogenocarbonato dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (ião cálcio), resultando assim num influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

A Hemolisina A (*HlyA*), também conhecida como citolisina, é uma toxina que apresenta atividade vacuolizante (capacidade de induzir a formação de grandes vacúolos dentro das células hospedeiras apresentando como consequências a disfunção celular, evasão imunológica e, em casos mais graves, a morte celular por apoptose) e que leva também à formação de poros com a consequente fuga de iões. É um fator importante na virulência de *Vibrio cholerae*, contribuindo diretamente para a lesão dos tecidos do hospedeiro e auxiliando na sobrevivência e proliferação da bactéria (Montero *et al.*, 2023).

### 3.5. Resposta imunitária à cólera e vacinas disponíveis

Já foram realizados estudos experimentais e epidemiológicos que documentaram que após a infeção por *Vibrio cholerae* é induzido uma proteção contra a reinfeção durante 3 anos na maioria dos doentes que recuperam. No entanto, diversos fatores podem afetar este “escudo imunológico” contra *Vibrio cholerae* e o consequente estabelecimento da memória imunológica, incluindo a idade, o estado nutricional, o grupo sanguíneo, a endemicidade, as coinfeções, a microbiota, entre outros. Embora o mecanismo exato da imunidade protetora contra a cólera permaneça desconhecido (em grande parte), a nossa compreensão atual da patogénese de *Vibrio cholerae*

fornece algumas indicações sobre a forma como esta bactéria interage com a mucosa intestinal e desencadeia múltiplos mecanismos do sistema imunitário (Montero *et al.*, 2023).

Atualmente existem diversas vacinas disponíveis no mercado com o intuito de auxiliar o processo de erradicação da cólera. Em anexo (tabela 16), temos como exemplos as 2 primeiras vacinas aprovadas e comercializadas.

#### 4. Legislação e valores-guia INSA

Na União Europeia, os regulamentos que definem os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios não estabelecem limites específicos para *Vibrio cholerae*. Regulamentos como o (CE) n.º 852/2004, que estabelece regras gerais de higiene dos géneros alimentícios, e o (CE) n.º 853/2004, que fixa regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, focam principalmente em patógenos mais comuns, como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Embora a ausência de limites específicos reflita a menor prevalência deste patógeno em alimentos na UE, os estados-membros são responsáveis pela vigilância e notificação de casos de cólera ao Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC, 2024).

No que se refere a *Vibrio cholerae*, em Portugal, e de acordo com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), os valores guia não apresentam um valor máximo nem um valor mínimo de unidades formadoras de colónias por grama ou mililitro de amostra de alimento analisada (UFC/g ou UFC/mL). Para que a amostra de alimento seja considerada satisfatória, não deve ser detetada a bactéria (INSA, 2019) (Tabela 2). No caso de o alimento em questão apresentar *Vibrio cholerae*, independentemente da sua carga bacteriana, este deve ser rapidamente descartado, de uma forma que impossibilite o consumo do mesmo, e a situação deve ser comunicada às autoridades competentes.

**Tabela 2** - “Valores-guia INSA”: microrganismos patogénicos e toxinas em alimentos prontos para consumo

Microrganismos patogénicos e toxinas	Resultado da contagem (UFC/g ou UFC/ml) ou Pesquisa (em 25 g)			
	Satisfatório	Não satisfatório	Não satisfatório/potencialmente perigoso	Testes de referência
<i>Vibrio cholerae</i>	Não detetado	NA	Detetado	Serotipagem e tipificação molecular

NA – Não Aplicável; UFC/g – unidades formadoras de colónias por grama; UFC/ml – unidades formadoras de colónias por mililitro **Fonte:** INSA (2019)

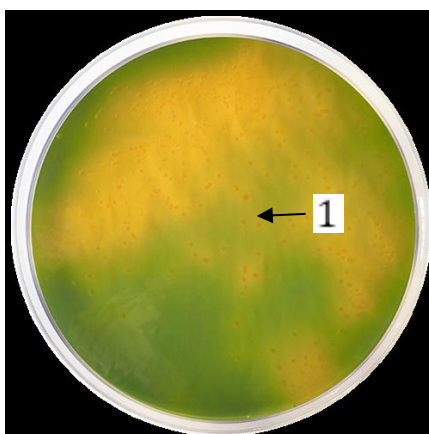
#### 5. Serotipagem e tipificação molecular

Os testes de referência para a pesquisa de *Vibrio cholerae* são a serotipagem, que é uma técnica laboratorial que permite a classificação dos microrganismos com base nas suas características

antigénicas, e a tipificação molecular, que é uma técnica usada para caracterizar microrganismos com base nos seus componentes genéticos, como o DNA ou o RNA. Existem várias técnicas de tipificação, sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) uma das mais usadas e a responsável por amplificar segmentos de DNA específicos, de interesse, permitindo a deteção de sequências genéticas únicas em microrganismos.

## 6. Meios de cultura

O *Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar* (TCBS) é um meio de cultura utilizado para o isolamento seletivo e diferenciação de bactérias do género *Vibrio*. Contém sais biliares e citrato de sódio, que inibem o crescimento de vários microrganismos Gram-positivos e alguns Gram-negativos, permitindo assim que as bactérias do género *Vibrio* cresçam de forma seletiva. Apresenta também diferenciação sendo que a sacarose presente no meio permite diferenciar entre as diferentes espécies de *Vibrio*. Esta diferenciação ocorre porque algumas espécies de *Vibrio* como, por exemplo, o *Vibrio cholerae* possuem a capacidade de fermentar a sacarose resultando desta forma em colónias amarelas (Figura 6).



**Figura 6** - Colónias típicas de *Vibrio cholerae* em meio TCBS. 1- Colónia característica de *Vibrio cholerae* ou *Vibrio alginolyticus* Fonte: Condalab®

Há no mercado uma oferta variada de meios cromogénicos para *Vibrio*, os quais são frequentemente utilizados para o isolamento seletivo e diferenciação de bactérias deste género. Estes meios apresentam substratos cromogénicos, que são moléculas que mudam de cor quando são metabolizadas pelas bactérias, havendo substratos específicos para as principais espécies de *Vibrio*. Estes meios de cultura são também seletivos, apresentando agentes seletivos, como sais biliares, que inibem o crescimento de bactérias não pretendidas. A imagem seguinte mostra o aspeto das colónias de *Vibrio cholerae* (colónias de cor rosada, Figura 7), mas também conseguimos identificar *Vibrio parahaemolyticus* (colónias esverdeadas, Figura 7) no meio de cultura Ágar cromogénico *Vibrio* da Condalab®, o mesmo que foi usado neste trabalho.

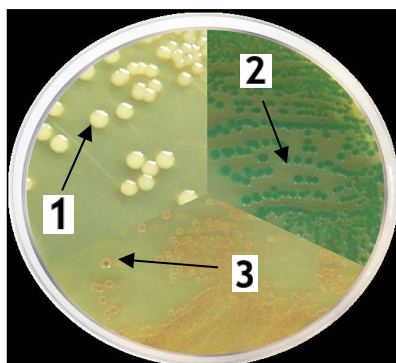


Figura 7 - Colónias típicas no Ágar cromogénico *Vibrio*, Condalab® 1- Colónia característica de *Vibrio alginolyticus*; 2- Colónia característica de *Vibrio parahaemolyticus* 3- Colónia característica de *Vibrio cholerae*  
Fonte: Condalab®

### III. Materiais e Métodos

#### 1. Receção e preparação das amostras

Neste estudo foram analisadas 38 amostras de crustáceos inteiros congelado de venda a granel (camarão).

Após a chegada das amostras ao Laboratório, procedeu-se à preparação das amostras de acordo com o definido na norma ISO 6887-3:2017, a qual descreve os procedimentos a realizar para a preparação de amostras de pescado destinadas a análise microbiológica.

