

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

TANAJE LUIZ IZIDIO FERREIRA DE AMORIM JUNIOR

**INVESTIGAÇÃO DE *Vibrio cholerae* NAS ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
ESGOTO (ETEs) DE UBERLÂNDIA - MG**

UBERLÂNDIA - MG

2022

TANAJE LUIZ IZIDIO FERREIRA DE AMORIM JUNIOR

**INVESTIGAÇÃO DE *Vibrio cholerae* NAS ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE
ESGOTO (ETEs) DE UBERLÂNDIA-MG**

Projeto de pesquisa apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Torres de Melo

Coorientadora: Raílla Araujo Rodrigues

UBERLÂNDIA - MG

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço eternamente aos meus pais, Tanaje Luiz, Celeste Amorim e minha irmã Suelen, obrigado por terem acreditado em mim, por terem ajudado a trilhar meu caminho e a realizar meu sonho. Obrigada por serem a melhor definição de família.

Agradeço a todos os animais que contribuíram para minha formação, Pandora e Neko, por serem um conforto e a lembrança constante da razão do meu esforço.

Aos meus amigos Caroline, Bianca, Lucas, Derek e Pedro, agradeço por sempre oferecer palavras de conforto. Aos meus amigos de curso: Beatriz, Fernanda, Bruna, Letícia, Juliana, Júlio, Lucas e Amanda, foram muitos momentos difíceis, mas vocês foram capazes de ofuscar todos eles.

As amigadas do Laboratório, Ana Laura, Mariana, Bárbara e Carlyne, a troca de experiência e conselhos foram fundamentais. A minha orientadora Roberta Torres por toda paciência e ensinamentos e minha coorientadora Raílla Araujo pela companhia e parceria durante toda pesquisa.

A todos que de alguma maneira colaboraram com a realização deste trabalho, minha mais sincera e eterna gratidão!

RESUMO

A cólera é uma doença causada pelo *Vibrio cholerae*, uma bactéria gram-negativa enterotoxigênica de grande importância epidemiológica por sua capacidade epidêmica e potencial letal caso não tratada como emergência. Além disso, o patógeno apresenta associação a condições socioeconômicas deficientes e a desastres urbanos, como enchentes, que possam comprometer o fornecimento de água potável e o saneamento básico. Essas características implicam na necessidade de constante monitoramento sobre áreas com potencial endêmico de ocorrência da doença e indene do patógeno. O objetivo deste estudo foi realizar o monitoramento de *Vibrio cholerae* em ETEs no município de Uberlândia-MG. Foram realizadas coletas quinzenais em quatro pontos estratégicos determinados pela Prefeitura Municipal de Uberlândia, durante o período de quatro meses e posteriormente a análise microbiológica e molecular para identificação da bactéria *Vibrio cholerae* e determinação da presença de genes virulência. A análise molecular permitiu a confirmação de *Vibrio cholerae* em 54,5% dos isolados (36/66), em virtude da presença do gene *ompW*, com aumento expressivo ($p < 0,05$) na prevalência nos dois últimos meses de avaliação. Os genes *tox*, *hlyA* foram identificados em 100% (36/36) das cepas. Os genes *rtx* e *ompU* em 97,2% (35/36) e 25,0% (9/36), respectivamente. A presença do gene responsável pela síntese da toxina colérica (*ctxAB*) foi identificado em 43,7% (7/16) dos isolados. Houve diferença significativa na presença do gene *ompU* em relação às quatro ETEs, identificado apenas na ETE Uberabinha (9/10 – 90,0%) ($p = 0,0004$). Quatro perfis de virulência foram discriminados, sendo o mais prevalente aquele associado à presença dos genes *ompW*, *tox*, *hly* e *rtx* (P2), considerado relevante na ocorrência de casos de diarreia e bacteremias. A confirmação da espécie, incluindo a diversidade genética apontam a urgência na inclusão de diagnósticos diferenciais e exames complementares em casos de diarreia aguda, assim como de estudos epidemiológicos para rastreabilidade de sua origem aliados à necessidade de implantações de medidas de controle mais efetivas nas ETEs.

Palavras- chave: Cólera, Efluentes, Fatores de virulência, Saúde única.

ABSTRACT

Cholera is a disease caused by *Vibrio cholerae*, a gram-negative enterotoxigenic bacterium of great epidemiological importance due to its epidemic capacity and lethal potential if not treated as an emergency. In addition, the pathogen is associated with poor socioeconomic conditions and urban disasters, such as floods, which may compromise the supply of drinking water and basic sanitation. These characteristics imply the need for constant monitoring of areas with endemic potential for the occurrence of the disease and free from the pathogen. Hence, this study aimed to monitor and identify different profiles of *Vibrio cholerae* in ETEs in Uberlândia-MG. During four months, collections were carried out at four strategic points determined by the Municipality of Uberlândia, and the microbiological and molecular analysis for identification of the bacterium *Vibrio cholerae* and determination of the presence of virulence genes afterward. Molecular analysis confirmed the *Vibrio cholerae* in 54.5% of the isolates (36/66), due to the presence of the *ompW* gene, with a significant increase ($p < 0.05$) in prevalence in the last two months of evaluation. The *tox*, *hlyA* genes were identified in 100% (36/36) of the strains. The *rtx* and *ompU* genes in 97.2% (35/36) and 25.0% (9/36), respectively. The presence of the gene responsible for the synthesis of cholera toxin (*ctxAB*) was identified in 43.7% (7/16) of the isolates. There was a significant difference in the presence of the *ompU* gene in relation to the four ETEs, identified only in the Uberabinha ETE (9/10 – 90.0%) ($p = 0.0004$). Of the four virulence profiles were discriminated, the most prevalent being that associated with the presence of *ompW*, *tox*, *hly*, and *rtx* genes, considered relevant in the occurrence of diarrhea and bacteremia cases. The confirmation of the species, including the genetic diversity point to the urgency of including differential diagnoses and complementary exams in cases of acute diarrhea, as well as epidemiological studies for traceability of its origin and the need to implement more effective control measures in the ETEs.

