

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Caracterização De *Vibrio alginolyticus* Associados
Aos Mexilhões *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)
Através De Técnicas Fenogenotípica e Proteômica e
Avaliação Do Seu Perfil De Virulência.**

Greiciane França Bronzato de Almeida

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Vibrio alginolyticus* ASSOCIADOS AOS
MEXILHÕES *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) ATRAVÉS DE TÉCNICAS
FENOGENOTÍPICA E PROTEÔMICA E AVALIAÇÃO DO SEU
PERFIL DE VIRULÊNCIA .**

GREICIANE FRANÇA BRONZATO DE ALMEIDA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza
e Co-orientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de
Concentração Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GREICIANE FRANÇA BRONZATO DE ALMEIDA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO (TESE) APROVADA EM ----/----/----- (Data da defesa)

Miliane Moreira Soares de Souza. Dsc.UFRRJ
(Orientadora)

Dália dos Prazeres Rodrigues. Dsc. FIOCRUZ

Fábio Vieira de Araujo Dsc. UERJ

“Sem **sonhos**, a vida não tem brilho,
Sem metas os sonhos não tem alicerces
Sem prioridades, os sonhos não se tornam **reais**.”

Augusto Cury

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos,
ao meu namorado e aos amigos, pois sem eles
eu não alcançaria meus maiores sonhos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conduzir, guiar os meus passos e permitir alcançar mais essa vitória! Pois mediante a tantas turbulências, a presença do Senhor em minha vida, foi o que me deu forças para continuar lutando pelos meus sonhos!

Aos meus queridos pais Maximo Bronzato de Almeida, meu melhor amigo, e Sandra França da Silva Almeida, pelas renúncias e sacrifícios e mesmo assim estarem ao meu lado, vibrando a cada conquista alcançada. Com eles aprendi que as dificuldades existem, mas que nunca podemos desistir!! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Franciane França Bronzato de Almeida e Max Alberto Bronzato, a compreensão de vocês foi fundamental para conclusão deste trabalho. Peço desculpas pelas vezes que me exaltei, chorei, briguei, me ausentei, e mesmo assim vocês estiveram do meu lado!

A minha avó Hirany França da Silva que mesmo sem entender como funciona esta rotina, se fez presente nos momentos mais necessários!

Ao meu namorado Daniel Cury Mazza por todo apoio, ajuda e dedicação. Você tem sido essencial na minha vida e a cada dia que passa tenho mais certeza que Deus nos uniu com o firme propósito de ser eterno! Obrigada por todo cuidado que tens comigo! Te amo!

Aos meus sogros Laura Therezinha Cury Mazza e Efreim Mazza Junior por me acolherem em tão pouco tempo e me tratarem com tanto carinho! E por me aturarem todas as vezes em que tive que estudar na casa deles!

Às minhas professoras Miliane Moreira Soares de Souza, Shana de Mattos de Oliveira Coelho e Irene da Silva Coelho, pelos ensinamentos, apoio e pela oportunidade de fazer parte dessa equipe, no qual tem contribuído muito para o meu crescimento profissional!

Aos meus amigos Marcelo Santos de Oliva e Lidiane de Castro Soares por toda ajuda ao longo dessa jornada, principalmente com os vibrios! E as amigas Gabrielli Stefaninni Santiago, Anna Carolina Coelho Marín Rojas, Cássia Couto da Motta e Dayane de Araujo Melo, Bianca da Silva Soares, Marisol Alvim Gomez, Felipe Carlos Dubenczuk pela ajuda, pela amizade e por vivenciarem esta etapa junto comigo! E ao amigo Bruno Oliveira de Carvalho por me animar mesmo quando o dia não estava bom!

Às amigas Virginia de Souza Abreu Maques e Flávia Peres, pois mesmo estando longe puderam compartilharem comigo esse momento!

À toda equipe LABACVET pela ajuda e empenho! E à todos que puderam me acompanhar e me incentivaram a alcançar a conclusão desta trabalho!

Agradeço a COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pela bolsa de estudos e patrocínio agraciados durante este mestrado!

BIOGRAFIA

Greiciane França Bronzato de Almeida, ingressou no curso de Ciências Biológicas – da Universidade Severino Sombra – no ano de 2007, diplomando-se em Agosto de 2011.

Durante a graduação, foi estagiária no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, do período de 2010 a 2012, participando de projetos na área de identificação de *Vibrio* spp. a partir de mexilhões sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Em 2012, foi aprovada no processo de seleção do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado na mesma instituição, também sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza.

RESUMO

ALMEIDA, Greiciane França Bronzato de. **Caracterização e perfil fenogenotípico de virulência de *Vibrio alginolyticus* associados aos mexilhões *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) previamente isolados em diferentes pontos da costa do Rio de Janeiro. 43p.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A mitilicultura é o ramo da aquicultura que mais tem se expandido mundialmente. O mexilhão *Perna perna* tem sido considerado o organismo de maior relevância econômica nesse contexto, porém a contaminação microbiológica de seus tecidos desses animais pode inviabilizar seu consumo. *Vibrio alginolyticus* pode ser destacado entre os micro-organismos associados a quadros de infecção em animais marinhos como patógeno oportunista causador de vibriose em peixes, crustáceos e moluscos. O presente trabalho objetivou identificar *V. alginolyticus* associados a mexilhões *Perna perna*, bem como avaliar o perfil fenogenotípico da virulência deste microrganismo, em amostras coletadas em diferentes pontos da costa do Rio de Janeiro. Foram obtidos 49 isolados. Após a análise fenotípica, os isolados foram submetidos as técnicas de detecção do gene *pyrH* por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e MALDI-TOF MS (Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz). Todos os isolados testados amplificaram o gene *pyrH*. O sequenciamento do fragmento de 541pb deste gene é utilizado para diferenciação de espécies de *Vibrio*. Através do MALDI-TOF MS, confirmou-se 43 isolados como *V. alginolyticus* (87,8%), 4 isolados como *Shewanella putrefaciens* (8,2%) e apenas 1 foi identificado como *V. parahemolyticus* (2%). Apenas um isolado não foi identificado pela técnica (2%). Após o resultado do MALDI-TOF, oito produtos de amplificação do gene *pyrH* representativos de diferentes perfis foram enviados para sequenciamento. Para a análise fenotípica da produção de colagenase, um marcador de virulência de *V. alginolyticus*, foi realizado o teste da hidrólise da gelatina. Todos isolados de *V. alginolyticus* e *S. putrefaciens* foram positivos. Além disso, os genes *collagenase*, *ompK* e *toxR* foram utilizados para avaliar a virulência genotípicamente das espécies estudadas. Dos 49 isolados estudados, os 47 isolados positivos a prova fenotípica amplificaram o gene *collagenase*. A expressão do gene *ompK* pode ser observada em 46,9% (23/49) dos isolados sendo 91,3% (n = 21) de *V. alginolyticus* e 4,3% (n = 1) de *V. parahemolyticus* e *S. putrefaciens*, respectivamente. Sete isolados (14,3%) produziram bandas para amplificação do gene *toxR*, sendo todos caracterizados como *V. alginolyticus*. Os testes fenotípicos realizados demonstraram correlação significativa na identificação de *V. alginolyticus* quando comparados com os resultados genotípicos e de proteômica.

Palavras-chave: *Perna perna*, *Vibrio alginolyticus*, genes de virulência, MALDI TOF MS

ABSTRACT

ALMEIDA, Greiciane França Bronzato de. **Characterization and phenogenotypic profile of *Vibrio alginolyticus* virulence associated with mussels *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) in different parts of the Rio de Janeiro coast.** 43p. Dissertation (Master's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Mytiliculture is the most globally expanded branch of the aquaculture practice. The mussel *Perna perna* has been considered the most economically relevant species. However, microbiological contamination of their tissues can turn them unsuitable for human consumption. *Vibrio alginolyticus* can be noticed among the microorganisms associated to marine animal diseases as an opportunistic pathogen for fish, crustaceans and mussels. The present study aimed to identify *V. alginolyticus* associated with mussels (*Perna perna*) and to assess the pheno-genotypic virulence profile of this microorganism in samples from different locations of the Rio de Janeiro coast. A total of 49 isolates were obtained. After phenotypic analysis, the isolates were subjected techniques for detection of *pyrH* gene by polymerase chain reaction (PCR) and MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry) techniques. All 49 isolates tested positive for *pyrH* gene. Sequencing of the 541pb amplicon is used to differentiate *Vibrio* species. MALDI- TOF MS confirmed 43 isolates as *V. alginolyticus* (87,8%), four were identified as *Shewanella putrefaciens* (8,2%), only one was identified as *V. parahaemolyticus* (2%). Just one isolate was not identified by this technique (2%). After MALDI-TOF analysis, eight amplicons of *pyrH* gene of distinct profiles were sent to sequencing. The phenotypic evaluation of collagenase production, a virulence marker of *V. alginolyticus* was assayed using the gelatin hydrolysis test. All *V. alginolyticus* and *S. putrefaciens* were positive. Additionally, *collagenase*, *ompK* and *toxR* genes were used to genotypically assess the virulence of the *V. alginolyticus* species. Out of the 49 isolates, 47 were positive for the *collagenase* gene. The *ompK* gene expression was observed in 46.9% (23/49) of the isolates as following: 91,3% of *V. alginolyticus* (n = 21) and 4,3% (n = 1) of *V. parahameolyticus* and *S. putrefaciens*, respectively. Seven isolates (14.3%) produced amplicons of the *toxR* gene, all characterized as *V. alginolyticus*. Phenotypic tests showed significant correlation with genotypic and proteomics results, in the identification of *V. alginolyticus*.

Keywords: *Perna perna*, *Vibrio alginolyticus*, gens of virulence, MALDI TOF MS.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

APA – Água Peptonada
cm – centímetro
kDA – unidade de massa atômica
KOH – Hidróxido de potássio
KNO₃ – Nitrato de potássio
MALDI-TOF – Tempo de matriz assistida por dessorção / ionização por laser de vôo
MH – Ágar Müller Hinton
mL – mililitro
MS – Espectrometria de massa
m/s – metro por segundo
NaCl – Cloreto de sódio
VP – Voges Proskawer
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
pb – pares de base
pH – potencial hidrogeniônico
TCBS – Ágar Tissulfato Citrato Sais Biliares Sacarose
β – beta
% - porcentagem
V – volts
μg – microgramas
μl – microlitro
°C – graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1A Localização de Bacia de Campos, Macaé, Estado do Rio de Janeiro.	14
Figura 1B Localização da Baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro.	14
Figura 1C Localização de Arraial do Cabo, Estado do Rio de Janeiro.	14
Figura 2 Crescimento de <i>Vibrio alginolyticus</i> em ágar TCBS. Colônias amarelas: sacarose positiva.	15
Figura 3A Perfil eletroforético do gene <i>collagenase</i> (424 pb) em gel de agarose 1,5%. (M= marcador 100 pb; 1 = isolado positivo; 2 = isolado positivo; B = branco da reação de PCR.	24
Figura 3B Presença do halo transparente ao redor da colônia indicando resultado positivo no teste de hidrolise da gelatina.	24
Figura 4 Perfil eletroforético do gene <i>ompK</i> (319 pb) em gel de agarose 1,5%. (M= marcador 100 pb; 1 = isolado positivo; 2 = isolado positivo; B = branco da reação de PCR.	25
Figura 5 Perfil eletroforético do gene <i>toxR</i> (173 pb) em gel de agarose 1,5%. (M= marcador 100 pb; 1 = isolado positivo; 2 = isolado positivo; B = branco da reação de PCR.	25

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1 Resultado referente a identificação de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	18
Quadro 2 Quadro extraído do programa Bruker Daltonik MALDI apresentando o significado dos valores em relação ao “score” obtido na amostra.	19
Quadro 3 Iniciadores e referencias dos ciclos empregados nos ensaios de amplificação de gene de identificação e dos genes de virulência de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	20

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 Identificação dos 49 isolados obtida pela técnica MALDI-TOF MS através do programa Bruker Daltonic MALDI.	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Mitilicultura no Brasil	3
2.2	Mexilhão <i>Perna perna</i> e sua biologia.	3
2.3	A importância do controle microbiológico dos mexilhões.	5
2.4	Gênero <i>Vibrio</i> .	6
2.4.1	<i>Vibrio alginolyticus</i> .	7
2.4.2	Identificação de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	8
2.4.3	Fatores de virulência	9
2.4.3.1	Colagenase	10
2.4.3.2	Proteína de Membrana Externa (OMPK)	11
2.4.3.3	Gene <i>toxR</i>	12
3	OBJETIVOS	13
3.1	Objetivo Geral	13
3.2	Objetivos Específicos	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1	Amostragem	14
4.1.1	Processamento da amostra	14
4.2	Identificação presuntiva de <i>Vibrio alginolyticus</i>	15
4.3	Identificação bioquímica de <i>Vibrio alginolyticus</i>	16
4.3.1	Prova de fermentação de açúcares	16
4.3.2	Prova de descaboxilação de lisina e ornitina e desidrolização de arginina	16
4.3.3	Avaliação de halofilia	16
4.3.4	Sensibilidade ao vibriostático O/129	16
4.3.5	Prova de ONPG (orto-nitrofenil beta galactosidase)	17
4.3.6	Prova de motilidade e produção de indol	17
4.3.7	Prova de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM)	17
4.3.8	Prova de redução de nitrato	17
4.3.9	Prova de hidrólise da gelatina	17
4.4	Controle e estoque	18
4.5	Identificação de <i>Vibrio alginolyticus</i> através da técnica de MALDI-TOF MS	18
4.6	Caracterização genotípica e avaliação da virulência de <i>Vibrio alginolyticus</i>	19
4.6.1	Extração do DNA bacteriano	19
4.6.2	Ensaio para identificação de <i>Vibrio alginolyticus</i> e detecção de genes de virulência através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e eletroforese em gel de agarose	19
4.7	Sequenciamento do gene <i>pyrH</i> e análise das sequências de DNA	20

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1.	Identificação de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	21
5.2.	Avaliação da virulência de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	23
6	CONCLUSÕES	26
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a maricultura está representada, basicamente pelo cultivo de crustáceos e moluscos. A mitilicultura é uma das atividades mais produtivas da aquicultura, no qual possui aspectos favoráveis para sua expansão mundial, como: os aspectos biológicos, baixo custo das instalações e facilidade de manejo (SALÁN, 2005).

O termo mexilhão é comumente utilizado na denominação de diversas espécies bivalves pertencentes à família Mytilidae. Dentro dessa família existem diversas espécies que são utilizadas na mitilicultura, incluindo o gênero tropical *Perna*, distribuído pelos oceanos Atlântico (costa da América do Sul e África), Índico (África, Ásia e Oceania) além do Mar Mediterrâneo na costa africana (HENRIQUES, 2004). O cultivo desses moluscos bivalves representa um dos maiores recursos da aquicultura mundial. No Brasil, há quatro espécies de mexilhões de interesse comercial, mas apenas *Perna perna* apresenta viabilidade econômica, sendo a mais promissora dentre as demais (FELIX, et al., 2013). Esta espécie tem sido utilizada como bioindicador de poluição ambiental devido a sua característica filtradora e, além disso, a contaminação bacteriana dos tecidos desses animais podem estar relacionadas à qualidade do ambiente e à sanidade animal.

Bactérias da família Vibrionaceae são amplamente encontradas em ambientes aquáticos, sendo estas ubiqüitárias, muito comuns em ambiente marinho e estuários (JONES et al., 2007). Entre os representantes de vibrio halofílico, está *Vibrio alginolyticus*, considerado parte da microbiota marinha normal e isolado em águas costeiras por todo o mundo. Essa bactéria é conhecida como um microrganismo oportunista de animais aquáticos, como peixes e moluscos, sendo também um patógeno bacteriano para humanos, podendo causar infecções pelo contato com água contaminada, como otites média e externa, endoftalmite e até mesmo infecções gastrointestinais devido ao consumo de alimentos de origem marinha *in natura* ou indevidamente cozidos (LI et al., 2009; GOMEZ et al., 2003).