Uma vez que as amostras analisadas se encontravam congeladas, houve necessidade de as descongelar por um período de cerca de 60 minutos, mas nunca mais do que 3 horas, a uma temperatura entre 18°C e 27°C. Após o descongelamento calçou-se assepticamente umas luvas estéreis para se retirar a casca do camarão. Após a remoção da casca separou-se o cefalotórax do abdómen, ficando assim com duas partes inteiras (cabeça e corpo). Recolheu-se então a carne do cefalotórax e do abdómen, tendo o cuidado de colher também uma fração da tripa que usualmente é ingerida.

#### 2. Pesquisa de *Vibrio cholerae*

##### 2.1. Fluxograma

Para a pesquisa de *Vibrio cholerae* seguiram-se os procedimentos descritos na norma ISO 21872-1:2017, a partir da qual se obteve o fluxograma de procedimentos analíticos que se encontra resumido na Figura 8.

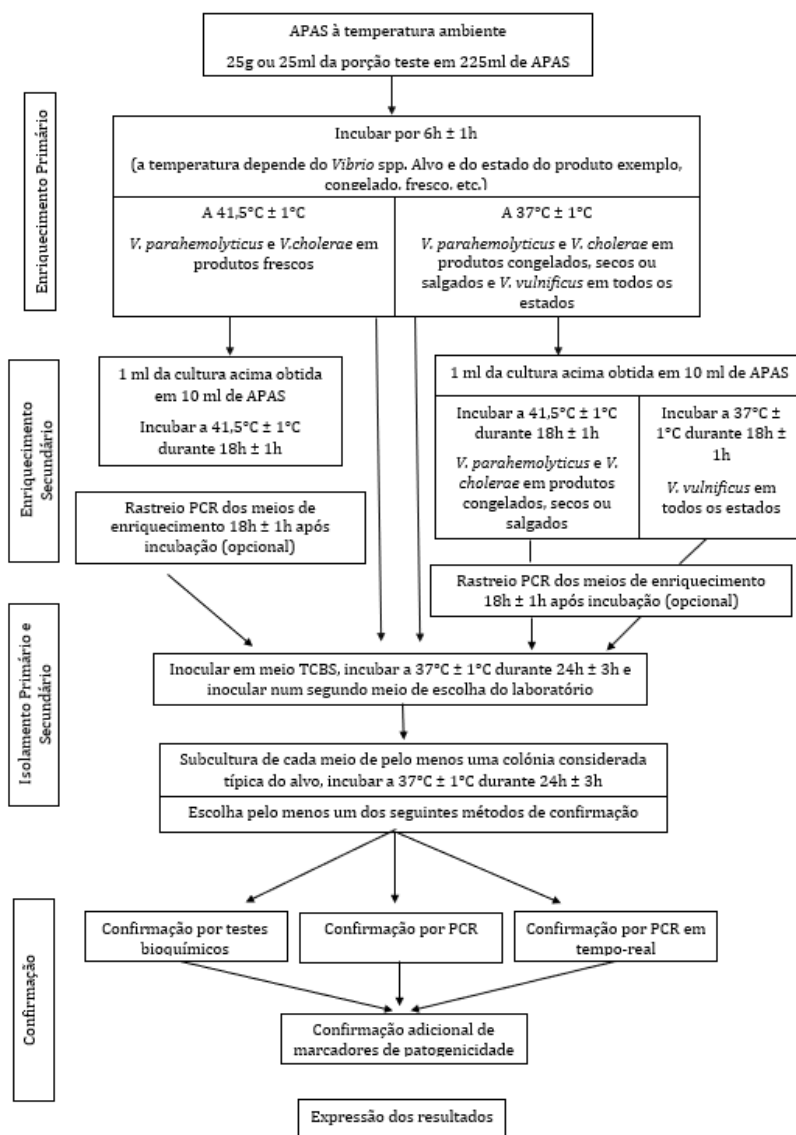


Figura 8 - Fluxograma dos procedimentos a seguir na pesquisa de *Vibrio cholerae*

## 2.2. Meios de cultura usados

Na tabela 3 encontram-se discriminados os meios de cultura usados neste trabalho para a pesquisa de *Vibrio cholerae* pelo método cultural.

Tabela 3 - Meios de cultura usados neste trabalho

Nome do meio de cultura	Marca e ref <sup>2</sup>	Composição	Modo de preparação	Fim a que se destina
Água Peptonada Alcalina Salina (APAS)	Scharlab® 02-697-500	Peptona (20g), Cloreto de sódio (20g) e água (1000ml)	Dissolver os componentes na água, aquecendo-os se necessário. Se necessário, ajustar o PH para que, após a esterilização, seja 8,6 ± 0,2 a 25°C. Dispensar o meio, nas quantidades necessárias para o exame. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos	Água peptonada salina alcalina (ASPW) é usada como meio de enriquecimento primário e secundário para a deteção de <i>Vibrio</i> spp. em produtos alimentares humanos e animais, bem como em amostras ambientais.
Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar (TCBS)	Biolife® 4021062	Peptona (10g), Extrato de levedura (5g) Citrato de sódio(10g), Tiosulfato de sódio(10), Citrato de ferro(1g), Bilis Bovina seca(8g), Sacarose(20g), Azul de bromotimol(0,04g), Azul de timol(0,04g), Agar-Agar( 8g a 18g) e água (1000ml).	Dissolver os componentes ou o meio desidratado completo na água, deixando ferver. Ajustar o pH, se necessário, de modo a que seja 8,6 ± 0,2 a 25 °C. Não esterilizar em autoclave.	O Ágar Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose (TCBS) é utilizado para o isolamento seletivo de <i>Vibrio cholerae</i> e outros vibriões enteropatogênicos de acordo com as normas ISO 21872-1:2017 e ISO 21872-2:2007.
Agar Cromogénico Vibrio	Condalab® 2054.00	Glucose (1g), mistura cromogénica (2,49g), peptona (10g), cloreto de sódio (3g), tiosulfato de sódio (10g), extrato de levedura (3g), ágar bacteriológico (15g), lactose (0,1g), cloreto de sódio (10g), citrato de sódio (10g), sacarose (20g), bilis especial (5g) e água (1000ml).	Suspender 90 gramas de meio num litro de água destilada. Misturar bem e dissolver por aquecimento com agitação frequente. Ferver durante um minuto até estar completamente dissolvido. Evitar o sobreaquecimento. Não esterilizar em autoclave.	Vibrio Chromogenic Agar é recomendado para isolamento seletivo e diferenciação das espécies de vibrio, através da cor desenvolvida em função da atividade enzimática das β-galactosidase e β-glucosidase.
Agar Triptona de Soja (TSA)	Biokar® BM050	Triptona (15g), Digestão Papaica de farinha de Soja (5g), Cloreto de Sódio (5g), Agar (15g) e água (1000ml).	Suspender 40g de pó em 1 litro de água destilada ou deionizada. Aquecer até ferver de forma que fique completamente dissolvido. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Arrefecer entre 45-50 °C. Misturar bem. Distribuir em placas de Petri	O Agar Triptona de Soja (TSA) é um meio de cultivo, isolamento e manutenção de microrganismos fastidiosos (exigentes).
Caldo Triptona Soja (TSB)	acumedia® 7164	Triptona (17g), Digestão Papaica de Farinha de Soja (3g), Glicose (2,5 g), Cloreto de Sódio (5g), Fosfato Dipotássico (2,5g) e água (1000ml).	Suspender 30 g de pó em 1 litro de água destilada. Aquecer até ferver e misturar até ficar completamente dissolvido. Dispensar no recipiente final e esterilizar em autoclave a 121 C por 15 minutos.	É um caldo de uso geral que suporta o crescimento de uma grande variedade de microrganismos anaeróbicos e aeróbicos facultativos.
Brain Heart Infusion broth (BHI)	Biolife® 4012302	Infusão de cérebro desidratado (12,5g), infusão de coração desidratado (5g), digestão enzimática de tecidos animais (10g), glucose (2g), cloreto de sódio (5g), hidrogeno fosfato disódico e água (1000ml)	Suspender 37 g em 1000 ml de água purificada fria, aquecer para dissolver, distribuir e esterilizar por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos.	A digestão enzimática dos tecidos animais e a infusão de cérebro-coração fornecem aminoácidos, azoto, carbono, vitaminas e minerais para o crescimento dos organismos. A glucose é a fonte de hidratos de carbono. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico do meio. O fosfato disódico é o agente tampão

## 2.3. Enriquecimento primário

Para primeiro enriquecimento foi utilizado água peptonada alcalina salina (APAS)(Tabela 4), à temperatura ambiente. Este meio apresenta propriedades que simulam as condições naturais em que *Vibrio spp.* prosperam, tais como a alcalinidade e sais minerais, criando assim um ambiente adequado para a sua recuperação e multiplicação.