Keywords: Cholera, Effluents, Virulence factors, One Health.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	7
Geral	7
Específico	7
Justificativa	7
REVISÃO DE LITERATURA	8
Histórico	8
Etiologia	10
Epidemiologia	10
Fatores de virulência	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
Locais de coleta e análise das amostras	13
Procedimentos de coleta e análise microbiológica das amostras	14
Análise molecular de identificação de espécie e dos genes de virulência	14
Análise estatística	16
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

A cólera é uma doença enterotoxigênica causada por uma bactéria gram-negativa pertencente à espécie *Vibrio cholerae*. Esta apresenta inúmeros sorogrupos de baixa severidade e outros como o sorogrupo *Vibrio cholerae* O1 subtipo Inaba e Ogawa com alto nível de toxicidade, cujo principal sintoma é uma diarreia aguda, levando a uma desidratação severa e rápida com potencial letal caso não tratada (OJEDA RODRIGUEZ e KAHWAJI, 2021).

O *Vibrio cholerae* apresenta uma disseminação em âmbito global desconhecida pois apenas os casos mais severos são relatados. Essa baixa notificação pode ser atribuída à menor atuação da vigilância epidemiológica e laboratorial somada ao desincentivo social, político e econômico para notificações (ALI *et al.*, 2015). É especulado que a cada ano há entre 1,3 e 4 milhões de casos dos quais se estima que entre 21.000 a 123.000 resultam em óbitos, mundialmente (WHO, 2021).

Há relatos de sete pandemias de cólera, sendo o primeiro registro de 1817, com início na Ásia (CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009). A sétima, e ainda em curso, foi detectada em 1961, e dados de 2017 relatam 1,2 milhões de casos (DEEN *et al.*, 2020). No início da década de 1830, durante a segunda pandemia, a Europa sofria um forte impacto pela cólera onde ficou evidenciado que, mesmo com a predisponência da doença por regiões mais vulneráveis, ela não se restringiu somente às classes mais baixas (ROSEN, 1994). No Brasil a doença foi diagnosticada pela primeira vez em 1855, data compatível com a terceira pandemia, com início no estado do Pará atingindo as demais regiões. Esta pandemia se estendeu até 1867 tendo registros estimados de 200 mil óbitos (BRASIL, 2008; CÂMARA, 2020). No início de 2010 houve um terremoto no Haiti, o qual foi determinante para a ocorrência de casos de cólera meses depois (WHO, 2010).

A cólera é disseminada pela via fecal-oral, seja de forma direta entre indivíduos ou indireta através de fluidos contaminados de um reservatório ambiental de duração variável, por meio de fômites ou consumo de alimentos contaminados, além do contato com vetores mecânicos. A cólera endêmica foi encontrada associada a água de efluentes e padrões climáticos sazonais, enquanto a cólera epidêmica geralmente ocorre perto de cursos d'água quando as condições climáticas são favoráveis ao crescimento da bactéria (DEEN *et al.*, 2020).

Diante de uma possível reemergência local, aliada às problemáticas sociais e ambientais agravantes envolvidas na ocorrência de casos de cólera, a investigação constante das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) na cidade de Uberlândia, buscando detectar a presença do *Vibrio cholerae*, possui relevância científica e social. Paralelamente, o acompanhamento acerca do potencial virulento das cepas isoladas se faz necessário na identificação dos possíveis riscos.

2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

2.1. Geral

Investigar a presença e o perfil de virulência de *Vibrio cholerae* nas ETEs do município de Uberlândia-MG.

2.2. Específico

- Coletar amostras das ETEs em quatro pontos estratégicos a fim de realizar o monitoramento local do patógeno;
- Identificar a presença de *Vibrio cholerae* por método microbiológico e molecular;
- Caracterizar o perfil de virulência das cepas isoladas por Reação em cadeia da Polimerase (PCR) convencional;
- Comparar o perfil de virulência das cepas de diferentes origens.

2.3. Justificativa

A cólera é uma doença diarreica grave, que pode ocorrer de forma epidêmica ou esporádica, e apresenta grande importância epidemiológica devido à sua manutenção em ambientes insalubres. Anualmente é estimado que ocorra 1,3 a 4,0 milhões de casos de cólera mundialmente, dos quais muitos são subnotificados por apresentarem sintomatologia leve, não permitindo uma investigação epidemiológica adequada, porém contribuem para a manutenção do *Vibrio cholerae* no meio ambiente. No Brasil, considerando o aspecto epidemiológico e patogênico do micro-organismo é de suma importância o monitoramento e

análise sobre o perfil de virulência das cepas circulantes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico

A denominação de cólera já possuía citações nos primeiros séculos da Era Cristã, sendo sempre associada à Índia. Uma das primeiras descrições de um surto foi por Gaspar Correia em 1503, sobre o acometimento de um exército por uma doença que “*provoca vômitos, sede de água, estômago ressecado, câibras musculares, olhos turvos*” levando a óbito em poucas horas (BRASIL, 2008).

A primeira pandemia registrada com embasamento científico consta de 1817 a 1823, até então os casos eram restritos à Índia. Porém, durante este período casos foram relatados na China e na Região do Mar Cáspio. Em 1829, início da segunda pandemia, a doença se disseminou para as Ilhas Britânicas, Europa e alcançou a costa do Pacífico da América do Norte chegando ao México, cuja duração se estendeu até 1859. Não houve apontamentos sobre números de acometidos, mas os indícios demonstraram a grande devastação sobre a América do Norte, América Central e Europa (CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009). A teoria miasmática, que denota que a origem das doenças (inclusive da cólera) era derivada dos maus ares ou de castigo divino sobre os pecadores, promoveu um atraso na ciência, especialmente sobre as características microbiológicas e epidemiológicas que envolvem a cólera (BRASIL, 2008).