Vibrio alginolyticus é capaz de expressar determinados fatores de virulência de colonização, enzimáticos e tóxicos. A disseminação desse patógeno pode levar a surtos de enfermidades em fazendas de mitilicultura, que acabam colocando em risco a sanidade dos mexilhões (CAI et al., 2007). Assim a detecção dos genes de produção da colagenase, de expressão de proteínas da membrana externa (*ompK*) e o gene *toxR* (gene acessório de regulação de toxinas) são utilizados para compreender a virulência de *V. alginolyticus* isolados de ambientes marinhos (CAI et al., 2009).

Até os anos 90, a taxonomia de *Vibrio* spp. foi baseada principalmente na descrição das características morfológicas e em testes bioquímicos, porém estas técnicas não são precisas para a identificação da maioria das estirpes ambientais, devido à diversidade do metabolismo expresso por estas bactérias (CROCI et al., 2007). Entre as ferramentas propostas para a identificação de *V. alginolyticus*, está a amplificação do gene *pyrH* (uridilato quinase) por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) seguida do sequenciamento. Thompson e colaboradores (2005) descreveram esse gene como um bom marcador taxonômico e mostraram a estabilidade deste *locus*, devido à elevada proporção de mutações sinônimas essenciais para a conservação da sequência de aminoácidos.

Recentemente, a técnica de Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS), uma análise proteômica, tem sido utilizada para identificar e diferenciar agentes patogênicos bacterianos em nível de espécie (DICKINSON et al. 2004; RUPF et al. 2005; MAZZEO et al. 2006; CARBONNELLE et al. 2007; BARBUDDHE et al. 2008; DIECKMANN et al. 2008; ILINA et al. 2009; NAGY et al. 2009). O preparo da amostra e a velocidade de aquisição de dados

combinado com o seu potencial para automatização de alto rendimento fazem o MALDI-TOF MS um método eficaz e valioso (KATRIEN et al. 2011).

Desta forma o presente trabalho buscou caracterizar *V. alginolyticus* associados aos mexilhões (*Perna perna*) através de técnicas fenogenotípicas, bem como avaliar o perfil de virulência deste microrganismo em amostras de diferentes pontos da costa do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mitilicultura no Brasil.

A mitilicultura conhecida como ramo da aquicultura responsável pelo cultivo de ostras e mexilhões surgiu na Europa há cerca de 750 anos e vem apresentando grande valor comercial sendo considerada uma fonte alimentícia e de renda para diversas populações litorâneas em vários países (ARANA, 2004). Quatro espécies de moluscos se destacam dentro do quadro nacional da produção aquícola, o mexilhão (*Perna perna*), a ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), a ostra nativa (*Crassostrea rhizophorae*) e a vieira (*Nodipecten nodosus*). O destaque fica para o cultivo de mexilhões (*Perna perna*), seguido pelas ostras, tendo o estado de Santa Catarina como líder nacional (OSTRENSKY; BORGHETTI & SOTO, 2008).

Esta prática apresenta grande relevância na alimentação mundial, sendo considerada pela Organização das Nações Unidas (ONU) uma atividade estratégica para a segurança alimentar sustentável do planeta no futuro, pois estas são capazes de fornecer proteínas, além de gerar significativo número de empregos (SIMON; SILVA, 2006).

O sistema de cultivo de mexilhões é muito variado, dependendo basicamente das espécies cultivadas e das condições do ambiente. Existem várias formas de se classificar esse sistema, porém no Brasil, o método utilizado é o conhecido como *long-line* tipo suspenso flutuante, em que as cordas são presas a uma linha mestre que flutua na superfície com o auxílio de flutuadores. (FERREIRA & MAGALHÃES, 2004).

2.2 Mexilhão *Perna perna* e sua biologia.

Os mexilhões são moluscos bivalves pertencentes ao filo Mollusca; classe Bivalvia (LINNAEUS, 1758); ordem Mytiloida (FÉRUSAC, 1822); família Mytilidae, de onde advém o nome mitilicultura (RAFINESQUE, 1815).

Dentre as diferentes espécies de mexilhão, o *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) é considerado o maior mitilídeo do mundo, apresentando elevado interesse econômico de cultivo e sendo a espécie mais importante da costa brasileira, por ter um crescimento relativamente rápido, possuir alta taxa de produção, alto valor proteico e ser facilmente coletado (BARAJ et al., 2003). Estes se fixam em qualquer substrato rígido como concreto e estruturas de ferro, formando “colônias” e na natureza, se fixam aos costões rochosos, formando “bancos naturais” que representam um rico ecossistema, pois abrangem, além dos mexilhões, grande número de organismos vegetais e animais, como cracas e pequenos caranguejos e algas. A maior concentração desses mexilhões ocorre nas rochas localizadas na região entremarés, até um metro de profundidade, onde é mais intensa a fixação de indivíduos jovens (FERNANDES et al., 2008).

A espécie *Perna perna* apresenta uma ampla distribuição geográfica que vai da costa Atlântica da América do Sul, da Venezuela até o Uruguai (ARAÚJO, 1994 apud BORDON, 2009) originária do continente africano, de onde há registro de fósseis de 115 mil anos. Provavelmente, os responsáveis pela dispersão da espécie pelo mundo foram os cascos de navios mercantes (FERNANDES et al., 2008). No Brasil, também foram os grandes navios africanos, podendo ter sido através da “água de lastro” (HENRIQUES et al., 2001). Hoje é abundante entre o litoral do Espírito Santo e Rio Grande do Sul (SOUZA, 2003).

Quanto à sua biologia reprodutiva, o *Perna perna* caracteriza-se por ser dióico, não possuir dimorfismo sexual, sendo necessária a abertura das valvas para que se possa diferenciar o sexo. A separação é realizada pela coloração das gônadas, branca leitosa nos machos e vermelha-alaranjada nas fêmeas (ROSA et al., 2000). Na desova, a emissão dos

gametas é estimulada principalmente pelo aumento na concentração de nutrientes no meio, pela variação da salinidade e da temperatura (COCHÔA, 2005).

O mexilhão *Perna perna* é estabelecida como uma espécie exótica, que desempenha um importante papel na reestruturação das comunidades dos costões rochosos na região entremarés (FERNANDES et al., 2008). Além disso é resistente às variações ambientais de temperatura (espécie auritérmica) e salinidade (espécie eurihalina), possuindo também uma grande capacidade de reprodução e adaptação (LEITE, 2007). Segundo Ferreira & Magalhães (2003) o *Perna perna* pode sobreviver a variações de salinidade abaixo de 19% e acima de 49%, sendo a sua faixa ótima de 34 e 36%. E quanto à temperatura, tem a capacidade de suportar variações de 5 a 30°C sendo sua faixa ótima de 21 a 28°C.

Sua alimentação ocorre por filtração de água graças ao movimento ciliar de células das brânquias. Com o processo de seleção de partículas alimentares, principalmente em função do tamanho das partículas, esses animais acabam por ingerir detritos orgânicos e inorgânicos juntamente com a alimentação, baseado principalmente em microalgas (MAGALHÃES & FERREIRA, 2004). A alimentação destes animais é um processo contínuo, só interrompido quando os indivíduos são expostos ao ar ou submetidos a qualquer outra condição ambiental desfavorável, como baixa salinidade ou reduzidos teores de oxigênio dissolvido na água (MARQUES, 1998). Com uma dieta de partículas heterogêneas e relativamente dispersas na coluna d'água, um mexilhão chega a filtrar 5 litros de água por hora para concentrar o alimento em suas brânquias (ANANDRAJ et al., 2002). Os bivalves filtradores podem acumular contaminantes nos seus tecidos em concentrações de 1.000 a 10.000 vezes superior às verificadas na fonte de exposição (UNEP, 2004). Por serem filtradores, estes moluscos revelam-se adequados à utilização como bioindicadores de poluição ambiental devido à natureza sésil e sua ampla distribuição (LIRA et al., 2001; BEIRÃO et al., 2000).

Seu habitat natural é a região do mesolitoral de costões rochosos, podendo estender-se até o infralitoral. Vivem presos pelo bisso a substratos consolidados, tanto em locais com forte arrebentação como em pontos mais abrigados, sendo, porém mais abundantes em costões rochosos expostos à ação das ondas. Como vivem principalmente na região de entre marés, estão adaptados a permanecer por longos períodos expostos ao ar e ao sol (LIRA et al., 2001).

Nos locais de fixação definitiva, no médio-litoral e início do infra-litoral, os mexilhões chegam a formar densas populações nos costões rochosos marinhos, tanto em pontos de forte arrebentação como em locais mais abrigados, podendo ocorrer até a profundidade de 30 metros (FREITAS, 1997). De fato, qualquer substrato consolidado pode servir como ponto de fixação, o que permite a ocorrência de incrustações em dutos, e em cabos subaquáticos utilizados para transmissão de dados para plataformas petrolíferas. A presença do bisso, estrutura de fixação nos mexilhões, permite a estes explorar e dominar as rochas já habitadas. Associados à evolução do aparato do bisso está a redução da região anterior do corpo e alargamento da região posterior que permite um maior agrupamento da espécie. Os músculos retratores de bisso são responsáveis pelo animal ficar fixo ao substrato (LEITE, 2007).

Em trabalhos anteriores, Oliveira et al. (2003), Garcia et al. (2003) e Lekang et al. (2003) notaram que mexilhões jovens apresentaram preferência por se fixarem em substratos filamentosos e rugosos ou substratos lisos previamente colonizados por algas. Assim sendo, "cordas" confeccionadas com redes utilizadas no cultivo de mexilhão, já descartadas, limpas e trançadas, viriam a se constituir em eficientes coletores (SILVA, 2007). Pode-se dizer que o cultivo de mexilhões tem grande importância ambiental por ser uma atividade pouco impactante, uma vez que independe de aração artificial (os mexilhões se alimentam do fitoplâncton e de matéria orgânica particulada) e de troca de água (BORDON, 2009).

2.3. A importância do controle microbiológico dos mexilhões.

A comunidade microbiana marinha pode apresentar uma diversidade complexa, principalmente em águas oceânicas profundas (SOSIN et al., 2006; HUNTER-CEVERA et al., 2005). A relação entre o homem e o mar vem sendo desenvolvida desde o princípio da história. Entretanto, devido ao acesso a novas tecnologias, esta relação está se tornando mais intensa à medida que o ser humano cria condições de determinar seu futuro junto a esse ambiente. Mas para isso, ele depende das ações que realiza no presente. A prática do cultivo de moluscos bivalves é um exemplo disto. Desde que o homem começou a frequentar as praias ele usou bivalves, dentre eles os mexilhões, como alimento (ARAZAKI, 2002).

A microbiota e a contaminação bacteriológica dos tecidos desses animais estão diretamente relacionadas com a qualidade do ambiente em que estes se desenvolveram durante o seu ciclo vital (SARPOTA et al., 2008; PEREIRA, 2008; NAVARRO, 2002). Os moluscos são sensíveis a contaminantes e seu sistema imunológico funciona como agente de alerta a estresses ambientais, alterando o seu estado de bem-estar. Por serem organismos filtradores, refletem as condições do ambiente marinho em que vivem. São considerados bioacumuladores de uma série de substâncias e agentes nocivos como: toxinas produzidas por microalgas, metais pesados, vírus e bactérias. Seu consumo como fonte de alimento pode se tornar um risco a saúde pública uma vez que a qualidade do ambiente em que vivem esteja ameaçada pelo lançamento de esgoto doméstico, pela poluição decorrente de áreas densamente povoadas e pelos despejos provenientes de atividades produtivas, industriais e agrícolas como: o lançamento de poluentes em rios, a descarga de efluentes industriais, o derramamento de óleo, a descarga de água de lastro de embarcações e o desmatamento, que desqualificam áreas já utilizadas ou promissoras à mitilicultura (AKAISHI, 2007; CANESI et al., 2001).

O cultivo de moluscos filtradores em águas brasileiras é incentivado devido à existência de locais apropriados, como por exemplo, as baías (FRANCO et al., 2006). Porém o comprometimento do local de cultivo torna o consumo desses animais responsável por variados surtos epidêmicos e responde diretamente pelos problemas de saúde pública (JOSÉ, 1996 apud MASSUCATTO, 2012). Os efeitos da contaminação bacteriana sobre os moluscos ainda são pouco conhecidos e difundidos, além de serem específicos para cada espécie e região de produção, devendo ser analisados dentro da realidade local de cada ponto de cultivo (LEE; MORGAN, 2003).

Na maioria das vezes o consumo desses moluscos ocorre *in natura* ou insuficientemente cozidos, em condições precárias de higiene, o que aumenta consideravelmente sua importância em saúde pública (WHO, 2011). Quando uma pessoa ingere frutos do mar crus ou mal cozidos, as bactérias advindas desses animais atingem o tubo digestivo e se multiplicam rapidamente, levando a ocorrência de surtos ou casos esporádicos de infecção (FDA, 2008). Por isso monitoramento microbiológico é uma ferramenta necessária para o conhecimento de diversos processos ecológicos no ecossistema marinho e importante para verificar a sanidade de moluscos e crustáceos. No ecossistema marinho, a distribuição de um patógeno viral ou bacteriano é diretamente determinada pela sua virulência, assim como o número de hospedeiros suscetíveis disponíveis. Este balanço entre hospedeiro e patógeno gera e mantém a diversidade de ambos os grupos. Entretanto, em algumas ocasiões, esta relação equilibrada se desfaz, principalmente devido as forças agressoras sobre o meio ambiente ou aos desequilíbrios ambientais, o que resulta na

abundância dos patógenos e no aumento da vulnerabilidade sobre a biodiversidade marinha e sobre a saúde pública (JAY, 2005; HUNTER-CEVERA et al., 2005).

Segundo Feldhusen (2000), existem três grupos de bactérias patogênicas, associadas a doenças causadas devido ao consumo de moluscos bivalves e outros produtos marinhos, divididos conforme a fonte de contaminação. O grupo das bactérias naturalmente presentes no ecossistema aquático (como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*), o grupo das bactérias presentes nesse ambiente como resultado da contaminação por fezes animais (como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Escherichia coli*) e o grupo de bactérias que chegam nestes produtos durante a manipulação e o processamento dos mesmos (como *Staphylococcus aureus*).

O gênero *Vibrio* além de residir habitualmente no ambiente marinho e estuarino, são microrganismos ubíquos e encontrados em alguns nichos dulcícolas, dos quais é carregado através de correntes para o meio salino. Sua presença nestes habitats está associada a diversos fatores intrínsecos, como a capacidade de digestão da quitina e celulose, que permite a colonização de diversos microambientes, como o sedimento; o zooplâncton; os poríferos; os cnidários; os moluscos; os crustáceos; os equinodermos e as plantas aquáticas (GUIMARÃES et al., 2007).

O conhecimento sobre os microrganismos patogênicos circulantes no ambiente aquático, bem como seu modo de contaminação e ação sobre os moluscos pode contribuir para o controle e prevenção de enfermidades que irão refletir na qualidade destes como alimento quando comercializados (FERREIRA, 2009; SUPPLY, 2007; SILVA-SOUZA, 2006; LENOCH, 2004).