Após a identificação da amostra num saco Stomacher® estéril com filtro colocou-se o saco dentro de um recipiente para a sua estabilização, em cima de uma balança analítica (resolução de 0,1 g), e dentro de uma câmara de segurança biológica. Todos os procedimentos do protocolo foram efetuados dentro de uma câmara de segurança biológica e de acordo com as boas práticas de assepsia.

Com uma colher-garfo estéril pesou-se uma porção de  $\pm 25$  g de amostra e adicionou-se 225 mL de APAS. De seguida foi feita a homogeneização da amostra no Stomacher®. Este equipamento consegue, através da ação das pás, maximizar a extração dos microrganismos das amostras de alimentos sendo que as pás desencadeiam o esmagamento, a lavagem e a circulação da amostra no saco.

Realizado este procedimento, colocou-se o saco com a amostra a incubar durante  $6\text{h} \pm 1\text{h}$  a uma temperatura de  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Esta é a temperatura adequada para o caso das amostras congeladas.

## 2.4. Enriquecimento secundário

Decorrido o período de incubação, retirou-se 1 mL da cultura acima obtida e pipetou-se para um tubo de vidro estéril com 10 mL de APAS, o qual foi depois a incubar durante  $18\text{h} \pm 1\text{h}$  a  $41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

## 2.5. Isolamento primário

O primeiro isolamento foi efetuado no meio Ágar de tiosulfato, citrato, bile e sacarose (TCBS; Tabela 2) e no Ágar cromogénico para *Vibrio* da Condalab® (Tabela 2). Pegou-se num tubo de vidro e com uma ansa de 1 microlitro retirou-se parte da película acima formada (caso se forme) inoculando por esgotamento assim uma placa de Petri com o meio de TCBS. Fez-se o mesmo procedimento para a inoculação na placa com o meio de Ágar cromogénico para *Vibrio*. As placas inoculadas foram depois colocadas a incubar a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

## 2.6. Extração de DNA a partir do enriquecimento secundário

De acordo com o que a norma prevê, de forma opcional, decidiu-se neste trabalho fazer a extração de DNA a partir do caldo de enriquecimento secundário.

Neste procedimento foi utilizado o QIAamp® DNA Mini Kit, usado para extrair o DNA de bactérias Gram-negativas. Neste kit o DNA é extraído com sílica não magnética.

Após a transferência de 1mL do meio de enriquecimento para o microtubo o mesmo foi sujeito a uma centrifugação a 5000 g (7500 rpm) durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante (utilizando uma pipeta de Pasteur estéril descartável) e adicionou-se 160  $\mu\text{L}$  de tampão ATL para se obter um volume total de 180  $\mu\text{L}$  (misturando o *pellet* com o tampão ATL). Adicionou-se depois 20  $\mu\text{L}$  de Proteinase K, agitou-se no Vórtex e colocou-se em banho-Maria a  $56^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Após os 10 minutos realizou-se um *spin*. Voltando à câmara de segurança biológica, fez-se a adição de 200  $\mu\text{L}$  do tampão de lise (*Buffer AL*) e agitou-se no Vórtex durante 15 segundos. Voltou novamente ao banho-Maria a  $70^\circ\text{C}$  durante 10 minutos e fez-se novo *spin*. Para a conclusão desta etapa adicionou-

se 200 µL de etanol (96%- 100%), agitou-se no Vórtex durante 15 segundos e fez-se um novo *spin*. Transferiu-se todo o volume da suspensão ( $\pm 600$  µL), incluindo os precipitados, para a coluna presente no Kit.

Feita a transferência fez-se uma centrifugação a 6000 g (8000 rpm) durante 1 minuto, rejeitou-se o tubo coletor que contém o líquido filtrado e colocou-se a coluna num novo tubo coletor. Adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem AW1 e novamente centrifugou-se a 6000 g (8000 rpm) durante 1 minuto, repetindo-se o passo anterior.

Adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem AW2 e centrifugou-se a 15100 g (máx: 15000 rpm) durante 3 minutos. Rejeitou-se o tubo coletor com o líquido filtrado e tornou-se a centrifugar 15100 g (máx: 15000 rpm) durante 1 minuto (sem adição de nenhum reagente). Descartou-se o tubo coletor com o filtrado e transferiu-se a coluna para um microtubo. Concluindo o processo, adicionou-se 200 µL do tampão de eluição (*Buffer AE*) para a remoção do DNA da coluna, deixou-se 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 6000 g (8000 rpm) durante 1 minuto. Por fim, rejeitou-se a coluna e conservou-se o microtubo que contem os ácidos nucleicos. A conservação deve ser feita a uma temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ , ou a  $-20^{\circ}\text{C}$  se o DNA não for usado nas 24h seguintes.

### 3. PCR (*prVC*)

Para a deteção de *Vibrio cholerae* recorreu-se novamente à Norma 21872-1:2017 anexo C para se obter informações acerca da composição da *mastermix*, dos *primers* necessários e dos parâmetros da amplificação (tempo / temperatura / número de ciclos).

#### 3.1. *Primers*

As características dos 2 conjuntos de *primers* usados na reação de amplificação encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Características dos primers *prVC* e *pUC19* e produtos de amplificação

Gene	Primer	Sequência oligonucleotídeo (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>prVC</i>	<i>prVC forward</i>	TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G	295 a 310
	<i>prVC reverse</i>	AGT CAC TTA ACC ATA CAA CCC G	
<i>pUC19 (CIR)</i>	<i>CIR forward</i>	GCA GCC ACT GGT AAC AGG AT	118
	<i>CIR reverse</i>	GCA GAG CGC AGA TAC CAA AT	

#### 3.2. Implementação do controlo interno de reação (*pUC19*)

Dada a necessidade de garantir que nada iria interferir no PCR (e deste modo obter falsos negativos) foi decidido o uso de um controlo interno de reação (CIR), neste caso o plasmídeo pUC19 (118 pares de bases).

Entendeu-se então que uma das formas possíveis seria adicionar controlo positivo a cada uma das amostras num outro tubo de reação de PCR.

Seguindo essa possibilidade a composição da *mastermix* foi a seguinte.

**Tabela 5 - Composição da mastermix (prVC)**

<i>Vibrio cholerae</i> (prVC - 295 a 310pb)	
Reagentes	Volume por Reação (μL)
Água isenta de nucleases	17,8
Tampão Taq (10x)	5
DNTP's (20 mM)	0,32
Primer prVC F (10mM)	0,25
Primer prVC R (10mM)	0,25
Taq (5U)	0,13
Volume Final	25
Volume Mix	23,75
Volume DNA	1,25

Chegando à sala de ácidos nucleicos e após o equipamento de uma bata exclusiva da sala e ter-se calçado luvas retiraram-se os reagentes (tampão Taq, dNTP's, *Primers prVC Forward e Reverse* e por fim a Taq polimerase) do congelador e deixaram-se a descongelar num suporte frio designado *cooler*, à temperatura ambiente. Enquanto decorria a descongelação procedeu-se à identificação dos tubos de PCR que posteriormente iriam ser preenchidos pela ordem definida.

Voltou-se à preparação da mastermix onde pipetou-se todos os reagentes nos volumes específicos para um microtubo (mastermix); agitou-se no Vórtex e fez-se um spin; arrumou-se os reagentes e usando a mastermix pipetou-se 23,75 μL para cada reação; De seguida pipetou-se 1,25 μL de DNA tendo como volume final 25 μL; para os tubos de PCR que irão servir como CIR no volume de DNA pipetado existiram alterações, pipetou-se 0,75 μL da amostra e 0,50 μL de controlo positivo a *Vibrio Cholerae*;

Finalizando todo o processo fez-se um spin nas amostras.