A terceira pandemia (1852-1859) acometeu Ásia, África, Américas e alguns países da Europa (BRASIL, 2008). Em 1854, o médico inglês John Snow, hoje considerado precursor da epidemiologia moderna, demonstrou que a transmissão da cólera estava associada a uma fonte de água traçando sua origem até o bairro londrino de Soho (SACK *et al.*, 2004; CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009). Ele relatou a ocorrência de um surto envolvendo 500 pessoas em menos de duas semanas, o que o levou a rastrear a origem até uma bomba d’água contaminada (SANTOS, 1994). No Brasil, dados históricos descrevem que a doença chegou através de navios ingleses e posteriormente se disseminou por vários portos do Pará acumulando mais de cinco mil mortos em pouco tempo e sendo decretado o estado de epidemia (CÂMARA, 2020). Foi estimado que durante essa pandemia apenas no Brasil

houveram 200 mil mortes e milhões pelo mundo (SANTOS, 1994; COOPER, 1986).

Durante o período de 1863 a 1879 a quarta pandemia se estabelecia na Europa, África e América do Norte, oriunda da Índia. No Brasil, houveram casos durante as movimentações de tropas pela Guerra do Paraguai, das quais causaram um número mínimo estimado de 4.535 mortos consequentes da doença (SILVA, 2012). Foi apenas durante a quinta pandemia (1881-1896) que Robert Koch em 1883 isolou a bactéria que se referiu como “bacilos curvos” devido ao formato quando observado em microscópio óptico (SACK *et al.*, 2004; CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009).

No final do século XIX e decorrer da sexta pandemia (1899-1923) havia uma melhor organização da saúde em todos países. As melhorias nas condições de saneamento e abastecimento d’água foram significativas para controle da cólera, impedindo que os números de mortes fossem elevados, como descrito nas primeiras pandemias (SANTOS, 1994).

A sétima pandemia emergiu da Indonésia em 1961, diferindo de todas outras com surgimento na Índia, e se disseminando de forma superior às demais pandemias (CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009). Outra diferença era que seu agente etiológico foi classificado como “El Tor”, que havia sido isolado pela primeira vez no Egito por Robert Koch. Essa linhagem se disseminou pela Índia, África e sul da Europa (MARIN, 2013) e em surtos mais recentes no Haiti e Iêmen (DEEN *et al.*, 2020).

Em 1991, depois de 100 anos sem registro de casos latino-americanos, a cólera rapidamente se espalhou pelo continente. Ao término de 1992, dezenove países da América latina, incluindo Brasil, haviam notificado mais de 750.000 casos e 6.300 óbitos (POPOVIC *et al.* 1993). Os primeiros casos comprovados no Brasil ocorreram em abril de 1991, na região de fronteira com Colômbia e Peru, e desta região para o restante do país. Em três anos aproximadamente, o *Vibrio cholerae* estava disseminado em todo território nacional tendo maior impacto na região Norte e Nordeste, em virtude das dificuldades de controle causadas pelas indevidas condições de saneamento (MOACIR e LÚCIA, 1999). A partir de 2006 até o período atual só houveram três casos, importados, notificados (BRASIL, 2020). No entanto, o fato de não haver notificações não descarta a presença do patógeno.

Em 2017 um surto atingiu a República Democrática do Congo, Etiópia, Nigéria, Somália, Sudão e Zâmbia. Foram notificados 179.835 infectados e 3.220 óbitos, a letalidade reflete as limitações decorrentes da falta de recursos das regiões do surto (DEEN *et al.*, 2020). Durante o ano de 2019 houve um alerta devido ao aumento de casos em 31 países, com 923.037 notificações das quais 1.911 resultaram em óbitos. Havendo suspeita casos não notificados, seja por limitações dos sistemas de vigilância ou pelas consequências nos

comércio e turismo em decorrência das ações de controle da doença (WHO, 2021).

3.2. Etiologia

Pertencente à família *Vibrionaceae*, trata-se de um bastonete Gram negativo, aeróbio ou anaeróbio facultativo, em forma de vírgula, tendo um único flagelo polar demonstrando grande capacidade de mobilidade (BRASIL, 2008; OJEDA RODRIGUEZ e KAHWAJI, 2021). Tanto em ambiente aquático quanto no hospedeiro, apresenta capacidade de formação de biofilmes especialmente em ambientes com carência de nutrientes e no intestino como uma forma de efetivar sua proliferação superando as adversidades do meio (CLEMENS *et al.*, 2017).

Em elevado nível de infecção o doente pode apresentar fezes com aspecto de água de arroz, uma característica fenotípica correspondente a forma hiper infectante da bactéria, que potencializa o índice de contágio (DEEN *et al.*, 2020).

A bactéria *Vibrio cholerae* apresenta duas camadas, uma externa formada por lipopolissacarídeos (LPS) e outra camada interna fina formada por peptidoglicanos. O LPS possui três constituintes, entre elas o polissacarídeo O que funciona como um antígeno, e sua estrutura pode ser usada para classificação, apresentando mais de 200 sorogrupos de acordo com esse elemento (CHAUDHURI e CHATTERJEE 2009; AYDANIAN *et al.*, 2011). As sete pandemias documentadas foram causadas pelo sorogrupo O1, que ainda é classificado em dois sub-sorotipos Inaba e Ogawa. Com base nos biótipos, o O1 também é classificado em clássico e El Tor, sendo este responsável pela sétima pandemia (CHAUDHURI e CHATTERJEE 2009).

Por muito tempo se acreditou que a doença era causada apenas pelos sorotipos Inaba e Ogawa e dois biótipos, o clássico e El Tor, todos pertencentes ao sorogrupo toxigênico O1, até o surto de 1992 na Ásia, cujo sorogrupo responsável foi o O139, derivado genético do biotipo El Tor (SOMBOONWIT *et al.*, 2017).

3.3. Epidemiologia

A cólera é transmitida por via fecal-oral, sendo necessário uma dose significativamente elevada de células do micro-organismo para causar a infecção. A exceção cabe aos indivíduos que apresentam alguma incompetência da barreira ácida gástrica que os torna mais susceptíveis (CLEMENS *et al.*, 2017).

Os vibrios são sensíveis a acidez e grande maioria morre no estômago. Porém cepas virulentas podem aderir e colonizar o intestino delgado, onde a toxina da cólera é secretada e adentra as células epiteliais. A toxina gera uma complexa cascata de eventos que resulta na ativação da adenilato ciclase, gerando acúmulo de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) levando ao incremento na secreção de cloro e água (BROECK *et al.*, 2007).