2.4. Gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio*, pertencente à família Vibrionaceae, são considerados microrganismos habitantes naturais de ambientes aquáticos presentes em águas salgada, salobra e doce, podendo afetar moluscos bivalves e ou crustáceos, normalmente nas etapas larvais onde são mais sensíveis à vibriose (PRADO et al., 2005; BUTT et al., 2004; GIBOTTI et al., 2000). Atualmente o gênero conta com mais de 94 espécies, com representantes isolados de amostras clínicas e ambientais e pelo menos 12, sendo principalmente *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* patogênicas para o homem e/ou têm sido associadas a doenças transmitidas por alimentos. (DSMZ, 2011; PRADO, 2006)

As espécies que constituem o gênero *Vibrio* pertencem às Gamma-proteobactérias, são bastonetes curvos ou retos Gram-negativos, medem entre 0,5 a 0,8µm de diâmetro e 1,4 a 2,4µm de comprimento, são anaeróbicas facultativas e não esporuladas. A maioria das espécies patogênicas são móveis, possuindo um único flagelo polar, capazes de fermentar glicose sem produção de gás e de produzir as enzimas catalase e oxidase. Todos os vibriões patogênicos produzem oxidase e reduzem nitrato com exceção das espécies *V. metschnikovii* e *V. gazogenes*. Degradam quitina e a maioria possui dois cromossomos. Muitas espécies possuem uma grande variedade de funções no ambiente aquático, demonstrando seu papel na cadeia alimentar aquática por reciclagem de nutrientes, absorvem matéria orgânica dissolvida e fornecem ácidos graxos poliinsaturados para organismos aquáticos incapazes de produzi-los (KONEMAN et al., 2008; OKADA et al., 2005; NICHOLS, 2003). Também são importantes no ciclo de nitrogênio no ambiente marinho fixando o nitrogênio atmosférico, como é o caso de *V. diazotrophicus* que fixa o nitrogênio que serve para a nutrição proteica do ouriço-do-mar. Outros microrganismos da família Vibrionaceae tem sido relacionados às interações

simbióticas microbióhospedador como espécies do gênero como *Aliivibrio* e *A. fischeri logei*, conhecida por estar associada com espécies como lulas *Euprymna scolopes* (STABB, 2006).

São mesófilas, podendo crescer em temperaturas entre 10 e 42°C. A temperatura ótima para o seu crescimento é de 37°C, na qual o tempo de geração é de aproximadamente 10 minutos. Crescem em faixa de pH entre 6 e 11, sendo o pH ótimo igual a 7,6. A atividade de água mínima necessária para o seu desenvolvimento é de 0,94. São halofílicas, necessitando de um mínimo de 0,4% de NaCl para o seu crescimento que ocorre em concentrações de até 8 % deste sal no meio de cultivo (WHO, 2008; EUZEBY, 2005).

O primeiro relato de *Vibrio* ocorreu em 1854, quando o anatomista italiano Filippo Pacini descobriu a primeira espécie do gênero, o *Vibrio cholerae*, o agente causador de uma epidemia mortal de cólera em Florença, porém seu trabalho obteve pouca relevância científica devido à aceitação, na época, da teoria de miasmas como causadores de doenças (BENTIVOGLIO; PACINI, 1995). Trinta anos mais tarde, o naturalista alemão Robert Koch conseguiu isolar e caracterizar o patógeno como agente causador da cólera a partir de surtos durante sua expedição na Índia e no Egito. Koch percebeu que vibriões foram distribuídos numa grande variedade de plantas aquáticas e tinha muitos tipos que são não patogênicos em seres humanos (THOMPSON & SWINGS, 2006).

As bactérias do gênero *Vibrio* representam um importante componente do bacterioplâncton marinho e ocorrem em formas de vida livre ou anexadas no plâncton. Por isso são isoladas com frequência a partir do ecossistema aquático em diversas regiões de clima tropical e temperado em todo o mundo. Algumas espécies de *Vibrio* são particularmente sujeitos a atenção da pesquisa, uma vez que são patogênicos para os seres humanos (SU & LIU 2007; THOMPSON et al., 2004; YENG & BOOR, 2004). Fatores de virulência, como elastases, collagenases, DNases, chondroitinases, gelatinases, lechitinases e queratinases têm a capacidade de degradar o tecido conjuntivo e membrana basal epitelial e favorecer a disseminação do patógeno (LAFISCA, 2008).

Vibrio spp. é um excelente modelo para a taxonomia genômica, porque eles são ubiqüitários no ambiente marinho, estando associado a uma grande diversidade de vida marinha e experimentando uma variedade de condições ambientais e forças de seleção. Consequentemente, a diferenciação de espécies irmãs torna-se muito difícil. Por exemplo, *V. cholerae* e *V. mimicus* que possuem fenótipos semelhantes, sendo apenas a fermentação de sacarose e atividade de lipase capaz de discriminar as duas espécies. Portanto a identificação de cada espécie de vibrio ocorre por um grande conjunto de testes fenotípicos, não havendo uma definição operacional dentro do gênero *Vibrio* (THOMPSON, 2005; FARMER, 2005).

2.4.1 *Vibrio alginolyticus*

Vibrio alginolyticus é uma bactéria Gram negativa halofílica, ubiqüitária, que faz parte da microbiota saprófita de diferentes organismos marinhos possuindo ampla distribuição geográfica em ambientes costeiros e estuarinos, especialmente em zonas balneárias. É considerado um agente patogênico oportunista que tem sido comumente associado à vibriose em uma variedade de peixes e moluscos marinhos, bem como em seres humanos. Sua presença foi relatada em surtos epizooticos em cultivos no Mediterrâneo, causando mortalidade do pescado, danos em moluscos e crustáceos, e importantes perdas econômicas (SGANGA et al., 2009; CAVALLO et al., 2002).

Com o aquecimento global, a temperatura dos oceanos tem se elevado, com isso a incidência de infecções fora de época causadas por *V. alginolyticus* está aumentando e atraindo mais atenção. Durante períodos de clima quente esta espécie pode alcançar concentrações no mexilhão suficiente para causar doença em humanos (SGANGA et al.,

2009). Este microrganismo foi originalmente classificado como biótipo 2 de *V. parahaemolyticus*, porém não está associado a casos de gastroenterite, sendo isolado a partir de infecções extra-intestinais como otites e conjuntivites em pacientes expostos ao ambiente marinho contaminado (CHIEN et al., 2002; JAKSIÉ et al., 2002).

Em aquicultura, existem relatos de infecções por esta espécie em países como os Estados Unidos, Espanha, México, Japão e China. Tais relatos indicam que as condições ambientais tais como a limitação de ferro, as concentrações de salinidade e alteração de temperatura, entre o ambiente natural e o de acolhimento têm uma ação importante na virulência e crescimento dessa bactéria. A via de infecção e transmissão desta espécie continua sendo investigada, porém uma forma de transmissão pode se dar através de água do mar, seja como bacterioplâncton ou na superfície de partículas (YODER et al., 2008; WANG, 2008; KAHLA-NAKBI, 2007; KAHLA-NAKBI et al., 2006; WANG, 2005; LIU et al., 2004; SELVIN J, LIPTON, 2003).

Em 1998, Srinivasan and Kjelleberg já haviam constatado que, em condições limitadas de nutrientes, tanto em ambientes naturais quanto em laboratorial, o jejum poderia acarretar alterações drásticas nas expressões: genética, fisiológica e morfológica. A regulação gênica dessas bactérias envolve múltiplas interações complexas que lhe permite adaptar-se em resposta a estresses ambientais (METHÉ et al., 2005; CHIN et al., 2004). *V. alginolyticus* pode ser um importante reservatório de muitos genes de virulência conhecidos de outras espécies de *Vibrio* no ambiente aquático, sendo este um local que abriga diferentes genes associados à virulência espalhados entre *Vibrios* ambientais (XIE et al., 2005).

2.4.2 Identificação de *V. alginolyticus*.

Com base no sucesso do uso de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) na caracterização de espécies de vibrios, dados sugerem que sequências do gene *pyrH* têm maior poder de resolução taxonômica. Espécies de *Vibrio* spp, entre elas *V. alginolyticus*, foram identificadas usando o marcador *pyrH* (uridilato quinase). Segundo Thompson et al. (2005), o gene *pyrH* atua como um bom marcador discriminante em nível da espécie. Zeigler (2003) propôs que um único gene pode ser utilizado como marcador de diferenciação desde que atenda aos critérios discriminatórios estabelecidos para seleção de genes marcadores. Entre estes, a conservação da sequência de aminoácidos, ampla distribuição entre os genomas das bactérias, uma única cópia dentro de um determinado genoma, e apresentando tamanho das sequências entre 900 a 2250 nucleotídeos, de modo a ser longa o suficiente para conter informações definidas, mas curta o suficiente para permitir o sequenciamento de uma forma conveniente.

Assim, o gene *pyrH* constitui um bom preditor de todo o genoma do *Vibrio* e também é um bom alvo discriminatório em nível de espécie. Estes dados também foram validados por outros autores durante a identificação de cepas ambientais, demonstrando que este gene é uma ferramenta importante no estudo de vastas coleções de isolados ambientais. Sequências do gene *pyrH* foram também capazes de discriminar espécies-irmãs, como por exemplo *V. harveyi* e *V. campbellii* (GREGORACCI et al., 2012; ALVES et al., 2010; CHIMETTO et al., 2009).

As tecnologias proteômicas também têm sido amplamente utilizadas para a investigação da expressão gênica e da fisiologia microbianas. Mesmo com o rápido avanço no sequenciamento de genomas bacterianos completos (VAN SCHAIK & WILLEMS, 2010; FOURNIER; DRANCOURT; RAOULT, 2007;) a análise do proteoma bacteriano permanece de grande importância por fornecer informações não disponíveis a partir de estudos genômicos isoladamente (CASH, 2011).

As análises de RNA (transcriptoma), também bastante difundidas, não são capazes de refletir diretamente o conteúdo proteico de uma célula (GRAVES e HAYSTEAD, 2002). A espectrometria de massas é uma técnica para análise de formas ionizadas de moléculas em uma fase gasosa. As medições de massa são obtidas determinando-se quão prontamente um íon é acelerado em um campo elétrico (PENQUE, 2009; STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2007). Como as proteínas e peptídeos não são voláteis, a geração de uma concentração suficientemente alta de moléculas de proteína ionizadas, porém intactas, na fase de gás é um grande desafio.

Lasch e seus colaboradores (2009) descreveram uma técnica proteômica que usa células intactas (MS) para detecção reprodutível de padrões de proteína microbiana para complementar métodos de ensaio fenotípicos ou genotípicos. Vários relatos demonstraram a viabilidade da Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF) como uma análise proteômica para identificar e diferenciar estes agentes patogênicos bacterianos em nível de espécie. (ILINA et al., 2009; NAGY et al., 2009; BARBUDDHE et al., 2008; DIECKMANN et al., 2008; CARBONNELLE et al., 2007; MAZZEO et al., 2006; RUPF et al., 2005; DICKINSON et al., 2004). Esta técnica é muito rápida e exige apenas um mínimo quantidades de material biológico. O potencial de alto rendimento para a análise de rotina e automatização do procedimento permite o teste dos isolados a partir de fontes clínicas e ambientais em larga escala (DIECKMAN et al., 2010). Este método pode ser complementar à aquisição de dados obtidos a partir de sequenciamento do gene como 16S rRNA, com a vantagem de gerar impressões digitais bioquímicas únicas para a sub- tipagem de espécies. (EMAMI et al., 2012). No MALDI TOF, a proteína ou peptídeo em estudo é co-precipitado com um composto orgânico (matriz) que absorve a luz do laser em um determinado comprimento de onda. O pulso de um laser sobre a preparação expõe moléculas da superfície. Essas moléculas capturam elétrons assim que saem da matriz e, portanto partem como íons carregados negativamente (CAÑAS et al., 2006; AEBERSOLD; MANN, 2003).

2.4.3 Fatores de virulência associados à *Vibrio alginolyticus*.

Espécies de *Vibrio* marinhos são conhecidas por produzir diversos produtos extracelulares que contribuem para invasão e/ou lesão no hospedeiro que são denominados fatores de virulência, os quais são capazes de determinar o grau de patogenicidade que um microrganismo possui em relação ao seu hospedeiro (HASEGAWA et al., 2009).

Dentre os principais fatores de virulência estão os fatores tóxicos (exotoxinas, enterotoxinas e endotoxinas); os enzimáticos (lisinas, proteases, lipases, hemolisinas, coagulase, colagenase, lecitinase, DNase, controidinase, elastase, amilase e uréase) e os de colonização (fímbrias, biofilmes, capsulas, adesinas, antígenos de aderência, cisteína sérica e sideróforos) (MADIGAN et al., 2004; AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2004). Secades e Guijarro (1999) relataram que as condições ambientais de stress podem desempenhar um importante papel na indução ou repressão da enzima por compostos específicos.

Patógenos como *V. alginolyticus* estão comumente associadas a casos de infecção tanto em humanos quanto em organismos cultiváveis e por isso tem se tornado motivo de preocupação e alvo de inúmeras pesquisas devido a sua alta capacidade de infectar seu hospedeiro (AUSTIN; AUSTIN, 2007; BAFFONE et al., 2005).

Esse microrganismo presente na água é capaz de se concentrar em grande quantidade nos moluscos bivalves devido a sua característica filtradora e assim infectar o homem uma vez que estes são utilizados como fonte de alimento. Infecções causadas por *Vibrio alginolyticus* podem se apresentar como septicêmica relacionada à ingestão de água do mar

contaminada ou produtos do mar, especialmente em pacientes como idosos, crianças, portadores de diabetes mellitus ou pacientes com patologias hepáticas crônicas. Já as infecções cutâneas podem ser causadas quando as feridas entram em contato com a água contaminada onde a bactéria é autóctone. Acomete especialmente em manipuladores de alimentos, profissionais do ramo da pesca e mergulhadores, porém muitas vezes os pacientes com dermatite pode desenvolver septicemia da lesão primária (infecções de feridas) (GONZÁLEZ-ESCALONA et al., 2006; THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004).

Do ponto de vista da sanidade dos bivalves marinhos, diversos autores relatam surtos de enfermidades ocorridos como consequência da disseminação desse patógeno. A vibriose destaca-se por ser uma das doenças infecciosas mais graves capaz de afetar os animais de sistema de maricultura em zonas tropicais e subtropicais do mundo (PONPRATEEP et al., 2009; ZHANG et al., 2007; BONDAD-REANTASO et al., 2005). Surtos de doenças atribuídas ao *Vibrio alginolyticus* tem sido relatados em alguns animais de produção em fazendas de maricultura (CAI et al., 2007; DE-LA-RE-VEGA et al., 2006). Um dos principais problemas da cultura de moluscos bivalves são os episódios de mortalidade devido à infecção bacteriana reduzir a produção e causar perdas econômicas elevadas. (GARNIER et al., 2007;2008; LABREUCHE et al., 2006a, b; GÓMEZ-LEÓN et al., 2005; PRADO et al., 2005; PAILLARD et al., 2004; ANGUIANO-BELTRÁN et al., 2004; ESTES et al., 2004; GAY et al., 2004a, b)

A vibriose também tem gerado efeitos patológicos nos peneídeos, registrando-se, lesões nos tecidos com ou sem necrose, retardo no crescimento e comprometimento das metamorfoses larvais, acompanhados por índices ou taxas de mortalidade variáveis. Em peixes esta doença apresenta sintomas como a letargia, a lentidão do crescimento, e necrose dos tecidos do apêndice, opacidade muscular, septicemia com presença de hemorragia na base das barbatanas, exoftalmia e opacidade da córnea (DEFOIRDT et al., 2007; TORANZO et al., 2005).

A literatura aponta para a detecção dos genes de produção da collagenase, de expressão de proteínas da membrana externa (*ompK*) e o gene *toxR* (gene acessório de regulação de toxinas) na busca pela compreensão da virulência de *Vibrio alginolyticus* isolados de ambientes marinhos (CAI et al., 2009).

2.4.3.1 Collagenase

O estudo das collagenases começou com o reconhecimento da participação de enzimas proteolíticas de clostrídios na putrefação de tecidos (MACLENNAN et al., 1953). A partir desta data muitas outras collagenases bacterianas e de origem animal ou vegetal, foram identificadas e caracterizadas (MACLENNAN et al., 1953; DUARTE, 2001). Determinadas bactérias produzem collagenases, que são proteases que clivam colágeno na sua conformação em tripla hélice e possuem uma ampla especificidade de substratos. As proteases collagenolíticas são enzimas microbianas capazes de hidrolisar diretamente as moléculas de colágeno, levando a degradação do colágeno nativo ou desnaturado (MATSUSHITA et al., 1994).