### 3.3. Composição da mastermix com pUC19 implementado

Segundo a mesma Norma, os volumes por reação são apresentados para obter um volume final de 50 μL. No entanto, decidiu-se trabalhar com um volume de 25 μL, garantindo da mesma forma a eficiência e a certeza nos resultados.

**Tabela 6 - Composição da mastermix com pUC19 (prVC)**

<i>Vibrio cholerae</i> (prVC - 295 a 310pb)	
Reagentes	Volume por Reação (µL)
Água isenta de nucleases	16,3
Buffer Taq (10x)	5
dNTP 'S (20 mM)	0,32
Primer prVC F (10mM)	0,25
Primer prVC R (10mM)	0,25
Taq (5U)	0,13
Primer CIR F (10mM)	0,25
Primer CIR R (10mM)	0,25
pUC-19 (1µL) 10*6	1
Volume Final	25
Volume Mix	23,75
Volume DNA	1,25

### 3.4. Condições de amplificação para a reação de PCR (prVC)

A amplificação de DNA foi realizada no termociclador Pro Flex (Thermo Fisher Scientific®) disponível na sala de termocicladores do INSA.

Recorrendo à ISO 21872-1:2017 tabela C.3 retirou-se o protocolo das condições de amplificação para a reação de PCR (prVC).

**Tabela 7 - Protocolo tempo/temperatura PCR prVC**

Descrição da etapa	Temperatura e Tempo	Número de ciclos
Pré-aquecimento	94°C por 2min	1
Amplificação	Desnaturação	94°C por 1min
	Annealing	50°C por 1 min
	Extensão	72°C por 1,5 min
Pós-amplificação	72°C por 10min	1

### 3.5. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose

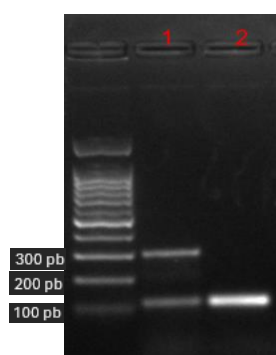
A separação dos produtos PCR de cada uma das amostras de DNA foi efetuada por eletroforese em gel de agarose (GRS Agarose LE, GA110.0500, GRISP®).

Preparou-se um gel de agarose a 2% conforme descrito pela ISO 21872-1:2017 ponto C10. Após preparação, o gel foi colocado submerso em TAE 1x (Tampão tris acetato edta) numa tina de eletroforese.

Carregaram-se os poços, de acordo com a seguinte sequência: no primeiro poço e no último poço colocou-se 4 µL de marcador (*100bp DNA Ladder; biotium®*). Nos restantes poços colocou-se 10 µL da mistura de amplificação.

Carregados os poços foi iniciada a corrida eletroforética a uma voltagem de 90V durante aproximadamente 1 hora e 20 minutos.

Após terminada a corrida eletroforética, observou-se e fotografou-se recorrendo ao Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad®). Todas as amostras que no passo anterior deram negativo a *Vibrio cholerae* (*prVC*) são descartadas, não fazendo assim o seu isolamento secundário.



**Figura 9** - Produtos da reação PCR com *pUC19*. 1- Produto PCR positivo a *prVC* e positivo a *pUC19*; 2- Produtos PCR positivo a *pUC19*.

#### 4. Isolamento secundário

Após o isolamento primário realizou-se um isolamento secundário que resultou das colónias formadas com características específicas para presença de *Vibrio cholerae*. Após a análise das placas do primeiro isolamento e observação de colónias típicas fez-se a seleção de 5 colónias características de cada meio usado no isolamento primário (TCBS e Ágar Cromogénico Condalab®) e repicaram-se as colónias selecionadas para Triptona Soja Ágar (TSA) e novamente para o Ágar Cromogénico Condalab®. As placas foram depois a incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

#### 5. Teste de oxidase

Para a triagem dos bacilos Gram-negativos (BGN) não fermentadores da glicose, recomenda-se a pesquisa da oxidase, visto que algumas bactérias utilizam este açúcar pela via oxidativa, como é o caso do *Vibrio cholerae*.

Passado as 24 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , o teste da oxidase é realizado nas colónias suspeitas de serem *Vibrio cholerae* que estão subcultivadas em TSA. As colónias que apresentarem uma reação positiva

para o teste avançam para a confirmação deste microrganismo, ao contrário das que apresentarem uma reação negativa.

## 6. Conservação dos isolados

Para se proceder à conservação dos isolados, foram usados criotubos com triptona soja broth (20% de glicerol) e posteriormente colocados a -80 °C.

## 7. Extração do DNA de culturas suspeitas após o isolamento secundário

Sempre que se obtiveram culturas puras suspeitas de *Vibrio cholerae* no isolamento secundário procedeu-se à extração do DNA pelo método de fervura. Identificou-se um microtubo no qual foi pipetado 100 µL de água MilliQ. A partir de uma colónia isolada e recorrendo a uma ansa de 1 µL tocou-se numa colónia (retirando uma quantidade generosa de amostra, mas garantido sempre a pureza da mesma) que posteriormente foi suspensa no microtubo. Após a suspensão colocou-se o microtubo em banho-Maria fervente (99°C) durante 10 minutos. Passado os 10 minutos centrifugou-se a 15100 g (15000 rpm) durante 10 minutos. Concluindo pipetou-se o sobrenadante para um microtubo, conservando-se assim o DNA a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  ou  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  se não se realizar ensaios em 24h.

## 8. PCR (subunidades *ctxA* e *ctxB*)

Foi utilizada uma reação em cadeia da polimerase que amplifica um fragmento de 564 pares de bases do gene da subunidade A da toxina da cólera (*ctxA*) para identificar estirpes toxigénicas do *Vibrio cholerae*. Foram utilizados também 2 *primers* para amplificar um fragmento de 460 pares de bases do *ctxB* (Fields *et al.*, 1993).

### 8.1. Primers *ctxA* e *ctxB*

As características dos 2 conjuntos de *primers* usados na reação de amplificação encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Primers PCR *ctxA* e *ctxB*

Gene	Primer	Sequencia oligonucleotídeo (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>ctxA</i>	ctx 2	CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G	564
	ctx 3	CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC	
	ctx 7	GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC	
<i>ctxB</i>	ctx9	GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT G	460

## 8.2. Composição da mastermix (com *pUC19*) do *ctxA*

A composição do mastermix encontra-se descrita na Tabela 9 de acordo com o descrito por Fields *et al.* (1993), com algumas alterações/adaptações, nomeadamente nos dNTP's e na Taq polimerase.

**Tabela 9 - Composição da mastermix (com CIR) do *ctxA***

<i>Vibrio cholerae</i> ( <i>ctxA</i> - 564pb)	
Reagentes	Volume por Reação (µL)
Água livre de nucleases	36,75
Buffer Taq (10x)	5
dNTP 'S (2,5 mM)	4
<i>ctxA</i> F (10mM)	0,5
<i>ctxA</i> R (10mM)	0,5
Taq (5U)	0,25
Primer CIR F (10mM)	0,5
Primer CIR R (10mM)	0,5
pUC-19 (1µL) 10*7	1
Volume Final	50
Volume Mix	49
Volume DNA	1

## 8.3. Condições de amplificação para a reação de PCR (*ctxA*)

A amplificação de DNA foi realizada no termociclador Pro Flex disponível na sala de termocicladores do INSA de acordo com protocolo definido por Fields *et al.* (1993).

**Tabela 10 - Protocolo tempo/temperatura PCR *ctxA***

Descrição da etapa	Temperatura e Tempo	Número de ciclos	
Pré-aquecimento	95°C por 5min	1	
Amplificação	Desnaturação	95°C por 1min	
	Annealing	60°C por 1 min	25
	Extensão	72°C por 1 min	
Pós-amplificação	72°C por 10min	1	

## 8.4. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose 1% (*ctxA*)

A separação dos produtos PCR de cada uma das amostras de DNA foi efetuada por eletroforese em gel de agarose (GRS Agarose LE, GA110.0500).