No aspecto clínico, diarreia e vômito são as manifestações mais frequentes, 90% dos casos são classificados como leves. Nos casos graves o início é de forma súbita, com diarreia aquosa se apresentando como água amarelo esverdeado, sem pus, muco ou sangue. A permanência ou evolução deste quadro leva a manifestações relacionadas ao exacerbado desequilíbrio hidroeletrolítico e metabólico, uma vez que a desidratação pode chegar a 2 litros hora (BRASIL, 2008).

O período de excreção da bactéria pelo infectado pode variar de um dia em assintomáticos e até duas semanas em sintomáticos, havendo relato de excreção por períodos mais prolongados. A capacidade imunológica do hospedeiro tem forte influência sobre a manifestação, assim como a acidez gástrica e dieta do indivíduo. Estudos sugerem que indivíduos que já foram expostos à bactéria demonstraram proteção contra episódios recorrentes por pelo menos três anos (DEEN *et al.*, 2020).

A cólera pode ser classificada como endêmica ou epidêmica. Endêmica quando a ocorrência é recorrente sem a necessidade de reintrodução externa em pelo menos três indivíduos em um intervalo de cinco anos. A Ásia, a África e o Haiti são classificados como endêmicos (DEEN *et al.*, 2020). Em populações onde a cólera é endêmica os surtos ocorrem de forma sazonal, onde crianças de idade inferior a cinco anos são mais susceptíveis. A cólera epidêmica, por outro lado, requer a introdução exógena para uma população (CLEMENS *et al.*, 2017).

O *Vibrio cholerae* é natural do bioma aquático podendo ser encontrado em forma livre ou associada a outros organismos, como zooplânctons. Nessa condição, o *V. cholerae* pode assumir o estado viável, não cultivável. A multiplicação pode ocorrer concomitante com a floração do zooplâncton, desde que as condições ambientais sejam adequadas (CLEMENS, *et al.* 2017). Quando a temperatura da água está entre 10°C e 32°C o vibrio pode ser encontrado na superfície, no entanto em temperaturas inferiores a 10°C a bactéria tende a sedimentar e assumir a forma viável não cultivável (VNC). A concentração de sal entre 0,3% e 1,79% aumenta a sua viabilidade em detrimento da presença de outros microorganismos (BRASIL, 2008).

Os padrões epidemiológicos da cólera estão comumente dependentes à proximidade

geográfica com a água, seja por ciclos climáticos, desastres naturais como ciclones, enchentes e terremotos, e subsequentemente a contaminação (CLEMENS *et al.*, 2017). A água de lastro de navios é um ambiente propício para o *V. cholerae*, sendo uma das causas da disseminação da cólera nos anos 90 no continente Americano (MARIN, 2013).

A bactéria já foi isolada em moscas domésticas em uma área de baixo nível econômico em Delhi, Índia, mas não se sabe a capacidade de infecção por meio de vetores mecânicos. Um estudo usando fômites mostrou que em objetos como vidro e alumínio a bactéria perdeu a capacidade dentro de uma hora, em superfícies como tecido e madeira sua sobrevivência chegou a quatro horas, com isso é presumível que em superfícies porosas a possibilidade de sobrevivência é maior por manter a umidade por mais tempo (DEEN *et al.*, 2020).

As vacinas contra a cólera, todas de uso oral, possuem eficiência notável. Em 2013 foi produzido um estoque global, primariamente com objetivo de auxiliar em surtos. Porém sua eficiência no controle só é possível com estudo epidemiológico prévio, uma vez que a relação de oferta e demanda é desigual (PEZZOLI, 2019).

3.4. Fatores de virulência

Tendo a necessidade de se adaptar a diferentes meios, desde o intestino humano e de diversos reservatórios a ambientes marinhos, o *V. cholerae* demonstra capacidade de modular rapidamente sua expressão gênica em resposta ao meio. A dose infectante se mostra como importante na virulência desta bactéria, sendo necessário um número superior a 10^8 células para gerar infecção (CLEMENS *et al.*, 2017).

Dois fatores são considerados os principais na virulência desta espécie e incluem a toxina colérica (CT), que é codificada pelo gene *ctxAB* e o *toxin co-regulated pilus* (TCP), gene *tcp*. O TCP é responsável pela adesão do vibrio ao epitélio intestinal e pela auto aglutinação, que sinaliza a expressão da toxina pela bactéria. A CT é uma enterotoxina com duas subunidades que atuam sobre os enterócitos, a subunidade B forma um canal por onde a subunidade A passa para dentro do citosol e catalisa a ADP-ribosilação bloqueando a adenilato ciclase em um estado ativo resultando em uma maior produção de AMPc. O aumento da concentração do AMPc intracelular causa um desequilíbrio diminuindo a absorção de sódio e aumentando a liberação de cloreto e bicarbonato, consequentemente a água segue esse gradiente causando a perda de líquido e o quadro de diarreia decorrente da doença (CLEMENS *et al.*, 2017).

O gene *toxR* é um fator de transcrição localizado na membrana interna que regula diretamente a expressão de CT, e *Outer membrane protein U (ompU)* que é responsável pela formação de poros na membrana externa permitindo difusão passiva através da membrana (CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009). Estudos indicam que cepas *ompU* negativas tendem a ter menor tolerância aos sais biliares, sendo o *ompU* um fator para sobrevivência no trato gastrointestinal humano (KARUGASAGARE *et al.*, 2003).

O gene *Outer membrane protein W (ompW)* é um gene altamente preservado e pode ser usado para identificação genotípica da espécie *Vibrio cholerae* (KUMAR *et al.*, 2009, SHARMA; CHATURVERDI, 2006) e está associado a tolerância de salinidade que determina um importante fator de virulência associado à sobrevivência em condições adversas do *Vibrio cholerae* (FU *et al.*, 2018). O gene também pode ser encontrado em sorogrupos não O1 e O139, mas que da mesma forma possuem capacidade patogênica (NANDI *et al.*, 2000).