As collagenases microbianas têm sido encontradas numa grande variedade de estirpes bacterianas mesofílicas. E algumas delas já foram descritas com um papel importante na virulência de microrganismos e no processo de infecção de tecido hospedeiro (TSURUOKA, 2003). A collagenase extracelular produzida por *Vibrio alginolyticus* vem sendo altamente eficiente no debridamento de queimaduras e produção de escaras por decúbito, além de ser importante na degradação do tecido conjuntivo e da membrana basal epitelial tornando-se a chave para a patologia extraintestinal (TEKAMURA et al., 2011). Esta enzima é sintetizada

quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento e é induzido quer por peptona ou por colágeno sendo seu fragmento de elevado peso molecular (REID et al., 1980; REID et al., 1978).

As collagenases bacterianas foram purificadas a partir de várias espécies, e os seus genes foram clonados e sequenciados embora muitas collagenases ainda não tenham sido caracterizadas tanto enzimaticamente quanto estruturalmente (TEKAMURA et al., 2011). Poucos estudos sobre as collagenases microbianas têm sido relatados, o que tem dificultado o manuseamento e a regulamentação de experiências com DNA recombinante de microrganismos patogênicos. (CAVALEIRO, 2008).

O gene *collagenase* de *V. alginolyticus* tem sido comumente utilizado para rápida detecção desta espécie por ensaio de PCR o que tem lançado uma nova luz na compreensão da relação entre a sua virulência e na sua atuação como um marcador molecular, que também são úteis para o julgamento do agente patogênico *V. alginolyticus* (CAI et al., 2009; 2007).

2.4.3.2 Proteínas de membrana externa (OMPK)

A membrana externa de bactérias patogênicas Gram-negativos desempenha um papel importante na infecção e patogenicidade para o hospedeiro, atuando na interação entre as bactérias e seu hospedeiro no processo de aderência, absorção de nutrientes do hospedeiro, e subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro (SELTMAN, 2002; TSOLIS, 2002). É constituída basicamente por proteínas, lipídios e açúcar, a qual poderia ser facilmente reconhecida como substâncias estranhas pelo sistema de defesa imunológica dos hospedeiros. Entre estes componentes estão às proteínas da membrana externa (OMP) que constituem em média 50% da massa da membrana externa e apresentam estruturas β -pregueadas (PIZZA et al., 2000).

Estas proteínas desempenham um papel crucial durante muitos processos celulares e fisiológicos tendo sua produção regulada por fatores ambientais, aumentando a sua adaptação às mudanças de ambientes externos devido a sua localização na zona mais externa da célula, quando as bactérias são transferidas para um novo ambiente, a síntese das Omp se alteram (QIAN et al., 2008; KUSTOS et al., 2007; XU et al., 2005).

As OMPs de espécies de *Vibrio* são componentes altamente imunogênicos em função de seus epítomos expostos na superfície da célula. Já foi demonstrado que algumas OMP de espécies de *Vibrio*, como OmpW relatada em *Vibrio cholerae*, OmpV em *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*, OmpK em *Vibrio alginolyticus* e OmpU, podem induzir uma imunidade protetora (HONG et al., 2006; NANDI et al., 2005; XU et al. 2004). Além disso, Xu e seu colaboradores (2005) tem demonstrado que o perfil de OMPs de *V. alginolyticus* se alteram sob as diferentes concentrações de sódio.

OmpK é reconhecido como o receptor de KVP40, um vibriofago com peso molecular de 26 kDa que exhibe sua especificidade em uma ampla gama de hospedeiros. Autores relataram que a sequência de aminoácidos desta proteína encontra-se mais próxima da OMP (Tsx) formadora de canal nucleosídeo específico de bactérias entéricas, o que sugeriu o seu papel importante para o microrganismo. (INOUE et al., 1995b).

OmpK e os seus homólogos estão amplamente distribuídos entre oito espécies de *Vibrio*, entre estas, o *V. alginolyticus*, e tem sido avaliada para o desenvolvimento de uma vacina promissora identificada como um antígeno imunogênico de algumas espécies de *Vibrio* (QIAN et al., 2008).

2.4.3.3 Gene *toxR*

O *toxR* é um gene conservado entre as espécies de *Vibrio* sendo uma ferramenta útil para a distinção das várias espécies (OSORIO & KLOSE, 2000). Foi identificado pela primeira vez a partir de uma biblioteca genômica de *Vibrio cholerae*. Esta bactéria expressa fatores de virulência que lhe permite colonizar o intestino humano e provocar a doença da cólera. Desta forma, a proteína transmembrana ativadora transcricional ToxR do *Vibrio cholerae* se faz necessária para coordenar a expressão de fatores de virulência, incluindo a toxina colérica (MILLER et al., 1987, TAYLOR 1987).

ToxR foi o primeiro exemplo de uma proteína ativadora da transcrição, que também continha um segmento transmembranar e domínio periplasmático além do domínio de ligação de DNA citoplásmico. Alguns autores acreditam que o domínio periplasmático de ToxR é permitido para detectar diretamente o ambiente extracelular e ativar a transcrição de genes de virulência apenas sob condições de indução. ToxR requer outro ativador transcricional transmembranar, TcpP, a fim de ativar a transcrição de ToxT sinergicamente, que codifica ainda um terceiro ativador transcricional que é inteiramente localizado no citoplasma (HASE, & MEKALANOS, 1998). ToxT é o ativador de transcrição direta de vários genes de virulência como o gene *ctx* que codifica a toxina da cólera (WITHEY & DiRITA, 2006; YU & DiRITA, 2002). O ToxR também é capaz de regular outros promotores como o OmpU, controlando a expressão da porina da membrana externa OmpU, onde este ativa diretamente *ompU* e reprime a expressão da porina alternativa conhecida como OmpT (LI et al., 2000). A regulação adequada da síntese de proteínas da membrana externa é crítica quanto a expressão de OmpT, pois conduz a uma maior sensibilidade para a bÍlis e outros detergentes disponíveis (PROVENZANO & KLOSE, 2000).

Em *Vibrio alginolyticus* a ToxR aumenta a resistÍncia à bÍlis e atua na formação de biofilme provavelmente via modulação das expressões da OMP, o que deve ajudar a sobrevivÍncia das bactÍrias e sua colonização no intestino de animais como o peixes (CHANG et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar *Vibrio alginolyticus* através de técnicas fenogenotípica e de proteômica, bem como avaliar o perfil fenogenotípico de virulência deste microrganismo isolados de mexilhões (*Perna perna*) em diferentes pontos da costa do Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar fenotipicamente *Vibrio alginolyticus* isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*);
- Detectar o gene *pyrH* através de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciar o produto para diferenciação de *Vibrio alginolyticus* das demais espécies;
- Utilizar a técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF MS para confirmação dos protocolos de identificação fenogenotípicos de *V. alginolyticus*.
- Detectar por PCR os genes *collagenase*, *ompK* e *toxR* associados à virulência de *Vibrio alginolyticus* isolados dos mexilhões *Perna perna*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

As coletas foram realizadas por Oliva (2012) através de mergulho autônomo, os mexilhões *Perna perna*, foram coletados em profundidades variando de 3 a 4 metros diretamente do costão rochoso. O primeiro ponto de coleta foi estabelecido no Arquipélago de Santana (Figura 1A), em costões rochosos e próximos a cabos subaquáticos, localizado na Bacia de Campos, Macaé, Estado do Rio de Janeiro a uma distância de aproximadamente 10 km da costa. As coletas foram realizadas no período de junho de 2007 a maio de 2008. Outros pontos de coleta foram Angra dos Reis, na Baía de Ilha Grande, (Figura 1B) e Arraial do Cabo (Figura 1C). As coletas foram realizadas em fazendas de maricultura onde o sistema de *longline* é utilizado para o cultivo de mexilhões. As coletas de mexilhões em Angra dos Reis foram realizadas em outubro de 2010 e fevereiro de 2011 e as coletas em Arraial do Cabo foram realizadas em maio e julho de 2011.



Figura 1: A - Localização de Bacia de Campos, Macaé, Estado do Rio de Janeiro. B - Localização da Baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro. C - Localização de Arraial do Cabo, Estado do Rio de Janeiro. (<https://maps.google.com.br>)

Foram obtidos 2 lotes de 25 indivíduos adultos, possuindo as valvas fechadas e de tamanho utilizado para comercialização (maiores que 6 cm). Em seguida, estes organismos foram acondicionados em sacos de polietileno dentro de caixa de isopor contendo gelo e transportados imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para realização da análise bacteriológica. O transporte dos mexilhões sob resfriamento reduziu o índice de morte dos animais e inibiu o crescimento da microbiota. O preparo dos mexilhões como, a retirada das sujidades, aberturas das conchas, trituração da massa corpórea, retirada do líquido intravalvar e inoculação foram realizadas por Oliva (2012), segundo protocolo descrito por FDA, 1995.

4.1.1 Processamento das amostras.

Os lotes foram separados, adotando-se o mesmo procedimento para cada uma. Os mexilhões foram lavados individualmente com auxílio de escova, sob água corrente potável, para a retirada de sujidades. Durante este processo, foram descartados os animais que apresentavam valvas abertas. Em capela de fluxo laminar, próximo ao bico de Bunsen, os mexilhões foram abertos assepticamente com bisturi estéril. A massa corpórea e o líquido intravalvar foram recolhidos em becher, onde foi realizada, com auxílio de pinça e bisturi

esterilizados, a trituração das partes sólidas a fim de promover homogeneização do material. Para a pesquisa de *Vibrio* spp. foram pesados 25g da amostra e adicionados a 225 mL de água peptonada alcalina (APA) com 1% de NaCl. A partir desta diluição (10^{-1}), de cada amostra, foi tomada uma alíquota de 1mL e acrescentada em tubo contendo 9 mL de APA com 1% de NaCl (diluição 10^{-2}), e a outro com 9 mL de APA com 3% de NaCl (diluição 10^{-2}), sendo usados como meios de enriquecimento. Em seguida, estes foram incubados à 37°C por 12 a 24 horas (FDA, 1995).

4.2 Identificação presuntiva de *Vibrio alginolyticus*.

Em trabalho realizado por Oliva. (2012), o isolamento e identificação presuntiva de *Vibrio* spp. seguiram a metodologia proposta por KONEMAN et al., (2008). As amostras que apresentaram crescimento em APA com 1% e 3% de NaCl foram isoladas em Agar Tiosulfato Citrato Sais Biliares Sacarose (TCBS-Oxoid) acrescidas de 1%, 2% e 3% de NaCl, em duplicata, e em seguida incubadas à 37°C por 24 horas. Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram e a prova do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo (KONEMAN et al., 2008).

Foram transferidas até 10 colônias isoladas de cada placa de TCBS para tubos contendo Agar Nutriente (Micromed) para estoque, LIA (Ágar Lisina Ferro-Micromed) e Agar Kligler (Micromed), todos acrescidos de 1% de NaCl e submetidos a incubação à 37°C por 24 horas para diferenciação presuntiva entre muitos *Vibrio* spp., e enterobactérias. Posteriormente a diferenciação entre estes micro-organismos foi realizada através da enzima citocromo oxidase, distinguindo *Vibrio* spp. dos membros de Enterobacteriaceae. A prova da oxidase foi realizada a partir do crescimento dos isolados em ágar nutriente inclinado contendo 1% de NaCl. Foi retirada uma alíquota com emprego da alça de platina e foram feitos esfregaços em fitas PROBAC impregnadas com cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina. O teste foi considerado positivo quando do aparecimento de uma coloração azul arroxeadado em 10 segundos. Essa prova é considerada positiva para os todos os membros da família Vibrionaceae (FDA, 1995; OLIVER; KAPER, 1997). Os isolados que apresentaram colônias amarelas (sacarose positiva) em TCBS-Oxoid acrescido de 1%, 2% e 3% de NaCl, foram suspeitos de *Vibrio alginolyticus*, a partir daí prosseguiram os testes bioquímicos para confirmação da espécie a partir de colônias em ágar nutriente.

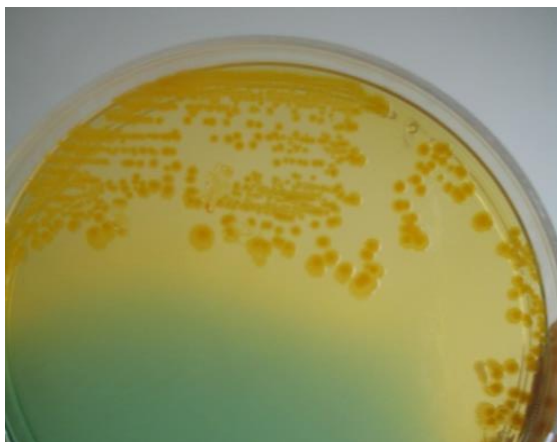


Figura 2: Crescimento de *Vibrio alginolyticus* em ágar TCBS. Colônias amarelas: sacarose positiva.

4.3 Identificação bioquímica de *Vibrio alginolyticus*.

4.3.1 Prova de fermentação de açúcares

Os açúcares avaliados foram: glicose, manitol, lactose, sacarose, arabinose e manose (Micromed). A fermentação avaliada utilizando-se APA (Água Peptonada) acrescida de 1% de NaCl, 1% do açúcar em questão e 1% do Indicador de Andrade. A produção de ácido, indicado pela diminuição do pH, foi avaliada através da coloração rosa após 24 horas de incubação na temperatura de 37°C. Nos tubos de ensaio contendo a solução de glicose foram inseridos tubos de Durham para a observação da produção de gás (KONEMAN et al., 2008) (Quadro 1).

4.3.2 Prova de descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolização de arginina

Foi utilizada uma base contendo peptona, extrato de levedura, dextrose e púrpura de bromocresol, acrescida de 1% de NaCl, com a qual foram preparadas as soluções de lisina, arginina e ornitina (Micromed). As soluções foram distribuídas em tubos aos quais foi adicionada uma fina camada de óleo mineral à superfície do líquido, a fim de promover ambiente microaerófilo. Como controle, utilizou-se a solução base pura também acrescida de óleo mineral (KONEMAN et al., 2008).

Após a inoculação dos isolados e incubação à 37°C por até 7 dias, a leitura destas provas foi interpretada como negativa quando a coloração do meio apresentava-se amarela (fermentação da glicose indicando acidez). Na reação positiva, a fermentação do meio para ativação das enzimas de descarboxilação apresentava-se com coloração violeta, indicando basicidade do meio em função da descarboxilação ou dehidrolização do aminoácido. A base usada como controle sempre apresentou resultado negativo (KONEMAN et al., 2008) (Quadro 1).

4.3.3 Avaliação da halofilia

Os isolados foram inoculados com o auxílio de uma agulha, em tubos com água peptonada alcalina com diferentes concentrações de NaCl (0%, 3%, 6%, 8% e 10%) e incubados a 37°C por 24 horas. A turvação observada no tubo indicou o crescimento bacteriano, caracterizando o grau de halofilia do isolado testado (FDA, 1995) (Quadro 1).

4.3.4 Sensibilidade ao vibriostático O/129

Os isolados foram inoculados em APA com 1% NaCl, incubados durante 18 horas a 37°C e diluídas na concentração do tubo 0,5 da escala de McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL. 0,5mL de suspensão bacteriana foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido ágar Müeller Hinton (MH - Micromed) com 1% de NaCl. Em cada placa semeada, foi depositado um disco de 6 mm de diâmetro impregnado com O/129 na dosagem de 10µg e outro na dosagem de 150µg, distantes entre si aproximadamente 4 cm, sendo todas as placas incubadas a 37°C por 12 a 24 horas. A leitura foi realizada através da observação do halo de sensibilidade ou crescimento bacteriano ao redor do disco de O/129, considerando o isolado como sensível ou resistente, respectivamente (JANDA et al., 1998) (Quadro 1).