Preparou-se um gel de agarose a 1% conforme descrito por Fields *et al.* (1992). Após preparação, o gel foi colocado na tina de eletroforese onde já tinha sido colocado o tampão TAE 1x.

Carregaram-se os poços, de acordo com a seguinte sequência: no primeiro poço e no último poço colocou-se 4 µL de marcador (100 bp DNA Ladder, ; *biotium*®). Nos restantes poços colocou-se 10 µL da mistura de amplificação.

Carregados os poços foi iniciada a corrida eletroforética a uma voltagem de 90V durante aproximadamente 1 hora e 20 minutos (80 minutos).

Após terminada a corrida eletroforética, observou-se e fotografou-se recorrendo ao Gel Doc™ XR+.

### 8.5. Composição da mastermix (com pUC19) do *ctxB*

A composição da mastermix baseou-se no estudo descrito por Fields *et al* (1992), com apenas duas alterações, ao nível da adição de dNTP's e da Taq polimerase.

**Tabela 11** - Composição da mastermix (com CIR) do *ctxB*

<i>Vibrio cholerae</i> ( <i>ctxB</i> – 460pb)	
Reagentes	Volume por Reação (µL)
Água livre de nucleases	36,75
Buffer Taq (10x)	5
dNTP's (2,5 mM)	4
<i>ctxB</i> F (10mM)	0,5
<i>ctxB</i> R (10mM)	0,5
Taq (5U)	0,25
Primer CIR F (10mM)	0,5
Primer CIR R (10mM)	0,5
pUC-19 (1µL) 10*6	1
Volume Final	50
Volume Mix	49
Volume DNA	1

### 8.6. Condições de amplificação para a reação de PCR (*ctxB*)

A amplificação de DNA foi realizada no termociclador Pro Flex disponível na sala de termocicladores do INSA.

De acordo com o mesmo artigo retirou-se o protocolo tempo/temperatura para a reação de PCR (*ctxB*). Foram realizadas algumas alterações no protocolo para um melhor desempenho e visualização das bandas.

**Tabela 12 - Protocolo tempo/temperatura PCR *ctxB***

Descrição da etapa	Temperatura e Tempo	Número de ciclos
Pré-aquecimento	95°C por 5min	1
Amplificação	Desnaturação	95°C por 1min
	Annealing	50°C por 1 min
	Extensão	72°C por 1 min
Pós-amplificação	72°C por 10min	1

## 8.7. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose 1% (*ctxB*)

A separação dos produtos PCR de cada uma das amostras de DNA foi efetuada por eletroforese em gel de agarose (GRS Agarose LE, GA110.0500).

Preparou-se um gel de agarose a 1% conforme descrito pelo Fields *et al.* (1992). Após preparação, o gel foi colocado na tina de eletroforese onde já se tinha sido colocado o tampão TAE 1x.

Carregaram-se os poços, de acordo com a seguinte sequência: no primeiro poço e no último poço colocou-se 4 µL de marcador (100bp DNA Ladder,304105). Nos restantes poços colocou-se 10 µL da mistura de amplificação.

Carregados os poços foi iniciada a corrida eletroforética a uma voltagem de 90V durante aproximadamente 1 hora e 20 minutos (80 minutos).

Após terminada a corrida eletroforética, observou-se e fotografou-se recorrendo ao Gel Doc™ XR+.

## 9. Exclusividade

Recorreu-se à ISO 16140-3:2021(E) de onde foi retirada toda a informação necessária para se proceder à realização do método da exclusividade.

O estudo da exclusividade envolve estirpes puras não alvo, que podem ser potencialmente reativas (que podem originar reações cruzadas), mas que se espera que não sejam detetadas ou enumeradas pelo método em estudo.

Para se proceder ao estudo, o mínimo de estirpes não-alvo requisitas pela norma são cinco, mas neste caso foram analisadas sete estirpes não-alvo.

## 10. Limite de deteção

Com o objetivo de determinar o limite de deteção do PCR, recorreu-se a duas amostras analisadas anteriormente. Estas amostras encontravam-se conservadas no congelador e tinham tido um resultado negativo para a pesquisa de *Vibrio cholerae* em 25 g.

As estirpes utilizadas (*Vibrio cholerae* ctx negativa proveniente do programa nacional de avaliação externa da qualidade, referência VO171, 23/117471 e *Vibrio cholerae* ctx positivo (O139) proveniente do instituto Pasteur, referência 104151) foram previamente inoculadas em meio TSA e incubadas durante  $18\text{h} \pm 1\text{h}$  a  $37,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Para ambas as estirpes, fez-se a repicagem de uma colónia e colocou-se em 5 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI) (Biolife, 4012302) onde ficaram a incubar durante 24h a  $37,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Foram feitas diluições sucessivas até se obterem as diluições pretendidas.

As amostras foram colocadas a descongelar, à temperatura ambiente, enquanto se preparava todo o material necessário para a progressão do estudo.

Após o descongelamento foram identificados dois sacos Stomacher® e posteriormente colocados num suporte (com constante monitorização do peso recorrendo a uma balança analítica onde por fim foi colocado  $\pm 25$  gramas de amostra (em cada saco de cada uma das amostras) e  $\pm 225$  mL de APAS.

Realizado o passo anterior colocou-se o Saco no Homogeneizador (Stomacher®). Contaminou-se de seguida um dos sacos com 1ml de  $10^{-5}$  ( $10^4$  UFC/ml) de uma estirpe de *Vibrio cholerae* ctx negativo e 1ml de  $10^{-8}$  ( $<1$  UFC/ml) de uma estirpe de *Vibrio cholerae* ctx positivo. No outro saco o processo foi idêntico pipetando-se 1ml de  $10^{-5}$  ( $10^4$  UFC/ml) de uma estirpe de *Vibrio cholerae* ctx negativo e 1ml de  $10^{-7}$  ( $10^1$  UFC/ml) de uma estirpe de *Vibrio cholerae* ctx positivo. Realizado o procedimento ambos os enriquecimentos foram colocados a incubar durante  $6\text{h} \pm 1\text{h}$  a  $37,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Microrganismo não alvo - Para se determinar a quantidade de UFC/ml com que contaminámos o enriquecimento primário das amostras plaqueou-se 0,1ml da diluição  $10^{-6}$  e 0,1ml da diluição  $10^{-7}$  da estirpe de *Vibrio cholerae* ctx negativo em placas de TSA.

**Tabela 13** - Controlo positivo

Volume/diluição ( $37^\circ\text{C}$ durante 24 horas)	Número de colónias em TSA (Passado 24 horas a $37^\circ\text{C}$ )
0,1 ml da diluição $10^{-6}$	163
0,1 ml da diluição $10^{-7}$	20

Microrganismo alvo- O mesmo procedimento foi efetuado para a estirpe de *Vibrio cholerae* ctx positivo inoculando por espalhamento 0,1ml da diluição  $10^{-6}$  e 0,1ml da diluição  $10^{-7}$  em TSA.

**Tabela 14** - Volume/diluição para o microrganismo alvo

Volume/diluição (37°C durante 24 horas)	Número de colónias em TSA (Passado 24 horas a 37°C)
0,1 ml da diluição 10 <sup>-6</sup>	9
0,1 ml da diluição 10 <sup>-7</sup>	2

Dado os resultados pode-se inferir que contaminámos a amostra A com uma carga microbiológica de 10<sup>4</sup> ufc/ml do microrganismo não alvo e <1 ufc/ml do microrganismo alvo. No caso da mostra B contaminámos a mesma com 10<sup>4</sup> ufc/ml do microrganismo não alvo e com uma carga microbiana de 10 ufc/ml (10<sup>1</sup>) do microrganismo alvo.

## IV. Resultados e Discussão

O objetivo do estudo foi cumprido tendo sido implementado o PCR para pesquisa dos genes *ctxA* e *ctxB* quer a partir do meio de enriquecimento dos géneros alimentícios quer nos isolados e foi também implementando com sucesso um controlo interno de amplificação para todos os PCR's implementados/validados. Não se obteve nenhuma amostra positiva ao gene *ctx*, consideramos assim um ponto positivo.