Os genes *Accessory Cholera toxin* e *Zonula occludens Protein (ace* e *zot* respectivamente) codificam toxinas de elevada importância na patogenia da doença (MARIN, 2013). O gene *ace* aumenta o transporte de íons transcelulares contribuindo para patogenia enquanto o gene *zot*, quando expresso, produz uma toxina que aumenta a permeabilidade da mucosa do intestino delgado por alterar as junções intercelulares (CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009).

O gene *rtx* é responsável pela produção da toxina que promove reticulação de actina aumentando a permeabilidade do intestino, e é expressado apenas pelo El Tor, mas não pelas demais cepas clássicas (CLEMENS *et al.*, 2017). O gene *hlyA* é um fator de virulência que desencadeia a hemólise e conseqüentemente a gastroenterite (DABOUL *et al.*, 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de coleta e análise das amostras

Foram coletadas amostras de quatro pontos, estrategicamente localizadas e representativas dos diferentes efluentes de esgoto do município de Uberlândia, sendo elas a ETE Aclimação, ETE Uberabinha, ETE Ipanema e ETE Vila Marielza. A ETE Uberabinha corresponde a 95% do esgoto captado em Uberlândia, e as demais apenas por seus respectivos bairros (correspondente aos nomes das ETES). Cada um dos pontos de monitoramento foi

visitado quinzenalmente para a realização das coletas conforme recomendações da Vigilância Epidemiológica da Superintendência Regional de Saúde. As coletas foram realizadas nos meses de março a junho de 2022.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em meio adequado até a chegada ao Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEPIMOL) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, para a realização das análises microbiológicas.

4.2. Procedimentos de coleta e análise microbiológica das amostras

A coleta para análise microbiológica consistiu na instalação de uma mecha de gaze nos pontos de coleta das ETES, mantidas durante um período de seis dias segundo a técnica de Moore (ANA, 2011). Em seguida, as mechas foram retiradas e introduzidas em um frasco contendo 300ml de APA (água peptonada alcalina) (DIFCO®) em dupla concentração e 1% de NaCl, onde permaneceram incubadas por 6-8h/35-37°C.

A partir desse crescimento, procedeu-se de duas maneiras: i. o sobrenadante (película) da cultura foi plaqueado em ágar TCBS (ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose) (BIOKAR®) com 1% de NaCl (18-24h/35-37°C); ii. 1 mL do crescimento foi transferido para 10 mL de APA com 1% de NaCl e incubado por 18-24h/35-37°C. Em seguida, o sobrenadante (película) foi semeado em ágar TCBS (BIOKAR®) preparado com 1% de NaCl.

Duas a três colônias características, crescidas no ágar TCBS (BIOKAR®), sacarose positiva (amarela), foram repicadas para TCBS (BIOKAR®) e Blood agar (Sigma Aldrich®) a 35-37°C, durante 18-24 horas ambos os meios com com 1% de NaCl. Além disso também foi realizada a confecção de lâminas de microscopia, utilizando coloração de gram. O armazenamento das amostras foi feito em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Kasvi®) com glicerol a 20% e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) e AN (Agar Nutriente) (Difco®).

Os testes realizados foram comparados com os controles positivos referentes às cepas de *V. cholerae* variantes Inaba e Ogawa (sorogrupo O1) (ATCC 14033 e ATCC 14035, respectivamente).

4.3. Análise molecular de identificação de espécie e dos genes de virulência

Para execução dos testes de PCR foram utilizados individualmente dez genes para detecção da espécie e diversas características de *V. cholerae* usando os *primers* listados na

Tabela 1.

Tabela 1: *Primers* (Kumar *et al.*, 2009) utilizados na identificação e caracterização genotípica das linhagens isoladas

Especificidade	Gene	Sequência de nucleotídeos	Amplicon
<i>Outer membrane protein W</i>	<i>ompW</i>	(F) CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG (R) GGTTCGTCGAATAGCTTCACC	304 pb
<i>Cholera toxin</i>	<i>ctxAB</i>	(F) GCCGGGTTGTGGGAATGCTCCAAG (R) CATGCGATTGCCGCAATTAGTATGGC	536 pb
<i>O1 Somatic antigen</i>	<i>rfbO1</i>	(F) TCTATGTGCTGCGATTGGTG (R) CCCCAGAAAACCTAATGTGAG	638 pb
<i>Toxin coregulated pilus</i>	<i>tcp</i>	(F) CGTTGGCGGTCAGTCTTG (R) CGGGCTTTCTTCTTGTTTCG	805 pb
<i>Zonula occludens Protein</i>	<i>zot</i>	(F) TCGCTTAACGATGGCGCGTTTT (R) AACCCCGTTTCACTTCTACCCA	947 pb
<i>Repeat in toxin protein</i>	<i>rtx</i>	(F) CGACGAAGATCATTGACGAC (R) CATCGTCGTTATGTGGTTGC	265 pb
<i>Accessory Cholera toxin</i>	<i>ace</i>	(F) TAAGGATGTGCTTATGATGGACACCC (R) CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG	309 pb
<i>Haemolysin</i>	<i>hlyA</i>	(F) GAGCCGGCATTTCATCTGAAT (R) CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA	480 pb
<i>Outer membrane protein U</i>	<i>ompU</i>	(F) CCAAAGCGGTGACAAAGC (R) TTCCATGCGGTAAGAAGC	655 pb
<i>Toxin Regulator</i>	<i>tox</i>	(F) CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC (R) AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG	779 pb

Os *primers* que codificam a proteína da membrana externa OmpW (*ompW*), CT (*ctxAB*), zônula proteína ocludense (*zot*), antígeno somático O1 (*rfbO1*) e *pilus toxin coregulated* (*tcp*) foram feitos para confirmar a presença de *V. cholerae*, sua toxigenicidade, sorogrupo e patogenicidade. Em complementação, os demais *primers* foram para confirmar a presença de outros genes de virulência e toxigênicos que codificam a enterotoxina da cólera acessória (*ace*), hemolisina (*hlyA*), proteína da membrana externa OmpU (*ompU*), ‘repeat in toxin protein’ (*rtx*) e regulador de toxina (*toxR*).