4.3.5 Prova de ONPG (orto-nitrofenil beta galactosidase)

Este teste é utilizado para detecção da enzima galactosidase, utilizando-se discos de diferenciação de ONPG (Bacto®), recomendados para a detecção da presença desta enzima, objetivando a identificação de microrganismos fermentadores tardios de lactose. A partir do crescimento em Ágar Kligler contendo 1% de NaCl, foi retirada uma alçada de cada cultura e suspensa em 0,2 mL de solução salina (0,85% de NaCl) em tubo de ensaio. Cada tubo recebeu um disco de ONPG e após incubação à 37°C por 24 horas realizou-se a leitura. A reação positiva foi caracterizada pela coloração amarela na solução salina, oriunda da hidrólise do ONPG, pela liberação de ortonitrofenol (KONEMAN et al., 2008) (Quadro 1).

4.3.6 Provas de motilidade e produção de indol

Para as provas de motilidade e produção do indol, utilizou-se Agar sulfeto indol motilidade (SIM - Vetec) acrescido de 1% de NaCl. Após inoculação em picada com auxílio de alça moldada em agulha, incubou-se a 35° por 24 a 48 horas. A interpretação do teste de motilidade foi realizada através da observação do tubo contra a luz sendo possível visualizar o tipo de crescimento da colônia, sendo considerado motilidade negativo o micro-organismo crescido apenas na linha inoculada e positivo o que ultrapassou a mesma. A leitura da produção de indol, resultada da degradação metabólica do aminoácido triptofano, foi realizada adicionando-se gotas de reativo de Kovacs (para-dimetilaminobenzaldeído em álcool) no tubo. A mudança de coloração do reativo de amarela para vermelha indica a presença de indol, sendo a prova considerada positiva (KONEMAN et al., 2008) (Quadro 1).

4.3.7 Prova de Voges-Proskauer (VP)

O caldo MR-VP acrescido de 1% de NaCl apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato e é utilizado para a leitura da reação de VM-VP. A utilização da glicose, apresentando a produção de acetilmetilcarbinol, é indicada pela coloração rosa na prova do VP após a adição de 0,2 mL de α -naftol a 5% e 0,6 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 a 48 horas a 35°C. (KONEMAN et al., 2008) (Quadro 1).

4.3.8 Prova de redução de nitrato

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO_3). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada adicionando-se em uma lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 35°C e, uma gota de ácido sulfanílico e outra de ácido-naftilamina, reativos A e B de Griess Ilosway. A coloração rósea avermelhada indica presença de nitrito no caldo e, conseqüentemente prova de redução positiva (KONEMAN et al., 2008) (Quadro 1).

4.3.9 Prova de hidrólise de gelatina

A capacidade de hidrolisar gelatina através da enzima gelatinase, foi testada inoculando uma porção da colônia em meio contendo gelatina e incubando em estufa bacteriológica a 35°C por 24 a 48h. Após a incubação as placas foram levadas à geladeira por 15 minutos para realização da leitura, a formação de um halo transparente em volta da colônia, considerou o isolado positivo. (RHODEHAMEL, 2001) (Quadro 1).

Quadro 1. Resultado referente a identificação de *Vibrio alginolyticus*.

Identificação bioquímica de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	
Glicose (Gás)	-
Manitol	+
Lactose	-
Sacarose	+
Arabinose	-
Manose	+
Lisina	+
Ornitina	V
Arginina	-
0% NaCl	-
3% NaCl	+
6% NaCl	+
8% NaCl	+
10% NaCl	+
O/129 10µg	R
O/129 150 µg	S
ONPG	-
Indol	+
VP	+
KNO ₃	+
Gelatina	+

4.4 Controle e estoque das cepas de *Vibrio alginolyticus*

Para comparação e controle de todos os testes avaliados foram utilizadas as cepas padrão de *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749 gentilmente cedida pela Doutora Dália dos Prazeres Rodrigues, do Laboratório de Enterobactérias/ FIOCRUZ. Após os testes as cepas consideradas *Vibrio alginolyticus* foram estocadas em Ágar estoque contendo Fosfato Básico de Sódio 0,4g, NaCl 2% e Ágar Nutriente 4,6g em 200ml e mantidas a temperatura ambiente.

4.5. Identificação de *Vibrio alginolyticus* através da técnica de MALDI-TOF MS.

Para o preparo das amostras, as cepas foram cultivadas em Agar BHI a 1% de NaCl a 37 °C por 24h. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA). Ao sedimento bacteriano foi adicionado uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich) em quantidade suficiente para cobrir o sedimento bacteriano. Em seguida, 1µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s, e posteriormente analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero à três, sendo que quanto cada vez maior o valor, mais confiável será a identificação. Neste trabalho, considerou-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores iguais ou superiores a dois (Quadro 2).

Quadro 2: Quadro extraído do programa Bruker Daltonik MALDI apresentando o significado dos valores em relação ao “score” obtido na amostra.

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	Highly probable species identification ¹	(+++)	green
2.000 ... 2.299	Secure genus identification, probable species identification ²	(++)	green
1.700 ... 1.999	Probable genus identification ³	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	Not reliable identification ⁴	(-)	red

Legenda: 1. Identificação altamente provável das espécies; 2. Identificação Segura do gênero, identificação provável de espécies; 3. Identificação provável do gênero; 4. Identificação não confiável.

4.6 Caracterização genotípica e avaliação da virulência de *Vibrio alginolyticus*.

4.6.1 Extração de DNA bacteriano

A extração de DNA foi realizada segundo metodologia descrita por HARJU et al. (2004).

Os isolados de *Vibrio alginolyticus* foram inoculados em 1,5 mL de caldo Müeller Hinton contendo 1% NaCl e incubados por 18 a 24 h a 35 °C. Posteriormente, 1,0 mL da cultura foi transferido para microtubos de 1,5mL, centrifugado a 12396g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuscitado em 500 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0), centrifugado a 12396g por 2 min e novamente o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido por 3 vezes e o sedimento foi ressuscitado em 1 mL de TE e incubado em banho-maria a 100 °C por 10 min. Em seguida, os microtubos foram incubados a - 20 °C por 30 min e depois centrifugados a 12396g por 10min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20° C.

O DNA total extraído, foi quantificado aplicando-se as amostras juntamente com 1 µL de SYBR Green (Invitrogen®) diluído, em gel de agarose 0,8 % e submetendo-o à eletroforese. Após a corrida, o gel foi visualizado e documentado através do fotodocumentador de géis (L-PIX EX). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade de banda do marcador Lambda (λ) (Promega®), nas concentrações de 25 e 50 ng e a qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

4.6.2 Ensaios para Identificação de *Vibrio alginolyticus* através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e detecção de genes de virulência.

As concentrações utilizadas foram Tampão 10X (10 mM Tris_HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de CIMg₂, 5pmol de cada *primer* (Kapa®) 0,2 mM de dNTP (ThermoScience®) e 2 U de *TAQ* polimerase (Kapa®) em um volume total de reação de 20µl contendo 2µl do DNA extraído.

Os produtos do PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e revelados com Sybr Green (Invitrogen®) diluído, em luz ultravioleta. O gel foi visualizado e documentado no fotodocumentador (L-PIX EX) utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

Para a identificação genotípica de *Vibrio alginolyticus* foi realizado PCR com o primer *pyrH*, no qual amplifica 541pb (THOMPSON et al., 2005). E, para avaliação dos genes de virulência foram utilizados os primers *collagenase* (CAI et al, 2009), *ompK* (CAI et al., 2009), *toxR* (CAI et al., 2009), com produtos de tamanhos 424pb, 319pb, 173pb, respectivamente. As

sequências nucleotídicas dos primers e as referências que foram utilizadas como bases para otimização das reações de amplificação encontram-se indicados no quadro 3.

Quadro 3. Iniciadores e referência dos ciclos empregados nos ensaios de amplificação do gene de identificação e dos genes de virulência de *Vibrio alginolyticus*.

Gene	Primers	Ciclo	Fragmento	Referência
<i>pyrH</i>	GATCGTATGGCTCAAGAAG TAGGCATTTGTGGTCACG	94°C/5min ; 30x (94°C/1min ; 50°C/1min, 72°C/1min) 72°C/1min	541pb	THOMPSON et al., 2005
<i>Collagenase</i>	TGGTGAACAGCCAGTAAA CAAACCCATCATAAGTAGTC	94°C 5min ; 30x (94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1.5min) 72°C 10min	424pb	CAI et al., 2009
<i>ompK</i>	GGCGGTCGCTCTGGTATT TTGCCATCGTAAGTGCTGTA	94°C 5min ; 30x (94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1.5min) 72°C 10min	319pb	CAI et al., 2009
<i>toxR</i>	CAGAAGAATCGGAAGAACA TAGAATGACGCACAAAAGG	94°C 5min ; 30x (94°C 1min, 45°C 1min, 72°C 1.5min) 72°C 10min	173pb	CAI et al., 2009

4.7 Sequenciamento do gene *pyrH* e análise das sequências de DNA.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e enviado para o sequenciamento para o Laboratório de Biotecnologia da pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. As seqüências foram editadas no programa Bioedit (HALL, 1999) e submetidas ao algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), possibilitando a seleção de seqüências de nucleotídicas armazenadas no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com identidade com as seqüências dos micro-organismos isolados. As seqüências foram importadas para o programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2011), e alinhadas utilizando o programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994). Dendrogramas foram construídos utilizando o algoritmo Neighbor joining (NJ) utilizando modelo de análise de nucleotídeo adequado no programa MEGA excluindo-se gaps e dados perdidos para determinação da inferência das relações filogenéticas entre os isolados estudados (KUMAR et al., 2004). A robusteza de cada ramo foi determinada usando o teste não paramétrico de bootstrap com 1000 replicatas (FELSENSTEIN, 1985).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio alginolyticus*.

Das 209 amostras de *Vibrio* spp. identificadas fenotipicamente por Oliva (2012), todas que apresentaram colônias com coloração amarela (sacarose positivo) em Ágar TCBS à 1% de NaCl foram suspeitas e os testes bioquímicos indicaram que 23,4% (49/209) eram pertencentes à espécie *Vibrio alginolyticus*.

A taxonomia de vibrios vem sendo refinada nos últimos anos e o gene *pyrH* (uridilato quinase) tem sido validado como um marcador taxonômico de alta resolução. A elevada proporção de mutações sinônimas essenciais para a conservação da sequência de aminoácidos neste *locus* gênico permite a diferenciação entre espécies. Assim, o sequenciamento do fragmento de 541pb deste gene é utilizado para diferenciação de espécies de *Vibrio* (THOMPSON et al., 2005). Logo, após a identificação fenotípica, os isolados foram submetidos à técnica de PCR para detecção deste gene. Todos foram positivos, e um total de 8 representantes foi enviado ao sequenciamento e os resultados estão sendo aguardados.

Através da técnica de MALDI TOF MS, observou-se que 87.8% (43/49) das amostras identificadas anteriormente como *V. alginolyticus* foram confirmadas. No entanto, 4 isolados foram identificados como *Shewanella putrefaciens* (8.2%) e um isolado como *Vibrio parahaemolyticus* (2%). Apenas um isolado não foi identificado pela técnica. Quanto a confiabilidade da identificação, observou-se que dos 48 isolados identificados, 46 obtiveram score superior a 2. Apenas dois isolados, identificados como *V. alginolyticus*, apresentaram um score abaixo de 2, caracterizando identificação provável do gênero, mas não sendo confiável para espécie (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação dos 49 isolados obtida pela técnica MALDI-TOF MS através do programa Bruker Daltonik MALDI.

Amostra	Identificação por MALDI-TOF	Score
3MAC ²	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.076
6AM	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.233
14AM ²	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.052
14AM	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.073
3AM	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.058
4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.207
13	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.049
14	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.087
21	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.114
23	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.247
28	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.105
30	Not reliable identification	-
31	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.116
6A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.06
6B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.162
10D	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.031
10E	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.16
13D	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.205
5A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.253
6B'	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.161
7A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.074
8B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.087
10B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.102
11A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.308
11B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.213
11C	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.949
11D	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.168

12A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.031
12B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.166
12C	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.118
12D	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.129
15A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.106
15B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.223
18C	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.244
18D	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.035
22A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.111
32A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.23
36A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.243
39A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.236
64A	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.109
64B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.13
70A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.216
71A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.114
72B	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.229
76A	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.299
77A	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2.24
82A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.898
85A	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.066
85B	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.054

O monitoramento e caracterização de bactérias marinhas tem sido laborioso e de alto custo devido à grande quantidade de testes a serem realizados, com isso o MALDI-TOF MS tem sido uma ferramenta importante para identificação desses microrganismos (EMAMI et al., 2012).

Com relação à técnica, é uma metodologia que vem sendo avaliada e aplicada na identificação bacteriana de diversos gêneros. Esta identificação ocorre mediante perfis de proteínas a partir de programas de bioinformática, cujos bancos de dados são compostos por vários espectros de referência (NG et al., 2013; DAVIES et al., 2012; KUHNS et al., 2012; FANG et al., 2012; DJELOUADJI et al., 2012; BERGERON et al., 2011; VERROKEN et al., 2010; NAGY et al., 2009; MELLMANN et al., 2008).

Um fator limitante na utilização de MALDI-TOF MS para caracterização de bactérias aquáticas é a falta de um banco de dados com espectros de massa adequados para a identificação rápida e fiável dessas espécies durante o processamento. Os bancos de dados disponíveis atualmente são focados em espécies clinicamente importantes associados com doenças humanas. O software Bruker Daltonics Biotyper, no qual foi empregado para este estudo, contém atualmente uma biblioteca com 4000 espectros de massa de referência, porém a maioria pertence a organismos terrestres e espectros de massa para alguns grupos importantes de bactérias marinhas (EMAMI et al., 2012).

Hazen et al. (2009), compararam os espectros de 10 isolados de *Vibrio* através do MALDI-TOF MS. Os autores abordaram essa técnica já que muitas espécies de *Vibrio*, como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* e *V. campbelli*, não conseguem ser distinguíveis apenas pela análise do gene 16S rRNA. Já Böhme et al. (2010) utilizaram o MALDI -TOF MS para a caracterização de espécies bacterianas associadas a frutos do mar, incluindo *Proteus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia* e *Shewanella*. Os autores ao compararem os espectros no nível de gênero, constataram que apenas alguns gêneros podem ser diferenciados. Os gêneros *Shewanella* e *Vibrio* não mostraram semelhanças no nível de gênero e apenas alguns pico de massas comuns poderia ser encontrados. No entanto, os perfis espectrais dos dois gêneros, que fazem parte da microbiota natural de pescados marinhos, puderam ser claramente distinguidas das outras espécies que foram estudadas.

Assim o presente trabalho alcançou um alto índice de isolados identificados por perfis de proteínas usando MALDI-TOF MS, podendo esta técnica ser a melhor opção de identificação, com a vantagem de ser um método eficiente, mais rápido e de fácil

manipulação. Porém a aquisição do equipamento torna-se improvável para determinados laboratórios, uma vez que este requer um custo elevado.

Shewanella putrefaciens é um bacilo gram-negativo não-fermentador, móvel, capaz de produzir sulfeto de hidrogênio. Pode ser encontrado em diversos locais como alimentos, esgoto e água doce ou salgada, sendo responsável pela degradação de material orgânico. *S. putrefaciens* tem sido descrita como uma bactéria importante na deterioração de animais aquáticos como o peixe (SHARMA & KALAWAT, 2010; HOLT et al., 2005). A sua detecção através do MALDI-TOF MS aponta para a importância de técnicas mais acuradas na análise das espécies circulantes no ambiente aquático.