### 1. Amostras positivas/negativas de *Vibrio cholerae*

Das 38 amostras de camarão analisadas, 9 testaram positivo ao gene *prVC*. Isso significa que aproximadamente 24% das amostras apresentaram contaminação de *Vibrio cholerae*.

A prevalência de *Vibrio cholerae* em camarões foi documentada em várias regiões. Na Tailândia, 55 de 125 amostras (44%) de camarão estavam contaminadas, predominantemente com estirpes sem genes de virulência e não pertencentes aos serogrupos O1 ou O139 (Preeprem *et al.*, 2014). Na Sicília, Itália, de 165 amostras, 12 (7,3%) continham *Vibrio cholerae*, também sem genes de virulência e pertencentes a diferentes serogrupos, excluindo O1 e O139 (Castello *et al.*, 2022). Segundo o relatório europeu sobre zoonoses "One Health in 2022", os Países Baixos realizaram análises em 327 lotes de peixe cru, crustáceos e camarões coletados em postos de controlo fronteiriços, identificando *Vibrio cholerae* não toxigénico em 11 lotes (EFSA/ECDC, 2023).

### 2. Países de origem

As amostras que foram analisadas são provenientes de sete países diferentes (que normalmente reportam casos positivos de *Vibrio cholerae*). Das 38 amostras, 20 são provenientes do Equador, 10 da Índia, 4 da Argentina, 1 do Bangladesh, 1 da Venezuela, 1 do Madagáscar e 1 de Moçambique.

Tabela 15 - Resultados obtidos por país de origem

País de Proveniência	Amostras analisadas	Amostras positivas a <i>prVC</i>
Equador	20	5
Índia	10	3
Argentina	4	0
Bangladesh	1	0
Venezuela	1	1
Madagáscar	1	0
Moçambique	1	0

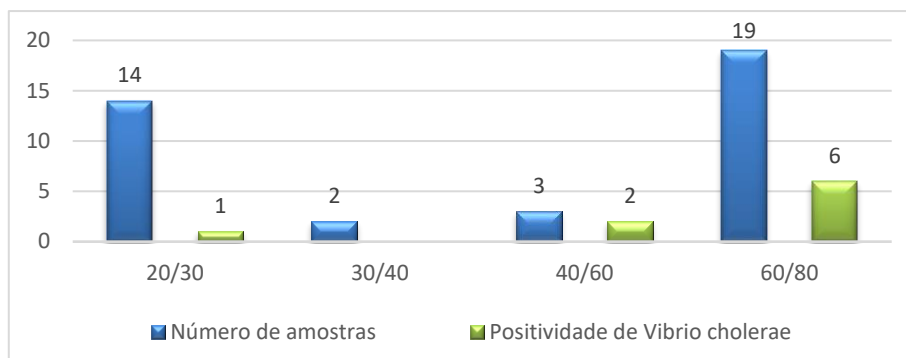
Analisando a tabela 15, podemos concluir que o Equador e a Índia apresentam o maior número de positivos (5 e 3 respetivamente). A Venezuela conta com 1 positivo, mas dado que só houve 1 amostra analisada, não considerámos relevante.

Dado que as condições ambientais nos países com elevado número de casos positivos, como a Índia e o Equador, são propícias ao crescimento e desenvolvimento do *Vibrio cholerae*, é natural que estes agentes patogénicos estejam mais disseminados. Em resposta a esta realidade, os governos implementam missões específicas para combater e erradicar estes patógenos. Este esforço tem sido associado a melhorias significativas na saúde da população indiana, evidenciando a eficácia das iniciativas governamentais em promover condições de vida mais saudáveis através do acesso a água potável segura (Paunika *et al.*, 2023).

### 3. Tamanho do camarão

Neste estudo é possível identificar uma maior positividade nas amostras de maior calibre (40/60 e 60/80), como mostra a Figura 10.

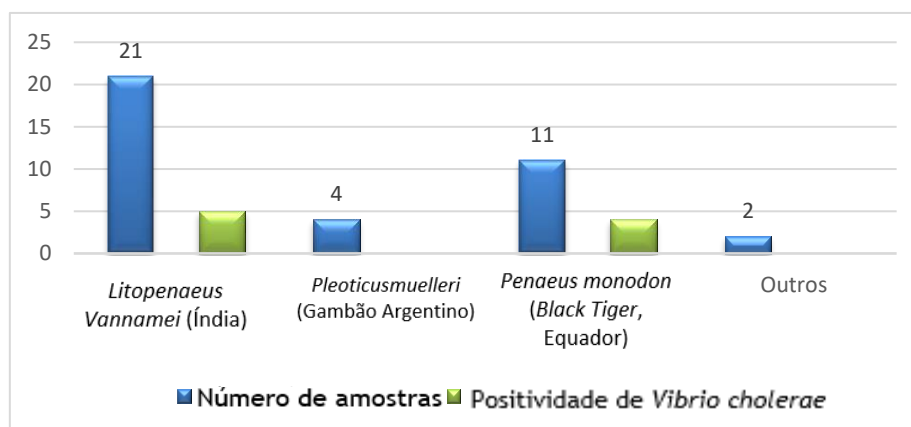
Para se obter 25 gramas (como manda proceder a norma) do camarão 40/60 e 60/80 são necessários mais camarões, ou seja, a probabilidade de encontrarmos um positivo será maior face aos tamanhos maiores (20/30 e 30/40).



**Figura 10** - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para *Vibrio cholerae* em função do tamanho do camarão

#### 4. Espécie do camarão

Neste estudo, a espécie *Litopenaeus vannamei* (Índia), com 21 amostras analisadas, 5 amostras foram positivas a *Vibrio cholerae*. A espécie *Penaeus monodon* (Black Tiger, Equador), com 11 amostras analisadas, 4 amostras foram positivas a *Vibrio cholerae*. As restantes espécies com um total de 6 amostras analisadas, apresentaram 0 amostras positivas (Figura 11).



**Figura 11** - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para *Vibrio cholerae* em função da espécie de camarão

#### 5. Método de criação do camarão

Apesar do reduzido número de amostras por espécie de camarão analisada, das 32 amostras de camarão de aquacultura analisadas, 9 testaram positivo para *Vibrio cholerae*. Em contraste, das 6 amostras de camarão selvagem analisadas, nenhuma estava contaminada com *Vibrio cholerae*. Haque *et al.* (2023) identificaram *Vibrio cholerae* em 24,7% das amostras de aquacultura analisadas no Bangladesh, com uma maior incidência em amostras de camarão, atingindo os 38% (Figura 12). Por outro lado, Gopal *et al.* (2005) estudaram a presença de várias espécies de *Vibrio* em amostras de água e camarões de várias instalações de aquacultura ao longo da costa leste e oeste da Índia.

Embora tenham detetado *Vibrio cholerae* em alguns casos, todos os isolados foram negativos para o gene *ctx*.

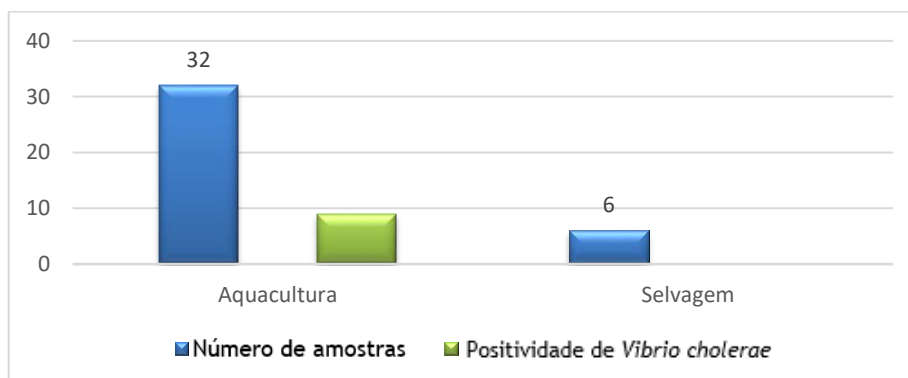


Figura 12 - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para *Vibrio cholerae* em função do método de criação do camarão

Poderá debater-se estes valores com base no aumento de produção que os aquicultores pretendem. Para atingir esse objetivo, têm recorrido à intensificação com altas densidades de povoamento e uma alimentação suplementar intensiva. No entanto, esta prática, aliada à proximidade dos sistemas de aquicultura das zonas costeiras, tem resultado na deterioração da qualidade da água, no aparecimento de várias doenças e na maior probabilidade de contacto com águas residuais contaminadas (Lekshmy *et al.*, 2014).