Os *primers* foram selecionados para produzir amplicons de tamanhos diferentes para identificação clara, conforme a descrição apresentada por Kumar *et al.* (2009). O DNA foi extraído por meio do kit GoTaq Green Promega, conforme instruções do fabricante. A reação de PCR contemplou um volume final de 25µL, contendo 12,5µL de GoTaq® Green Master

Mix, 2x; 9,5µL de Nuclease-Free Water; 1µL do primer específico para cada gene (Tabela 1); e 2µL de DNA molde. As condições de ciclagem térmica foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 30 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação, 1 min a 59°C para anelamento e 2 min a 72°C para extensão; e extensão final a 72°C por 10 min.

Na reação controle negativo, a água deionizada em vez de DNA bacteriano foi adicionada à mistura de reação. Os controles positivos contemplam as cepas de *V. cholerae* Inaba e Ogawa (ATCC 14033 e ATCC 14035, respectivamente).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese, corados com solução de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen®), com inclusão de marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen®). Os resultados foram visualizados por luz ultravioleta em transiluminador (L PIX EX Loccus Biotechnology).

4.4. Análise estatística

Os resultados foram tabulados e analisados de forma descritiva com cálculo percentual de prevalência do patógeno e dos genes de virulência. Para os testes comparativos relacionados a localização, análise temporal e perfis de virulência foi utilizado Teste de Fisher, respeitando um nível de confiança de 95%. Todos os testes foram realizados no programa GraphPad Prism, versão 8.0.1.

5. RESULTADOS

No total foram realizadas 29 coletas de amostras das quais oito foram na ETE Aclimação e sete nas demais ETES (Ipanema, Vila Marielza e Uberabinha). A identificação de duas a três colônias suspeitas em uma mesma amostra permitiu o isolamento de 66 cepas típicas, sendo 18 na ETE Aclimação, 17 na ETE Ipanema, 16 na Vila Marielza e 15 na ETE Uberabinha, sem diferença significativa no número de isolados ($p>0,05$).

A análise molecular permitiu a confirmação de *Vibrio cholerae* em 54,5% dos isolados (36/66), em virtude da presença do gene *ompW*. Esses dados estão discriminados de acordo com a ETE e o mês de isolamento na Tabela 2.

Tabela 2: Prevalência de *Vibrio cholerae* de acordo com a ETE no município de Uberlândia-MG e o mês de isolamento do ano de 2022

Mês	ETEs				Total N=66
	Aclimação (N=18)	Uberabinha (N=15)	Ipanema (N=17)	Marielza (N=16)	
Mar	2 (11,1%)	-	-	-	2 (3,0%) ^A
Abril	2 (11,1%)	3 (20,0%)	-	-	5 (7,5%) ^A
Mai	2 (11,1%)	3 (20,0%)	5 (29,4%)	5 (31,2%)	15 (22,7%) ^B
Jun	2 (11,1%)	4 (26,6%)	5 (29,4%)	3 (18,7%)	14 (21,2%) ^B
Total	8 (44,4%) ^a	10 (66,6%) ^a	10 (58,8%) ^a	8 (50,0%) ^a	36 (54,5%)

Letras iguais na mesma linha ^(a) indica ausência de diferença estatística ($p>0,05$) e letras diferentes na mesma coluna ^(A,B) indica diferença estatística ($p=0,0452$).

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na prevalência de *V. cholerae* de acordo com as ETEs. Porém, foi possível detectar que nos meses de maio e junho houve maior prevalência da espécie, com a confirmação de positividade em 22,7 e 21,2% das amostras.

As cepas não confirmadas molecularmente como pertencentes à espécie *V. cholerae* não apresentaram nenhum dos genes investigados e provavelmente tratavam-se da espécie *V. alginolyticus*. Para as demais (36/66), os genes *zot*, *rfbO1*, *tcp* e *ace* não foram identificados. A prevalência dos genes *ompW*, *tox* e *hlyA* foi de 100% (36/36), 97,2% (35/36) para o gene *rtx* e 25,0% (9/36) para *ompU*. A Tabela 3 discrimina de forma individualizada os genes encontrados por ponto de coleta. A presença do gene responsável pela síntese da toxina colérica (*ctxAB*), um dos fatores de elevada toxigenicidade, foi verificada em 16/36 cepas (44,4%) e identificada em 43,7% (7/16) dos isolados. Houve diferença significativa na presença do gene *ompU* em relação às quatro ETEs, identificado apenas na ETE Uberabinha (9/10 – 90,0%) ($p=0,0004$) (Tabela 3).

Tabela 3: Prevalência dos genes virulência investigados nos isolados de *Vibrio cholerae*

ETEs (N)(n)	<i>ompW</i>	<i>hlyA</i>	<i>ompU</i>	<i>rtx</i>	<i>tox</i>	<i>ctxAB</i> *
Aclimação (8)(6)	8 (22,2%) ^a	8 (22,2%) ^a	0 ^a	8 (22,2%) ^a	8 (22,2%) ^a	3 (18,7) ^a
Uberabinha (10)(4)	10 (27,7) ^a	10 (27,7) ^a	9 (25,0%) ^b	10 (27,7) ^a	10 (27,7) ^a	0 ^a
Ipanema (10)(4)	10 (27,7) ^a	10 (27,7) ^a	0 ^a	9 (25,0%) ^a	10 (27,7) ^a	3 (18,7) ^a
V. Marielza (8)(2)	8 (22,2%) ^a	8 (22,2%) ^a	0 ^a	8 (22,2%) ^a	8 (22,2%) ^a	1 (6,2%) ^a
Total (36)(16)	36 (100%)	36 (100%)	9 (25,0%)	35 (97,2%)	36 (100%)	7 (43,7%)

(N) número de cepas avaliadas para os genes de virulência *ompW*, *hly*, *ompU* e *rtx*. (n) número de cepas avaliadas para o gene *ctxAB*. *Gene investigado em somente 16 isolados. Letras diferentes na mesma coluna ^(a,b) indicam diferença estatística.