V. alginolyticus e *S. putrefaciens* são bactérias que necessitam de sódio para seu crescimento, porém ocorre o crescimento de *S. putrefaciens* em meio de cultura sem adição de NaCl (TEIXEIRA, 2009; ANVISA, 2004). A fermentação dos açúcares maltose e manose, assim como descarboxilação de lisina são testes que permitem a diferenciação entre essas duas espécies (ANVISA, 2004). Esta espécie não foi diferenciada pelo protocolo fenotípico utilizado, e pelo fato de ter amplificado o gene *collagenase*, considerado marcador de espécie em *V. alginolyticus*, foi erroneamente identificada como pertencente a esta espécie. Este fato corrobora o desafio da busca pela compreensão da diversidade do ambiente marinho e seus impactos sobre sanidade animal e saúde pública.

5.2 AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE *Vibrio alginolyticus*.

Para a análise fenotípica da virulência de *V. alginolyticus*, foi realizado o teste da hidrólise da gelatina onde todos isolados de *V. alginolyticus* e *S. putrefaciens* foram positivos (n = 47) (figura 2B). Lafisca e seus colaboradores (2008) observaram que a maioria das cepas de *V. alginolyticus* aumentaram as características de virulência expressos por enzimas e entre elas a collagenase. A degradação do colágeno permite que a invasão e a proliferação de microrganismo patogênicos sejam mais favoráveis, levando a quadros de infecção e patologia tanto em animais marinhos quanto em humanos (CAVALEIRO, 2008).

Dentre os 49 isolados estudados, 47 amplificaram para o gene *collagenase* apresentando um fragmento de 424pb (figura 2A), 91,5% foram caracterizados como *Vibrio alginolyticus* (43/47), 6,4% como *S.putrefaciens* (3/47) e 2,1% *V. parahaemolyticus* (1/47) pela técnica de MALDI-TOF. Apesar do gene *collagenase* ser considerado por alguns autores como um marcador molecular de espécie de *Vibrio* (PINTO et al., 2005), no presente trabalho, foi observada a presença deste gene em *Shewanella putrefaciens*. Os mesmos autores reportam a utilização do gene *collagenase* na avaliação da virulência, como também consideram-no um alvo alternativo para a análise filogenética e identificação de espécies de *Vibrio alginolyticus* para complementar os sistemas de identificação fenotípica mais convencionais.

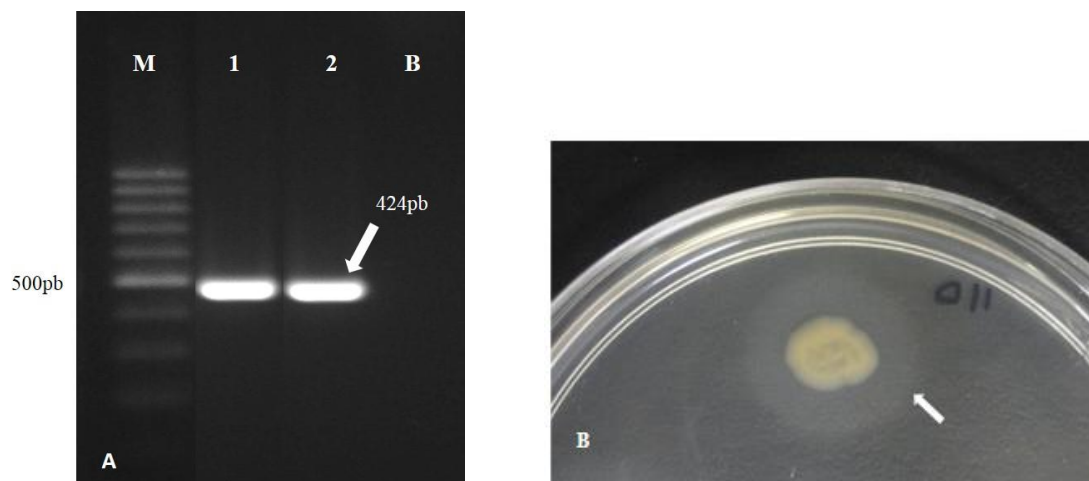


Figura 3. **A** - Perfil eletroforético do gene *collagenase* (424 pb) em gel de agarose 1,5%. (M= marcador 100 pb; 1 = controle positivo; 2 = isolado positivo; B = branco da reação de PCR). **B** - Presença do halo transparente ao redor da colônia indicando resultado positivo no teste de hidrólise da gelatina.

A expressão do gene *ompK* pode ser observada em 46,9% (23/49) dos isolados, pela amplificação de um fragmento de 319pb (Figura 3). Destes, 91,3% confirmaram a presença do gene em *V. alginolyticus* (21/23), 4,3% em *V. parahaemolyticus* (1/23) e 4,3% em *S. putrefaciens* (1/23). A literatura relata que técnicas de PCR tem revelado que a proteína OmpK está amplamente distribuída entre as espécies de *Vibrio* incluindo *V. alginolyticus*. O alinhamento de sequências de aminoácidos tem demonstrado que o gene *ompK* de *Vibrio alginolyticus* compartilha uma alta identidade com *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* em mais de 70%. Estas análises também tem indicado que OmpK é uma proteína altamente conservada, o que poderia servir como um antígeno de superfície para uma vacina promissora (LI et al., 2010; STRUYWE et al., 1991 apud QIAN et al., 2008). Zhang e colaboradores (2008) já relataram a imunidade protetora induzida por vacinação de OmpK de *V. harveyi* em peixes. Além disso, essas proteínas podem desempenhar papéis semelhantes durante a infecção e ter as mesmas oportunidades de serem expostas ao sistema imune (LEE et al., 2004).

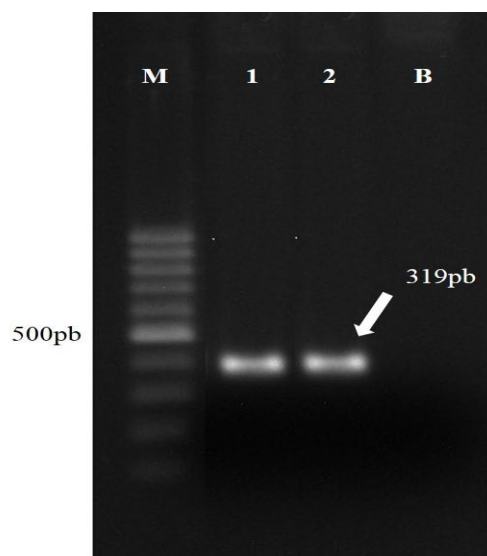


Figura 4. Perfil eletroforético do gene *ompK* (319 pb) em gel de agarose 1,5%. (M= marcador 100 pb; 1 = controle positivo; 2 = isolado positivo; B = branco da reação de PCR).

Dos isolados avaliados 14,3% (7/49) produziram bandas para amplificação do gene *toxR*, sendo todos caracterizados como *V. alginolyticus*, gerando um fragmento de 173pb (Figura 4). Genes de virulência homólogos ao *V. cholerae*, estão amplamente distribuídos em algumas de espécies de vibrio (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* non-O1, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis* e *V. alginolyticus*). Cepas de *V. alginolyticus* podem apresentar alguns destes genes, como o *toxR*, sugerindo que esta espécie seja um importante reservatório de genes de virulência advindos de outras espécies de *Vibrio* vinculadas no ambiente marinho (XIE et al., 2005).

Em estudo realizado por Osorio e Klose (2000), o alinhamento múltiplo de sequências de *toxR* de *Vibrio* mostrou que uma região na membrana citoplasmática, conhecida como "tether", é cercada por sequências relativamente conservadas que permite a ativação da transcrição e dos domínios periplásmicos e transmembrana da proteína ToxR. E embora a região "tether" seja considerada um domínio variável (com deleções e/ou inserções), ela mantém sua função de ativação.

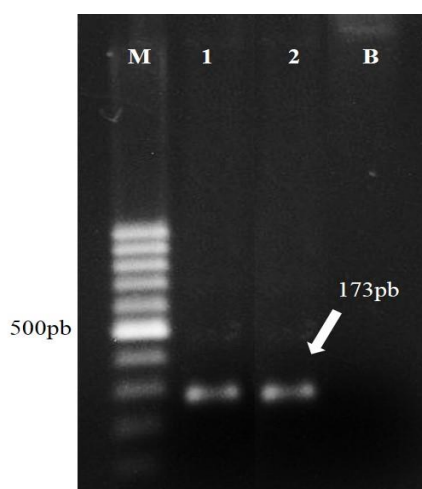


Figura 5. Perfil eletroforético do gene *toxR* (173 pb) em gel de agarose 1,5%. (M= marcador 100 pb; 1 = controle positivo; 2 = isolado positivo; B = branco da reação de PCR).

6 CONCLUSÃO

- *Vibrio alginolyticus* é uma espécie bacteriana de importância na sanidade animal por ser potencialmente patogênica, capaz de causar enfermidades não só em humanos como também em animais de ambiente aquático.
- Os testes fenotípicos foram capazes de identificar os isolados de *V. alginolyticus* quando comparados com os resultados genotípicos e de proteômica.
- Os testes fenotípicos não permitiram a discriminação entre os isolados de *V. alginolyticus* e *S. putrefaciens*.
- Com os resultados obtido neste estudo, o uso do gene *collagenase* como marcador molecular de espécies de *Vibrio* torna-se questionável por ter gerado o mesmo fragmento para *Shewanella putrefaciens*.
- A identificação de isolados ambientais é de extrema complexidade em virtude de alguns fatores como: salinidade, pH, temperatura e diversidade metabólica. Assim a utilização de técnicas genômicas como amplificação de genes alvos pela PCR e proteômicas como o MALDI-TOF MS são fundamentais para identificação rápida, precisa e eficaz.
- Por sua elevada especificidade e sensibilidade, O MALDI-TOF MS foi considerado padrão-ouro para este estudo.
- O ambiente aquático pode atuar como disseminador de genes de virulência detectado nas espécies de *Vibrio*. Com isso cepas não patogênicas podem adquirir estes genes provavelmente por transferência horizontal ou por transdução entre outras espécies de *Vibrio* e tornarem-se patogênicas.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, n.13, 2003.
- AGUIRRE-GÚZMAN, G.; RUÍZ, H.M.; ASCENIO, F. A review of extracellular virulence product *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquac. Res. Oxford**, v.35, n. 15, p. 1395-1404, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v.25, p.3389–3402, 1997.
- ALVES, N. J.; MAIA NETO, O.S.; SILVA, B.S.O.; DE MOURA, R.L.; FRANCINI-FILHO, R.B.; BARREIRA E CASTRO, C.; PARANHOS, R.; BITNER-MATHE, B.C. et al. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. **Environ Microbiol Rep**, v.2, p.90–95, 2010.
- ANANDRAJ, A., MARSHALL, D. J., GREGORY, M. A. & MCCLURG, T. P. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. **Comp Biochem Physiol Part C**, v.132, p.355-363, 2002.
- ANGUIANO-BELTRÁN, C.; LIZÁRRAGA-PARTIDA, M.L.; SEARCY- BERNAL, R. Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Dis Aquat Organ**, v.59, p.119–123, 2004.
- AQUINI, E.N; FERREIRA, J.F. A influência da origem da semente no crescimento do mexilhão *Perna perna* (L.) em sistema de cultivo. In: **XI Simpósio Brasileiro De Aquicultura Simbraq. Resumos e artigos científicos**, p. 81, Aquicultura Brasil. 2000.
- ARANA, L.V. Cultivo de plantas aquáticas e moluscos. In: ARANA, L.V. **Fundamentos de aquicultura**. Florianópolis, UFSC, p. 85 -121, 2004 b.
- ARANA, L.V. Fundamentos de aquicultura. Florianópolis: **Editora Universidade Federal de Santa Catarina**, 2004.
- ARASAKI, K. M. Efeito da atividade antimicrobiana de substância produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* no controle da microbiota do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- ARAÚJO, A.A.B. Obtenção de sementes de mexilhão *Perna perna* (BIVALVIA-MYTILIDAE) em estruturas manufaturadas, na Ponta do Papagaio, Palhoça- Santa Catarina. Florianópolis. 106p. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 1994.
- ARAUJO, M. A. **Característica microbiológica, sensorial e tempo de vida útil de ostras (*Crassostrea gigas*) defumadas**. 2001. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BALEBONA, M. C.; ANDREU, M. J.; BORDAS, M. A.; ZORRILLA, I.; MORIÑIGO, M. A.; BORREGO, J.J. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for culture gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.11, p. 4269-4275, 1998.

BARAJ, B. et al. Trace metal content trend of mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) from the Atlantic coast of southern Brazil. **Water, Air & Soil Pollution**, v.145, p.205-214, 2003.

BARBUDDHE, S.B.; MAIER, T.; SCHWARZ, G.; KOSTRZEWA, M.; HOF, H.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T.; HAIN, T. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.5402–5407, 2008.

BAUERA. & RØRVIK, L.M. A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholera* and *Vibrio vulnificus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p. 371-375, 2007.

BEAUBRUN, J.J.G.; GOPINATH, G.; KOTHARY, M.H.; FRANCO, A.; CURTIS, S.K.; ERIBO, B.E.; TALL, B.D. Influence of iron-chelated growth conditions on outer membrane protein production and virulence of *Vibrio tubiashii*. **Food Microbiology**, v.28, p.1409–1413, 2011.

BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e workshop tecnologias para aproveitamento integral do pescado. Campinas. **Anais**. p.38-84, 2000.

BELTRÃO, M. Arqueologia do Estado do Rio de Janeiro, Arquivo Público do Rio de Janeiro, 1995.

BENTIVOGLIO, M.; PACINI, P. Filippo Pacini: A determined observer. **Brain Res, Bull.**, New York, v.38, n. 2, p. 161-165, 1995.

BÖHME, K.; FERNANDEZ-NO, I.C.; BARROS-VELAZQUEZ, J.; GALLARDO, J.M.; CALO-MATA, P.; et al. Species Differentiation of Seafood Spoilage and Pathogenic Gram-Negative Bacteria by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. **J Proteome Res**, v. 9, p. 3169–3183, 2010.

BONDAD-REANTASO, M.G.; SUBASINGHE, R.P.; ARTHUR, J.R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Vet Parasitol**, v.32, p.249–272, 2005.

BORDON, I. C. A.C. **Captação de sementes de mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) em coletores artificiais posicionados na superfície do mar.** São Paulo. Dissertação de mestrado. Agência paulista de tecnologia dos agronegócios - Instituto de pesca, São Paulo, 2009.

BUTT, A. A; ALDRIDGE, K. E; SANDERS A.C.V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v.4, n. 4, p. 201-212, 2004.

CAI, S.H.; LU, Y.S.; HEWU, Z.; JIAN, J. C.; HUANG, Y.C. A novel multiplex PCR method for detecting virulent strains of *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture Research**, v.41, p. 27-34, 2009.

CAI, S.H.; WU, Z.H.; JIAN, J.C.; LU, Y.S. Cloning and expression of gene encoding the thermostable direct hemolysin from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis of crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*). **J Appl Microbiol**, v.103, p.289–296, 2007a.

CAI, S.H.; WU, Z.H.; JIAN, J.C.; LU, Y.S. Cloning and expression of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis in *Lutjanus erythropterus* (Bloch). **J Fish Dis**, v.30, p.493–500, 2007b.

CAMPANELLI, A.; SANCHEZ-POLITTA, S.; SAURAT, J. H. Cutaneous ulceration after an octopus bite: infection due to *Vibrio alginolyticus*, an emerging pathogen. **Ann Dermatol Venereol**, v.135, p.225–227, 2008.

CAÑAS, B.; LOPEZ-FERRER, D.; RAMOS-FERNANDEZ, A.; CAMAFEITA, E.; CALVO, E. Mass spectrometry technologies for Proteomics. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 295-320, 2006.