## 6. Superfícies comerciais

Fazendo uma avaliação da Figura 13 podemos averiguar que as superfícies comerciais A e B apresentam as maiores taxas de contaminação, apresentando 50% das suas amostras positivas. A superfície C também apresenta uma taxa de contaminação elevada, com 43% das suas amostras positivas. Por outro lado, as superfícies comerciais D, E, F, G, H, J e L não apresentaram amostras positivas (0%).

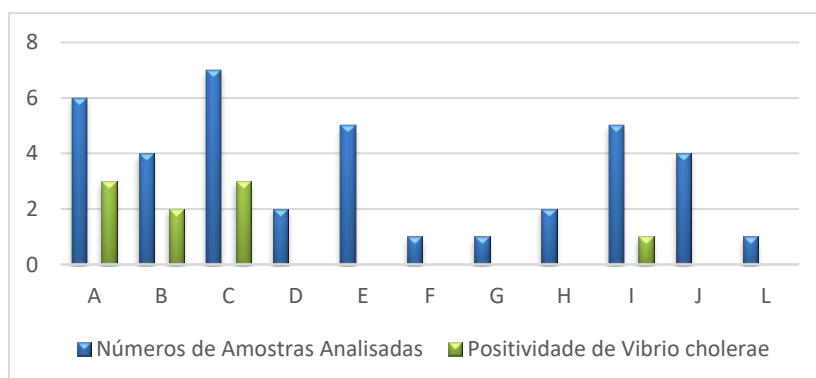
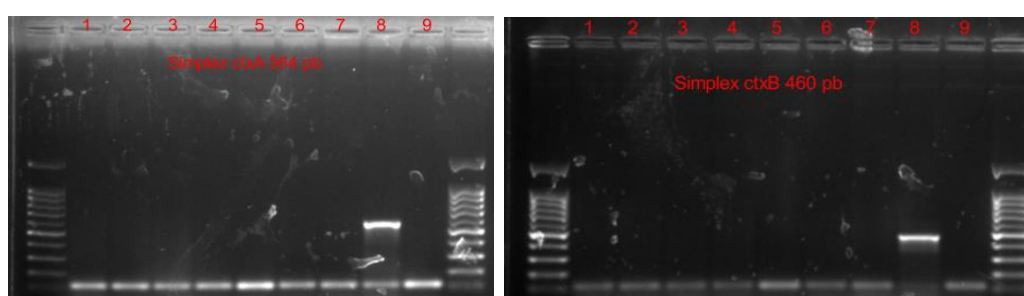


Figura 13 - Número de amostras analisadas e de amostras positivas para *Vibrio cholerae* em função da superfície comercial de onde o camarão foi adquirido

Preeprem *et al.* (2023) isolaram recentemente *Vibrio* spp. de marisco proveniente de pontos de venda a retalho na província de Yala, na Tailândia, e verificaram que 34% dos isolados eram *Vibrio cholerae*. Um estudo recente determinou a prevalência de *Vibrio* spp. no comércio retalhista de marisco em Berlim, Alemanha (Vu *et al.*, 2018). Estes resultados indicam que certas superfícies comerciais tem uma maior incidência de contaminação por *Vibrio cholerae* nos seus produtos congelados de camarão.

## 7. Resultado do PCR (exclusividade)

Concluía a eletroforese e analisando os resultados (Figura 14) construiu-se a tabela 16.



**Figura 14** -Imagem da esquerda representa os resultados para *ctxA* e a imagem da direita representa os resultados para *ctxB*. 1, 2 e 3- Produto de PCR (*Vibrio parahaemolyticus*); 4 e 5- Produto PCR (*Vibrio vulnificus*); 6: Produto PCR (*Vibrio alginolyticus*); 7- Produto PCR (*Vibrio cholerae*); 8- Controlo positivo; 9- Produto PCR (Branco).

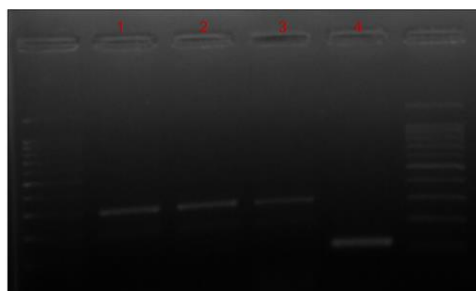
**Tabela 16** - Resultados obtidos do PCR da exclusividade

Estirpes	Número de Estirpes	Genes de toxinas detetadas	
		<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	2	0	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	1	0	0

Apesar dos produtos de pesca poderem ser contaminados por diferentes espécies de *Vibrio*, que não só contribuem para a deterioração, mas também para a propagação da cólera e de outras doenças de origem alimentar (Haque *et al.*, 2023), concluímos com este teste que não ocorreu amplificação de nenhum dos genes-alvo pelas metodologias de PCR convencional implementadas para as estirpes não-alvo.

## 8. Resultado do PCR (limite de deteção)

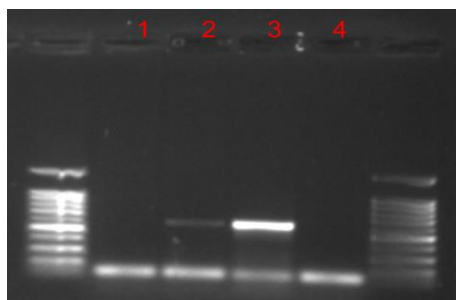
Na amostra A e B foi possível a deteção dos genes não alvo (*prVC*) como mostra a Figura 15.



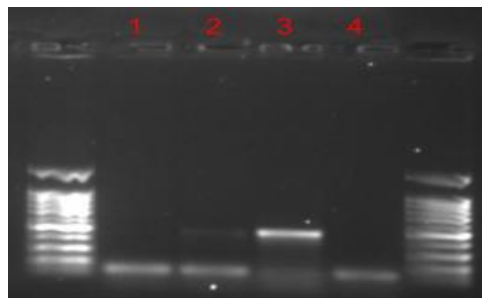
**Figura 15** - Resultados da corrida eletroforética (*prVC*) (enriquecimentos). 1 - Produto de PCR (amostra A); 2 - Produto de PCR (amostra B); 3 - Controlo positivo (*prVC*); 4 - Produto PCR (branco).

O gene alvo (*ctx*) não foi amplificado na mostra A, mas é possível verificar-se a sua amplificação na amostra B como mostra as seguintes Figuras 16 e 17.

Só foi possível a deteção dos genes em estudo na amostra B contaminada com uma carga microbiana de 9 ufc/ml. Podemos assim concluir que não é possível amplificar uma carga microbiana mais baixa.



**Figura 16** - Resultados da corrida eletroforética (*ctxA*) (enriquecimentos). 1-Amostra A negativa a *ctxA*, 2- Amostra B positiva a *ctxA*, 3- Controlo positivo *ctxA*; 4-Produto PCR (branco).



**Figura 17** - Resultados da corrida eletroforética (*ctxB*) (enriquecimentos). 1-Amostra A negativa a *ctxB*, 2- Amostra B positiva a *ctxB*, 3- Controlo positivo *ctxB*; 4-Produto PCR (branco).

## V. Considerações finais

Podemos concluir com base nos resultados obtidos a necessidade de reforçar as práticas de controlo de qualidade para garantir a segurança alimentar ainda que neste estudo a quantidade de amostras coletadas seja um fator limite na confiabilidade dos resultados obtidos. Nesse sentido, como projeção futura recomenda-se um esforço mútuo entre aumentar o número de amostras e garantir o equilíbrio entre elas. Outras projeções futuras seriam, como por exemplo, a caracterização dos isolados de *Vibrio cholerae* obtidos quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos, outros fatores de virulência e comparar com isolados de amostras clínicas, ambientais e alimentares para avaliar associados epidemiológicos. Realça-se também a ausência de critérios microbiológicos (de higiene ou de segurança do produto) no regulamento europeu e na legislação portuguesa para este género alimentício, considerando-se importante a implementação de critérios de controlo microbiológico transversais a toda a Europa.