A análise dos perfis de virulência permitiu identificar a presença de quatro perfis (P1 a P4) (Tabela 4). O perfil P2 foi significativamente mais prevalente em relação aos demais, tanto na avaliação de todos os isolados ($p=0,0073$), quanto das cepas provenientes da ETE Vila Marielza ($p=0,0101$). Já na ETE Uberabinha, a predominância do perfil P3 (Figura 1) era esperada ($p=0,0011$), por se tratar da única ETE que apresentou cepas com o gene *ompU*, que determinou esse perfil exclusivo.

Tabela 4: Frequência dos perfis de virulência identificado em *V. cholerae* isolados nas ETEs de Uberlândia-MG

Perfis	ETE Aclimação (N=8)	ETE Ipanema (N=10)	ETE Vila Marielza (N=8)	ETE Uberabinha (N=10)	Total (N=36)
P1. <i>ompW</i> , <i>tox</i> e <i>hlyA</i>	-	1 (10,0%) ^a	-	-	1 (2,8%) ^a
P2. <i>ompW</i> , <i>tox</i> , <i>hlyA</i> e <i>rtx</i>	5 (62,5%) ^a	6 (60,0%) ^a	7 (87,5%) ^a	1 (10%) ^a	19 (52,7%) ^b
P3. <i>ompW</i> , <i>tox</i> , <i>hlyA</i> , <i>rtx</i> e <i>ompU</i>	-	-	-	9 (90%) ^b	9 (25%) ^c
P4. <i>ompW</i> , <i>tox</i> , <i>hlyA</i> , <i>rtx</i> e <i>ctxAB</i>	3 (37,5%) ^a	3 (30%) ^a	1 (12,5%) ^b	-	7(19,5%) ^{ac}
Total	8 (22,2%)	10 (27,8%)	8 (22%)	10 (28%)	36 (100%)

Letras diferentes na mesma coluna ^(a,b,c) indicam diferença estatística.

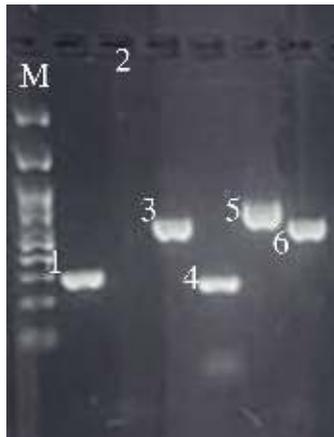


Figura 1: Gel de eletroforese demonstrando a presença dos genes correspondentes ao perfil de virulência P3 em *V. cholerae* isolado da ETE Uberabinha, Uberlândia-MG. M: marcador de peso molecular 100pb. Reação de PCR convencional. Bandas identificadas de 1 a 6 representam a presença dos genes *ompW*, *ctxAB*(negativo), *tox*, *rtx*, *hlyA* e *ompU*, respectivamente.

Perfis idênticos foram observados em isolados provenientes de uma mesma placa de cultura e incluíram um total de 15/36 (41,7%) cepas oriundas da coleta de seis amostras, indicando a possibilidade de se tratar de uma mesma linhagem em cada amostra. Em especial, na ETE Vila Marielza, houve duas coletas das quais as seis cepas isoladas pertenceram ao perfil P2 e contribuíram para a predominância desse perfil.

6. DISCUSSÃO

A identificação de *V. cholerae* em 54,5% (36/66) dos isolados nas ETES de Uberlândia representa um achado relevante a nível de saúde pública. Essa informação deixa evidente a circulação de linhagens da bactéria no município, o que ressalta a vulnerabilidade da população exposta em virtude da ausência de notificação de casos da doença tanto municipal quanto nos registros nacionais do SINAN desde 2016 (BRASIL, 2020).

Já foram identificados mais de 250 tipos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) no mundo, entre elas a cólera é classificada como de alta gravidade, sendo necessário apenas um caso para classificação como surto (BRASIL, 2020). A transmissão ocorre de forma fecal-oral ou transmissão pessoa a pessoa, sendo a contaminação de alimentos durante a cadeia produtiva e manipulação recorrente. Na cólera, é importante destacar sua presença natural em ambientes aquáticos podendo se associar a mariscos, peixes, algas, entre outros, possibilitando a transmissão da cólera se esses alimentos forem consumidos crus ou mal-cozidos (BRASIL, 2020). A presença do *V. cholerae* nas ETES

demanda uma investigação sobre sua origem, gerando o questionamento se sua presença é apenas nas ETEs ou circulando de forma não notificada entre a população.

Em um estudo com 32 amostras de água e 32 de sedimentos da região estuarina no estado do Ceará, durante três meses, houve isolamento de nove cepas de *V. cholerae* em água e sedimentos, no entanto nenhuma das cepas apresentava os genes de virulência *ctxAB*, *zot*, *tcp* e *rfbO1* (SOUSA *et al.*, 2006). No rio Tucumán, na Argentina, que é local de descarte de efluentes da região, o *V. cholerae* foi isolado de forma esporádica desde um surto de 1991. Em 38 dos 54 isolamentos de *V. cholerae* no decorrer de três anos, 24 desses isolados apresentavam o gene *ctxAB* e *tcp* (AULET *et al.*, 2007).

Quanto ao isolamento de *Vibrio cholerae*, a utilização do gene *ompW* na sua identificação foi descrita em vários estudos realizados em nível mundial (GOEL e JIANG, 2010; KUMAR *et al.*, 2009; SHARMA e CHATURVEDI, 2006). Esse gene é altamente preservado (FU *et al.*, 2018), uma vez que sua sequência nucleotídica permanece praticamente inalterada entre as diferentes cepas de *V. cholerae*, o que torna um marcador genético adequado para o micro-organismo (KUMAR *et al.*, 2009). Amostras positivas para o gene *ompW* demonstram também sua associação a resistência da bactéria em meios de elevada salinidade (FU *et al.*, 2018).

A seleção de colônias típicas no meio seletivo TCBS, está associada ao crescimento das espécies *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus*, únicas com crescimento de colônias amarelas no meio e com a presença de halos de hemólise em ágar sangue, consequente da ação de hemolisinas identificadas em *Vibrio alginolyticus* como hemolisina termoestável direta (TDH) e em *Vibrio cholerae* pela presença do gene *hlyA* (GAO *et al.*, 2018). Além da presença do gene *ompW*, todos os 36 isolados apresentaram o gene *hlyA*, o que indica que provavelmente os demais isolados (30/66 – 45,5%) tratavam-se da espécie *V. alginolyticus*.