CARBONNELLE, E.; BERETTI, J.L.; COTTYN, S.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v.45, p.2156– 2161, 2007.

CASH, P. Investigating pathogen biology at the level of proteome. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3190-3202, 2011.

CAVALEIRO, E.M.S. **Cloning and expression of a putative collagenase from *Aeromonas hydrophila***. Dissertação de mestrado em Microbiologia. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

CAVALLO, R.A.; STABILI, L. Presence of *Vibriosis* in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). **Water Res**, v.36, p.3719–3726, 2002.

CHANG, C.; QING-BAI, W.; ZHU-HONG, L.; JING-JING, Z.; XIAO, J.; HONG-YAN, S.; CHUN-HUA, REN.; CHAO-QUN, H. Characterization of role of the *toxR* gene in the physiology and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.101, p.281–288, 2012.

CHIEN, J.Y.; SHIH, J.T.H.; SUEH, P.R.; YANG, P.C.; LUH, K.T. *Vibrio alginolyticus* as the cause of pleural empyema and bacteremia in an immunocompromised patient. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.21, p.401-403, 2002.

CHIMETTO, L.A.; BROCCHI, M.; GONDO, M.; THOMPSON, C.C.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F.L.; Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **J Appl Microbiol**, v.106, p.1818–1826, 2009.

CHIN, K.J.; ESTEVE-NUNEZ, A.; LEANG, C.; LOVLEY, D.R. Direct correlation between rates of anaerobic respiration and levels of mRNA for key respiratory genes in *Geobacter sulfurreducens*. **Appl. Environ. Microbiol**, v.70, p.5183–5189, 2004.

COCHÔA, A.R. **Perdas de sementes de mexilhão *Perna perna* (L., 1758), cultivado na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CORDEIRO, D.; LOPES, T. G. G.; OETTERER, M.; PORTO, E. GALVÃO, J. A. Qualidade do Mexilhão *Perna perna* Submetido ao Processo Combinado de Cocção, Congelamento e Armazenamento. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v.25, n.1, p. 165-179, 2007.

CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L.; OTTAVIANI, D.; PRUZZO, C.; SERRATORE, P.; FISCHETTI, R. et al. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. **J Appl Microbiol**, v. 102, p. 229–237, 2007.

DE SOUZA, R.V.; NOVAES, A. L. T.; DOS SANTOS, A. A.; RUPP, G. S.; SILVA, F. M. Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves no Litoral de Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, p. 54-59, 2009.

DEFOIRDT, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. **Trends Biotechnol**, v. 25, p. 472-479, 2007.

DE-LA-RE-VEGA, E.; GARCÍA-GALAZ, A.; DÍAZ-CINCO, M.E.; SOTELO-MUNDO, R.R. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 20, p. 405–408, 2006.

DICKINSON, D.N.; LA DUC, M.T.; HASKINS, W.E.; GORNUSHKIN, I.; WINEFORDNER, J.D.; POWELL, D.H.; VENKATESWARAN, K. Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus spores* by mass spectrometry-based protein profiling. **Appl Environ Microbiol**, v.70, p.475–482, 2004.

DIECKMANN, R., HELMUTH, R., ERHARD, M. AND MALORNY, B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.7767–7778, 2008.

DIECKMANN, R.; STRAUCH, E.; ALTER, T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. **J Appl Microbiol**, v.109, p.199–211, 2010.

DIRITA, V.J.; MEKALANOS, J.J. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. **Cell**, v.64, p.29–37, 1991.

DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – *Vibrio*. Disponível em <<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/vibrio.html>> Acesso em: 31/07/2013.

DUARTE, A.S. Utilização de uma enzima vegetal na prevenção de fibroses e aderências. Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro, 2001.

ELER, M.N.; MILLANI, T.J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.33-44, 2007

EMAMI, K.; ASKARI, V.; ULLRICH, M.; MOHINUDEEN, K.; ANIL, A.C.; et al. Characterization of Bacteria in Ballast Water Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. **PLoS ONE** 7, v. 6, p. 38515, 2012.

ESTES, R.M.; FRIEDMAN, C.S.; ELSTON, R.A.; HERWIG, R.P. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. **Dis Aquat Organ**, v.58, p. 223–230, 2004.

EUZÉBY, J. P. *Vibrio parahaemolyticus*. In: Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, out.2005. Disponível em:<<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/parahaemolyticus.html>>. Acesso em: ago, 2013.

FAGUNDES, L.; GELLI, V.C.; OTANI, M.N.; VICENTE, M.C.M.; FREDO, C.E. Perfil sócio-econômico dos mitilicultores do litoral paulista. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.35, n.5, p. 47-59, 2004.

FAMASC, 2002. Maricultura em Santa Catarina. Disponível em <http://www.bsi.com.br/unilivre/centro/experiencias/experiencias/405.html>. Acesso em: 30/08/2013.

FAO. Aquaculture topics and activities. States of world aquaculture. Text by Rohana Subasinghe. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome, 2013.

FARMER, I.I.I.; JANDA, M.; BRENNER, F.W.; CAMERON, D.N.; BIRKHEAD, K.M. GENUS I. *Vibrio Pacini* 1854, 411AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. **Bergey's manual of systematic Bacteriology**. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria. 2nd ed. New York: Springer, v. 2, p. 494-546, 2005.

FDA, Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* spp. 1995. Disponível em (<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>). Acesso em 30/09/2013.

FDA. FDA Talk Paper. Los ostiones crudos contaminados con *Vibrio vulnificus* pueden ocasionar enfermedades e incluso la muerte. Distribuição imediata em 30 de julho de 2003. Disponível em: <http://www.foodsafety.gov/~lrd/tpoyvibs.html>>. Acesso em: agosto, 2013.

FELDHUSEN, F. T. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, v.2, n. 13, p.1651-1660, 2000.

- FELIX, V. F. S.; VASCONCELOS, N. C.; SOUZA, G. D.; VENDRAMINI, A. L. A. FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p. 783–791, 1985.
- FERNANDES, F.D.C.; SOUZA, R.C.L.D.; JUNQUEIRA, A.D.O.R.; RAPAGNÃ, L.C.; RAMOS, A.B. Distribuição mundial e o impacto de sua introdução no Brasil. In: RESGALLA JR., C. et al. O mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro (RJ): **Interciência**, v.2, p.26-30, 2008.
- FERREIRA, J. F., MAGALHÃES, A.R.M. Cultivo de mexilhões. In: **Aquicultura experiências brasileiras**, Santa Catarina: Multitarefa, 2003.
- FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 11, p. 711-723, 2007.
- GARCIA, E.G.; THORARINSDOTTIR, G.G.; RAGNARSSON, S. A. Settlement of bivalve spat on artificial collectors in Eyjafjordur, North Iceland. **Hidrobiología**, v.503, p. 131–141, 2003.
- GARNIER, M.; LABREUCHE, Y.; GARCÍA, C.; ROBERT, M.; NICOLAS, J.L. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Microb Ecol**, v.53, p.187–196, 2007.
- GARNIER, M.; LAUBRECHE, Y.; NICOLAS, J.L. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* ssp. *Francensis* ssp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. **Syst Appl Microbiol**, v.31, p.358–365, 2008.
- GAY, M.; BERTHE, F.C.J.; LE ROUX, F. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Dis Aquat Organ** v.59, p. 49–56, 2004a.
- GAY, M.; RENAULT, T.; PONS, A.M.; LE ROUX, F. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. **Dis Aquat Organ**, v.62, p. 65–74, 2004b.
- GIBOTTI, A.; SARADAKIS, H.O.; PELAYO, J.S.; TAGLIARI, K.C.; FALCÃO, D.P. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholera* non-01, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). **Journal Applied Microbiology**, v.89, p.70-75, 2000.
- GILARDI, G. L. Infrequently encountered *Pseudomonas* species causing infection in humans. **Ann Intern Med**, v. 77, p. 211-5, 1972.
- GOARANT, C.; HERLIN, J.; BRIZARD, R.; MARTEAU, AL.; MARTIN, C.; MARTIN, B. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. **Dis Aquat Organ**, v.40, p.101–107, 2000.

GOMEZ, J.M.; FAJARDO, R.; PATINO, J.F.; ARIAS, C.A. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3427–3429, 2003.

GÓMEZ-LEÓN, J.; VILLAMIL, L.; LEMOS, M.L.; NOVOA, B. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. **Appl Environ Microbiol.**, v.71, p.98–104, 2005.

GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOY, J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS Microbiology Reviews**, v.18, p.319-344, 1996.

GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; BLACKSTONE, G.M. & DePAOLA, A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p.7925-7929, 2006.

GOSLING, E. Bivalve Molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Books, **Blackwell Science**, London. 2003.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002.

GREGORACCI, G.; NASCIMENTO, J.; CABRAL, A.; PARANHOS, R.; VALENTIN, J.; THOMPSON, C.C.; THOMPSON, F.L.; Structuring of bacterioplankton diversity in a large tropical bay. **PLoS ONE**, v.7, p. 31408, 2012.

GUIMARÃES, R.L.; VILLAS-BOAS, D.F.; LÁZARO, N.S.; RODRIGUES, D.P. Patógenos das famílias Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae isolados de camarão (*Penaeus* spp.) de vida livre e de cativeiro no Rio de Janeiro. *In: Dia Mundial da Alimentação*. São Paulo, 2007

HALEY, B.J.; GRIM, C.J.; HASAN, N.A.; CHOI, S.Y.; CHUN, J.; BRETTIN, T.S.; BRUCE, D.C.; CHALLACOMBE, J.F.; DETTER, J.C.; HAN, C.S.; et al: Comparative genomic analysis reveals evidence of two novel *Vibrio* species closely related to *V. cholerae*. **BMC Microbiol.**, v.10, p.154, 2010.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p. 95–98, 1999.

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON, K.R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: **Bust n' Grab**. **BMC Biotechnol.**, v.4, p.8, 2004.

HASE, C. C.; MEKALANOS, J. J. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.730–734, 1998.

HASEGAWA, H.; LIND, E.J.; BOIN, M.A.; HÄSE, C.C. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 4101 – 4110, 2008.

HAZEN, T. H.; MARTINEZ, R.J.; CHEN, Y.; LAFON, P.C.; GARRETT, N.M.; et al. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 6745–6756, 2009.

HENRIQUES, M. B. Resistência do mexilhão *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. 113 p. Tese de Doutorado em Zoologia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2004.

HENRIQUES, M.B. et al. Estimativa do tempo de recuperação de um banco natural do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía de Santos, Estado de São Paulo. **Holos Environment**, v.1, n.12, p.85-100, 2001.

HIGGINS, D. G. CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. **Methods Mol Biol**, v. 25, p. 307-318, 1994.

HOLT, H.M.; GAHRN-HANSEN, B.; BRUUN, B. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. **Clin Microbiol Infect**. v. 11, p. 347-352, 2005.

HONG, H.; PATEL, D.R.; TAMM, L.K. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel. **J Biol Chem**, v.281, p.7568-77, 2006.

HUNTER-CEVERA, J; KARL, D; BUCKLEY, M. Marine microbial diversity: the key to Earth’s habitability. Washington: **American Academy of Microbiology**, 2005.

IBAMA. Instrução Normativa N° 105 de 20 de Julho. 2006.

ILINA, E.N.; BOROVSKAYA, A.D.; MALAKHOVA, M.M.; VERESHCHAGIN, V.A.; KUBANOVA, A.A.; KRUGLOV, A.N.; SVISTUNOVA, T.S.; GAZARIAN, A.O. et al. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic *Neisseria*. **J Mol Diagn**, v.11, p.75–86, 2009.

INOUE, T.; MATSUZAKI, S.; TANAKA, S. Cloning and sequence analysis of *Vibrio parahaemolyticus ompK* gene encoding a 26-kDa outer membrane protein, OmpK, that serves as receptor for abroad-host-range vibriophage, KVP40. **FEMS Microbiol Lett**, v.134, p.245–49, 1995b.

JAKSIĆ, S.; UHITIL,S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYI, L.G. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, v.13, p.491-93, 2002.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6° edição. Porto Alegre: **Editora Artmed**, p. 711, 2005.

- JANDA, J.M.; POWER, C; BRYANT, R.G.; ABBOTT, S.L. Current perspectives on the pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. **Clin, Microbiol, Rev**, v. 1, p. 245–267, 1998.
- JONES, B.W.; MARUYAMA, A.; OUVENEY, C.C.; NISHIGUCHI, M.K. Spatial and temporal distribution of the vibronaceae in coastal waters of Hawaii, Australia, and France. **Microb Ecol**, v. 54, p. 314–323, 2007.
- KAHLA-NAKBI, A.B.; BESBES, A.; CHAIEB, K.; ROUABHIA, M.; BAKHROUF, A. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. **Marine Environmental Research**, v.64, p.469–478, 2007.
- KAHLA-NAKBI, A.B.; CHAIEB, K.; BESBES, A.; ZMANTA, T.; BAKHROUF, A. Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. **Vet Microbiol**, v.117, p.321–327, 2006.
- KATRIEN, D.B.; BRAM, S.; WILLEM, W.; PAUL, V.; BERNARD, D.B.; PETER, V. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. **Syst Appl Microbiol**, v. 34, p. 20–29, 2011.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Diagnóstico Microbiológico**, 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.** v.5, p.150-163, 2004.
- KUSTOS, I.; KOCSIS, B.; KILAR, F. Bacterial outer membrane protein analysis by electrophoresis and microchip technology. **Expert Rev. Proteomics**, v.4, p.91 – 106, 2007.
- LABREUCHE, Y.; LAMBERT, C.; SOUDANT, P.; BOULO, V.; HUVET, A.; NICOLAS, J.L. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. **Microbes Infect**, v. 8, p. 2715–2724, 2006a.
- LABREUCHE, Y.; SOUDANT, P.; GONCALVES, M.; LAMBERT, C.; NICOLAS, J.L. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. **Dev Comp Immunol**, v. 30, p. 367–379, 2006b.
- LAFISCA, A.; PEREIRA, C.S.; GIACCONE, V. & RODRIGUES, D.P. Enzymatic characterization of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 50, n. 4, p. 199-202, 2008.
- LASCH, P.; BEYER, W.; NATTERMANN, H.; STAMMLER, M.; SIEGBRECHT, E.; et al. Identification of Bacillus anthracis by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–

Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. **Appl Environ Microbiol**, v.75, p.7229–7242, 2009.

LE ROUX, F.; AUSTIN, B. *Vibrio splendidus*, In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Eds). **The Biology of Vibrios**, Washington: ASM Press edition, p. 285-296, 2006.

LEE, R. J.; MORGAN, O. C. Environmental factors influencing the microbiological contamination of commercially harvested shellfish. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 65-70, 2003.

LEE, S.E.; RYU, P.Y.; KIM, S.Y.; KIM, Y.R.; KOH, J.T.; KIM, O.J. Production of *Vibrio vulnificus* hemolysin in vivo and its pathogenic significance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 324, p. 86-91, 2004.

LEITE, L. A. Influencia da predação, Parasitismo e densidade de sementes na perda de mexilhão *Perna perna* (L. 1758), cultivados na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LEKANG, O.I.; STEVIK, T. K. e BOMO, A.M. Evaluation of different combined collectors used in longlines for blue mussel farming. **Aquacultural Engineering**, v.27, p. 89-104, 2003.

LI, C.C.; CRAWFORD, J.A.; DIRITA, V.J.; KAPER, J.B. Molecular cloning and transcriptional regulation of ompT, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v.35, p.189–203, 2000.

LI, N.; YANG, Z.; BAI, J.; FU, X.; LIU, L.; SHI, C.; WU, S. A shared antigen among *Vibrio* species: Outer membrane protein-OmpK as a versatile Vibriosis vaccine candidate in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 28, p. 952-956, 2010.