## Referências Bibliográficas

- Almeida, M. A. (2021). As epidemias de cólera em Portugal 1833-1975. Em Jorge Couto (Eds.). Atlas de história de Portugal: uma perspetiva geopolítica (pp 232-233).
- Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., & Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, Vol. 2(1), pp. 7-18.
- Budiman, A., Kurnia, K., & Waturangi, D. E. (2022). Prevalence and molecular characterization of *Vibrio cholerae* from fruits and salad vegetables sold in Jakarta, Indonesia, using most probable number and PCR. *BMC Research Notes*, Vol. 15, pp 63.
- Cholera Annual Report 2022. Weekly Epidemiological Record 38, 22 September 2023, Vol 98, (pp 431-452).
- Clemens, J. D., Nair, G. B., Ahmed, T., Qadri, F., & Holmgren, J. (2017). Cholera. *Lancet*, Vol. 390, pp 1539-1549.
- Di Maro, O., Proroga, Y. T. R., Castellano, S., Balestrieri, A., Capuano, F., Arletti, E., Vietina, M., Bizzarri, M., Murru, N., Peruzzy, M. F., & Cristiano, D. (2024). Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in foods: Polymerase chain reaction-based screening strategy to rapidly detect pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus* in bivalve mollusks and preliminary results. *Italian Journal of Food Safety*, 13(1), 11635.
- ECDC (2024). Cholera worldwide overview. European Centre for Disease Prevention and Control. Disponível em <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/cholera/surveillance-and-disease-data/cholera-monthly>. Acedido em junho 2024
- EFSA/ECDC. (2023). European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, Vol. 21(12), pp 1-222.
- Fernández-Delgado, M., Garcia-Amado, M., Contreras, M., Incani, R. N., Chirinos, H., Rojas, H., & Suárez, P. (2015). Survival, induction, and resuscitation of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state in the Southern Caribbean Sea. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, Vol. 57(1), pp 21-26.
- Fields, P. I., Popovic, T., Wachsmuth, K., & Olsvik, O. (1992). Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 30(8), pp 2118-2121.
- Fields, P. I., Popovic, T., Wachsmuth, K., Olsvik, O., Wahlberg, J., Petterson, B., & Uhlén, M. (1993). Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 31(1), pp 22-25.
- Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., & Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 102(2), pp 151-159.
- Haque, Z.F., Islam, S., Sabuj, A.A.M., Pondit, A., Sarkar, A.K., Hossain, G. y Sukumar, S. (2023). Molecular detection and antibiotic resistance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from Shrimp (*Penaeus monodon*) and shrimp environments in Bangladesh. *Aquaculture Research*, 2023: 5436552, pp: 1-11.

Islam, M. S., Rahim, Z., Sultana, M., Hossain, M. A., Khan, M. N. A., & Rahman, M. Z. (2022). Molecular detection and antibiotic resistance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from shrimp (*Penaeus monodon*) and shrimp environments in Bangladesh. *International Journal of Microbiology*, 2022, 6601657. Vol. 2022, pp 1-10.

Jantapaso, H., Aksonkird, T., & Mittraparp-arthorn, P. (2024). Characteristics of *Vibrio cholerae* isolates obtained from shrimp supply chains and inhibitory activities of rambutan (*Nephelium lappaceum* L. cv. Rong Rian) peel aqueous extract. *Food Control*, Vol. 158, pp 1-11.

Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, H. D., Schiefer, H. G., Slenczka, W., von Graevenitz, A., & Zahner, H. (2003). In H. Krauss, A. Weber, M. Appel, B. Enders, H. D. Isenberg, H. G. Schiefer, W. Slenczka, A. von Graevenitz, & H. Zahner (Eds.), *Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans* (3rd ed.). Washington: ASM Press.

Lekshmy, S., Nansimole, A., Mini, M., Athira, N., & Radhakrishnan, T. (2014). Occurrence of *Vibrio cholerae* in shrimp culture environments of Kerala, India. *Indian Journal of Scientific Research*, Vol. 5(2), pp 151-160.

Montero, D. A., Vidal, R. M., Velasco, J., George, S., Lucero, Y., Gómez, L. A., Carreño, L. J., García-Betancourt, R., & O’Ryan, M. (2023). *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. *Frontiers in Medicine*, Vol. 10, artigo 1155751.

Paunika, Vaishali; Misra, Purbasha (2023). "Healthy Drinking Water as a Necessity in Developing Countries Like India." *Cureus*, vol. 15, no. 5, pp. 1-11.

Preeprem, S., Aksonkird, T., Nuidate, T., Hajimasalaeh, W., Hajiwangoh, Z., & Mittraparp-arthorn, P. (2023). Characterization and genetic relationships of *Vibrio* spp. isolated from seafood in retail markets, Yala, Thailand. *Trends in Sciences*, Vol. 20(10), pp. 5962-5962.

Preeprem, S., Mittraparp-arthorn, P., Bhoopong, P., & Vuddhakul, V. (2014). Isolation and characterization of *Vibrio cholerae* isolates from seafood in Hat Yai City, Songkhla, Thailand. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol. 11(11), pp. 881-886.

Sampaio, A., Silva, V., Poeta, P., & Aonofriesei, F. (2022). *Vibrio* spp.: Life strategies, ecology, and risks in a changing environment. *Biodiversity of Vibrios*, Vol. 68, pp. 403-431.

Vaz, A. S. (2013). Controlo e prevenção da cólera (Dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra.

Vu, T. T. T., Alter, T., & Huehn, S. (2018). Prevalence of *Vibrio* spp. in retail seafood in Berlin, Germany. *Journal of Food Protection*, Vol. 81(4), p. 593-597.

Wa, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 68(3), pp. 403-431.

Waldor, M. K., & RayChaudhuri, D. (2000). Treasure trove for cholera research. *Nature*, Vol. 406(6795), pp. 469-470.

WHO (2023). Cholera. World Health Organization. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cholera> . Acedido em junho de 2024

## Anexo- Vacinas aprovadas e comercializadas. Fonte: Montero *et al.* (2023)

Vacina	Fabricante	Estado	Composição	Calendário de Imunização	Duração da proteção
Dukoral®	SBL vaccin Suécia	Licenciada em 1991 na Suécia, e em mais de 60 países desde então.	Vacina monovalente. Contêm estirpes mortas pela ação do calor. Estirpes de <i>Vibrio cholerae</i> O1 (estirpe clássica de Inaba, clássica Cairo 48, clássica Ogawa, Cairo 50 e El Tor Inaba estirpe Phil 6.973), juntamente com 1 mg de rCTB.	Administração oral. Para indivíduos com idade igual ou superior a 2 anos. As crianças de 2-5 anos necessitam de 3 doses administradas com 7-14 dias de intervalo, com um reforço recomendado após 6 meses. Os indivíduos com 5 anos ou mais necessitam de 2 doses com um intervalo de 7-14 dias, sendo recomendada uma dose de reforço após 2 anos.	Oferece proteção para 6 meses a 2 anos.
mORC-Vax™	VaBiotech Vietname	Licenciado em 1997 no Vietname para uso local apenas. Não é pré-qualificado.	Vacina bivalente. Contêm estirpes mortas pela ação do calor. Estirpes de <i>Vibrio cholerae</i> O1 (estirpe clássica de Inaba, Cairo 48, Ogawa clássica, Cairo 50, e El Tor Inaba Phil e a estirpe de <i>Vibrio cholerae</i> O139, 4260B.	Administração oral. Para indivíduos com idade igual ou superior a 2 anos. Duas doses administradas com 14 dias de intervalo. Não há recomendação de reforço do por parte do fabricante.	Oferece proteção durante pelo menos 3 anos.