LI, X.C.; XIANG, Z.Y.; XU, X.M.; YAN, W.H.; MA, J.M. Endophthalmitis Caused by *Vibrio alginolyticus*. **J. Clin. Microbiol**, v. 47, n. 10, p. 3379–3381, 2009.

LIRA, A. *Vibrio Parahaemolyticus* em bivalves comercializados no Grande Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v.15, n.90, p.91, 2001.

LIU, P.C.; LIN, J.Y.; HSIAO, P.T.; LEE, K.K. Isolation e caracterização de *Vibrio alginolyticus* patogênico da doença cobia *Rachycentron canadum* **J Básico Microbiol**, v. 44, p. 23 – 28, 2004.

LUZZI, I. Occurrence of *Vibrio* of other pathogenic bacteria in mussels harvested from Adriatic Sea. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p.43–46, 1999.

MACLENNAN, J.; MANDL, I.; HOWERS, E. Bacterial digestion of collagen. **The Journal of Clinical Investigation**, v.32, p.1317-1322, 1953.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10 ed. São Paulo: **Prentice-Hall**, p.610, 2004.

MAGALHÃES, A.R.M; FERREIRA, J.F. (Org.). Cultivo de Mexilhões. In: POLI, C. R. *et al.* **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004.

MAKINO, K.; OSHIMA, K.; KUROKAWA, K.; YOKOYAMA, K.; UDA, T.; TAGOMORI, K.; et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. **Lancet**, v. 9, p. 361 – 743, 2003.

MARQUES, H.L.A. Criação Comercial de mexilhões. **Editora Nobel**, São Paulo. p.111, 1998.

MATSUSHITA, O.; YOSHIHARA, K.; KATAYAMA, S.; MINAMI, J.; OKABE, A. Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.149-156, 1994.

MAZZEO, M.F.; SORRENTINO, A.; GAITA, M.; CACACE, G.; DI STASIO, M.; FACCHIANO, A.; COMI, G.; MALORNI, A. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of foodborne microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v.72, p.1180– 1189, 2006.

MERINO, G. S. A. D; GARCIA, L. J; MERINO, E. A. D; VIEIRA, M. L. H. A contribuição do design de embalagem para produtos da maricultura de origem familiar: embalagem para mexilhão. Bauru: **V Ciped**, p. 1067, 2009.

METHÉ, B.A.; WEBSTER, J.; NEVIN, K.; BUTLER, J.; LOVLEY, D.R. DNA microarray analysis of nitrogen fixation and Fe (III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. **Appl. Environ. Microbiol**, v.71, p. 2530–2538, 2005.

METRI, R.; ROCHA, R. M.; MARENZI, A. Epibiosis reduction on productivity in a mussel culture of *Perna perna* (Linné, 1758). **Braz. Arch. Biol. Tech**, v. 3, p. 325-331. 2002

MILLER, V. L.; TAYLOR, R. K.; MEKALANOS, J. J. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. **Cell**, v.48, p.271–279, 1987.

MOLNAR, J. J. Small-scale aquaculture as a sustainable rural livelihood: a global perspective. Trabalho apresentado no **X World Congress Of Rural Sociology**, Rio de Janeiro – Brasil, 2000.

MURRAY, P.R. *Vibrio, Aeromonas e Plesiomonas*. In: _____. Microbiologia médica, 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 30, p.265-271, 2004.

NAGY, E.; MAIER, T.; URBAN, E.; TERHES, G.; KOSTRZEWA, M. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, p. 796–802, 2009.

NANDI, B., NANDY, R.K., SARKAR, A., GHOSE, A.C. Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholerae*. **Microbiology**, v. 151, p. 2975–2986, 2005.

NICHOLS, D. S. Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. **FEMS Microbiol Lett**, v. 219, p. 1-7, 2003.

OKADA, K.; IIDA, T.; KITA- TSUKAMOTO, K. Y.; HONDA, T. *Vibrios* commonly possess two chromosomes. **J Bacteriol**, v.187, p. 752- 757, 2005.

OLIVA, M.S. Utilização de marcadores fenogenotípicos de virulência na caracterização de *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) em diferentes pontos do litoral do rio de janeiro. 82p. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

OLIVEIRA, E.N.; MARQUES, H.L.A.; GELLI, V.C.; LOMBARDI, J.V.; RODRIGUES, V.C.S.; CONTIN, E.R. Eficiência da captação de sementes de mexilhão *Perna perna* em diferentes modelos de coletores artificiais em Ubatuba (SP). In: Encontro Brasileiro De Malacologia, 18, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Anais**, v. único, p. 279, 2003.

OLIVEIRA, R.C. O Panorama da aqüicultura no Brasil: A prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia**, Risco Ambiental e Sociedade, v.2, n.1, 2009.

OLIVER, D.O.; KAPER, J. B. *Vibrio* species. In: Oliver & Kaper, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T.J. Editors. **Food Microbiology**. Fundamentals and Frontiers American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 228-264, 1997.

OSORIO, C.R.; KLOSE, K.E. A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 526-528, 2000.

PAILLARD, C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. **Aquat Living Resour**, v. 17, p. 467–475, 2004.

PENQUE, D. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. **Proteomics Clinical Applications**, v. 3, n. 2, p. 155–172, 2009.

PEREIRA, O. M. et al. Programa de desenvolvimento da criação ordenada de moluscos bivalves no estado de São Paulo. São Paulo: SAA/APTA/IP, 2000. (Relatórios Técnicos).
PESQUISA-AÇÃO NO BENEFICIAMENTO DE MEXILHÕES *Perna perna*. Laboratório de Tecnologia de Alimentos - Escola de Química (EQ/CT- UFRJ), **Papesca**, 2013.

PINTO, A.D.; CICCARESE, G.; TANTILLO, G.; CATALANO, D.; FORTE, V.T. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Protection**, v.68, p. 150-153, 2005.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v.287, p.1816–1820, 2000.

PONPRATEEP, S.; SOMBOONWIWAT, K.; TASSANAKAJON, A. Recombinant anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 and the prevention of vibriosis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v.289, p.219–224, 2009.

PRADO, S. **Microbiota asociada a criaderos de moluscos patogénesis y probiosis**. PhD Thesis. 2006.

PRADO, S.; ROMALDE, J. L.; MONTES, J.; BARJA J. L. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. **Dis Aquat Org**, v. 67, p. 209-215, 2005.

PROVENZANO, D.; KLOSE, K.E. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, p.10220–10224, 2000.

QIAN, R.; XIAO, Z.; ZHANG, C.; CHU, W.; MAO, Z.; YU, L. Expression and purification of two major outer membrane proteins from *Vibrio alginolyticus*. **World J. Microbiology Biotechnology**, v.24, p.245 – 251, 2008.

REID, G. C.; ROBB, F. T.; WOODS. D. R. Regulation of extracellular collagenase production in *Achromobacter iophugus*. **Journal of General Microbiology**, v.109, p. 149-154, 1978.

REID, G. C.; WOODS, D. R.; ROBB, F. T. Peptone induction and rifampicin insensitive collagenase production by *Vibrio alginolyticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 142, p. 447-454, 1980.

RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: **Bacteriological Analytical Manual**, 8^a ed., Cap.14, 2001. (Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html> / Acesso em: 06/07/2013).

RIBEIRO-COSTA, C.S.; MORINONI, L. Mollusca. In: **invertebrados: manual de aulas práticas**. Ribeirão Preto: Halos, Séries Manuais Prático em Biologia, v. 226, p. 74-1005, 2002. RIPABELLE, G.; SAMMARCO, M.L.; GRASSO, G.M.; FANELLI, I.; CAPRIOLI, A.;

ROBBERTSPE, J.; WOODSD, R.; REAYA, M.; ROBB, F.T. Simple and sensitive procedure for screening collagenolytic bacteria and the isolation of collagenase mutants. **Journal of General Microbiology**, 1978.

ROSA, R. C. C. *et al.* Biologia e cultivo de mexilhões. Florianópolis: **EPAGRI/UFSC**, p. 115, 2000.

RUBY, E.G.; URBANOWSKI, M.; CAMPBELL, J.; DUNN, A.; FAINI, M.; GUNSALUS, R.; et al. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, p.3004–9, 2005.

RUPF, S.; BREITUNG, K.; SCHELLENBERGER, W.; MERTE, K.; KNEIST, S.; ESCHRICH, K. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser

desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. **Oral Microbiol Immunol**, v.20, p.267–273, 2005.

SÁ, F.S.DE; NALESSO, R.C.; PARESQUE, K. Fouling organisms on *Perna perna* mussels: is it worth removing them? **Brazilian Journal of Oceanography** v.55, n2, p. 155-161, 2007.

SALÁN, E.O. **Tratamento térmico de mexilhões *Perna perna* como forma de assegurar a qualidade-avaliação do crescimento de *Bacillus cereus* e de *Staphylococcus aureus***. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura, Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005.

SEAP. Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Revista, 2006. Disponível em SECADES. P.; GUIJARRO, J.A. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 65, p. 3969-3975, 1999.

SELTMAN, G.H. The bacterial cell wall. Berlin: **Heidelberg Springer**; 2002.

SELVIN, J.; LIPTON, A.P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Dis Aquat Organ**, v.57, n.2, p.147 – 50, 2003.

SGANGA, G.; COZZA, V.; SPANU, T.; SPADA, P.L.; FADDA, G. Global climate change and wound care: case study of an off-season *Vibrio alginolyticus* infection in a healthy man. **Ostomy Wound Manag**, v.55, p.60–62, 2009.

SHARMA, K.K.; KALAWAT, U. Emerging infections: *Shewanella*—a series of five cases. **J Lab Physicians**. v. 2, p. 61-65, 2010.

SILVA, R.T. **Obtenção de sementes e ciclo reprodutivo do mexilhão *Perna perna* (L.) em áreas de produção do Estado de Santa Catarina. Florianópolis.70p**. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SIMON, M; SILVA, F. C. Custo de produção da ostra nativa cultivada no município de Guaratuba-PR. Florianópolis: **Fixarte**, p.20, 2006.

SOSIN, M.L; MORRISON, H.G; HUBER, J.A; WELCH, D.M; HUSE, S.M; NEAL, P.R; ARRIETA, J.M; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘‘rare biosphere’’. **PNAS**, v.103, n.32, p.12115–12120, 2006.

SOUZA, R.C.C.L. Bivalves marinhos introduzidos no Brasil. Resumos do **XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia**, Rio de Janeiro, 2003.

SPENCER, B.E. Molluscan shellfish farming. Oxford: **Blackwell Science**, 2002.

SRINIVASAN, S.; KJELLBERG. S. Cycles of famine and feast: the starvation and outgrowth strategies of a marine *Vibrio*. **J. Biosci**, v.23, p.501-511, 1998.

STABB, E. The *Vibrio fischeri*- *Euprymna scolopes* light organ Symbiosis. In *The Biology of Vibrios*, p. 204-218. Edited by F. L. THOMPSON, B. AUSTIN & J. SWINGS. Washington: ASM Press. 2006.

STROM, M. A; PARANJPE, R. N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes and Infection**, v.2, p. 177-188, 2000.

STRUYWE, M.; MOONS, M.; TOMMASSEN, J. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. **J Mol Biol**, v.218, p. 141-148, 1991.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Biochemistry**, 6th ed. W. H. Freeman and Company, USA, p.1026, 2007.

SU, Y.C.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food Microbiol**, v.24, p.549-558, 2007.

TAYLOR, R. K.; MILLER, V. L.; FURLONG, D. B.; MEKALANOS, J. J. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 2833-2837, 1987.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TEIXEIRA, C. E. Avaliação do efeito combinado dos processos de irradiação e atmosfera modificada na qualidade bacteriológica, físico-química e sensorial do file de tilapia (*Oreochromis niloticus*) resfriado. Niterói, Universidade Federal Fluminense, Tese de Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, 2009.

TERAMURA, N.; TANAKA, K.; IJIMA, K.; HAYASHIDA, O.; SUZUKI, K.; HATTORI, S.; IRIE, S. Cloning of a Novel Collagenase Gene from the Gram-Negative Bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and Its Efficient Expression in *Brevibacillus choshinensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 12 p. 3049-3056, 2011.

THOMPSON, F. L; AUSTIN, B; SWINGS, J. (Eds). **The Biology of Vibrios**, Washington: ASM Press edition, p. 285-296, 2006.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of *Vibrio*. **Microbial. Mol. Biol. Rev.**, v.68, n.3, p.403-431, 2004.

THOMPSON, F.L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C.C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; MUNN, C.B.; SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. **Appl Environ Microbiol**, v.71, p.5107-5115, 2005.

TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J.L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, v.246, p.37-61, 2005.

TORTORA; G.J.; FUNKE; B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8ª Ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 894, 2005.

TSOLIS, R.M. Comparative genome analysis of the alpha-proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.99, p.12503 – 12505, 2002.

TSURUOKA, N.; NAKAYAMA, T.; ASHIDA, M.; HEMMI, H.; NAKAO, M.; MINAKATA, H.; OYAMA, H.; ODA, K.; NISHINO, T. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning and heterologous expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.162-169, 2003.

UNEP. Guidance for a Global Monitoring Programme for Persistent Organic Pollutants. **Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals**. Geneva, Switzerland, 2004.

VAN SCHAİK, W.; WILLEMS, R. J. L. Genome-based insights into the evolution of enterococci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 527-532, 2010.

VINATEA, L. A. A. Modos de apropriação e gestão patrimonial de recursos costeiros: estudo de caso sobre o potencial e os riscos do cultivo de moluscos marinhos na Baía de Florianópolis. Tese de Doutorado Interdisciplinar em Ciências Humanas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

WANG, L.U.; CHEN, J.C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. **Fish Shellfish Immunol**, v.18, n.4, p. 269–78, 2005.

WANG, Q.; LIU, Q.; CAO, X.; YANG, M.; ZHANG, Y. Characterization of two TonB systems in marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*: their roles in iron utilization and virulence. **Arch Microbiol**, v.190, n.5, p.595 – 603, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Foodborne disease outbreaks. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p.152, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. **Microbiological Risk Assessment Series**, Chapter 16, 2011.

WITHEY, J.H.; DIRITA, V.J. The toxbox: specific DNA sequence requirements for activation of *Vibrio cholerae* virulence genes by ToxT. **Mol Microbiol**, v.59, p.1779-1789, 2006.

XIE, Z.Y.; HU, C.Q.; CHEN, C.; ZHANG, L.P.; REN, C.H. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p.202-207, 2005.

XU, C., REN, H., WANG, S., PENG, X. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Research in Microbiology*, v. 155, n. 10, p. 835–842, 2004.

XU, C.; WANG, S.; REN, H.; LIN, X.; WU, L.; PENG, X. Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. **Proteomics**, v.5, p. 3142 – 3152, 2005.

YENG, P. S.; BOOR, K. J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio* infections. **Foodborne Pathog.Dis.**, v. 1, n. 2, p. 74 – 88, 2004.

YODER, J.S.; HLAVSA, M.C.; CRAUN, G.F.; HILL, V.; ROBERTS, V.; YU, P.A.; HICKS, L.A.; ALEXANDER, N.T.; CALDERON, R.L.; ROY, S.L.; BEACH, M.J. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events-United States, 2005–2006. **MMWR Surveill Summ**, v. 57, p.1–29, 2008.

YU, R.R.; DIRITA, V.J. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. **Mol Microbiol**, v.43, p.119–134, 2002.

ZHANG, C.; YU, L.; QIAN, R. Characterization of OmpK, GAPDH and their fusion OmpK-GAPDH derived from *Vibrio harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against vibriosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **J Appl Microbiol**, v.103, p. 1587–1599, 2007.

ZHANG, C.; YU, L.; QIAN, R. Cloning and expression of *Vibrio harveyi* OmpK and *GAPDH* genes and their potential application as vaccines in large yellow croakers *Pseudosciaena crocea*. **J Aquat Anim Health**, v. 20, p. 1-11, 2008.