Vários estudos relataram que outros *Vibrio* spp. como *V. mimicus*, *V. vulnificus* e *V. fluvialis* também produzem hemolisina que compartilha algumas características estruturais comuns ao *hlyA* (KOTHARY *et al.*, 2003). *HlyA* causa lise coloidosmótica de células de mamíferos, formando poros transmembrana nas membranas das células alvo, não causando apenas hemólise, mas também potentes efeitos citotóxicos, como vacuolização e apoptose de células epiteliais (MIZUNO *et al.*, 2019).

O *V. alginolyticus* é causador de vibrioses em vertebrados e invertebrados marinhos e responsáveis por doenças como gastroenterites, septicemia e fascíte necrosante em humanos por meio da ingestão de frutos do mar contaminados. Na aquicultura, o perigo de doenças infecciosas levou a perdas significativas de estoques e problemas com o bem-estar animal

(Matamp e Bhat, 2019). Essa espécie pode ser encontrada em abundância em sedimentos e água, e é considerada a mais abundante no meio natural (FU *et al* 2016). Este fato condiz com o presente estudo, no qual a caracterização de 45,5% dos isolados em TCBS e ausência de genes específicos como *ompW* e *hlyA* foi compatível com *V. alginolyticus*.

Nos meses de maio e junho foi possível detectar um aumento expressivo na prevalência de *V. cholerae*. Fato preocupante considerando seu problema em saúde pública. Em paralelo, vale ressaltar os relatos de funcionários acerca de falhas presentes nas ETES, especialmente no que diz respeito à fase que encontram no processo de ampliação das ETES. Esse momento demandou das equipes uma redução da utilização da capacidade total dos equipamentos, que promove a mistura do efluente tratado e não tratado. Também foi relatado que o tratamento do esgoto chega a 60 até 80%, normalmente, e em melhores dias esse número alcança 95%. Aliado a isso, há também alteração em relação às dosagens adequadas a serem utilizadas dos produtos químicos, uma vez que a quantidade de produtos químicos que chegam às ETES seria suficiente somente para aplicação em 2/3 do mês, o que pode inviabilizar o efeito do tratamento e o controle de *V. cholerae* no pós-tratamento.

Os pontos de coleta utilizados no presente estudo incluem ETES responsáveis pelo tratamento de efluentes de seus respectivos bairros, como ETE Aclimação, ETE Ipanema e ETE Vila Marielza. Em especial, a ETE Uberabinha é responsável pelo tratamento de aproximadamente 95% de todo esgoto gerado pela cidade de Uberlândia (UBERLÂNDIA, 2020). É importante destacar que esse ponto de coleta foi o que apresentou cepas positivas para o gene *ompU* e que determinou o perfil de virulência exclusivo P3.

O gene *ompU* é apontado como um fator que permite a maior resistência de *V. cholerae* a sais biliares (KARUNASAGAR *et al.*, 2003). Diferente do encontrado no presente estudo (9/66 – 13,6%), a proteína de membrana externa U (*ompU*) é abundante entre *Vibrio* spp. e também é associada a resistência antimicrobiana em cepas de *V. cholerae* de pacientes assim como de amostras ambientais (GANIE *et al.*, 2022).

A toxina cólera (CT) é considerada o marcador epidêmico mais importante entre as diversas toxinas produzidas por *V. cholerae*. A manifestação da diarreia aguda grave está associada à produção de CT codificada pelo gene *ctxAB*. Apesar das restrições de análise em todos os isolados de *V. cholerae*, o presente estudo comprovou a presença do gene em 7/16 (43,7%) isolados. A CT se liga à parede intestinal, alterando o fluxo normal de sódio e cloreto do organismo. Essa alteração faz com que o corpo secrete grandes quantidades de água, o que provoca diarreia aquosa, desidratação e perda de fluidos e sais minerais importantes para o corpo. Dois sorogrupos específicos da bactéria *V. cholerae* (sorogrupos O1 e O139)

representam os mais importantes pelo potencial epidêmico e pandêmico, mas outros sorogrupos produtores dessa toxina também podem causar a forma grave da doença. As demais linhagens negativas para *ctxAB* (9/16 – 56,3%) podem causar diarreia, porém menos severa (BRASIL, 2020).

Vale ressaltar que a patogênese da cólera é dependente da ação sinérgica de vários outros genes, incluindo os genes para um ou mais fatores de colonização (CHAUDHURI e CHATTERJEE, 2009), que incluem os genes *rtx* e *hlyA* identificados em 97,2 (35/36) e 100% (36/36) das cepas de *V. cholerae* do presente estudo, respectivamente. A toxina Rtx tem papel na evasão das defesas imunes inatas durante a infecção intestinal além de uma ampla gama de atividades, atua em conjunto com *hlyA*, exibindo a atividade citotóxica de formação de poros (LINHARTOVÁ *et al.*, 2010). Por isso, é comum encontrar valores de prevalência semelhantes para ambos os genes. De acordo com Daboul (2020), em estudo realizado com amostras ambientais de água em lagos e rios de Ohio (EUA), os autores perceberam a predominância dos genes (*rtx*, *ompU* e *hlyA*) e denominaram a observação como fatores de virulência acessórios, o quais mesmo na ausência da toxina colérica há risco de as cepas desencadearem gastroenterites.

Da mesma forma, perfis de virulência que contemplam os genes *tox*, *hlyA* e *rtx*, identificados em P2, P3 e P4, especialmente no perfil mais prevalente (P2, $p < 0,05$), mesmo podendo se tratar de cepas não O1 e não O139, tem capacidade de gerar prejuízo ao hospedeiro. De acordo com Jagadeeshan (2009), em estudo realizado com 62 isolados de amostras ambientais não O1 e não O139, essas linhagens podem desencadear o desenvolvimento de quadros de diarreia assim como bacteremias, e alerta sobre a prevalência de multirresistência de cepas com esse perfil gênico (FONTOURA *et al.*, 2018).

Adaptada a diferentes meios, desde o intestino humano e de diversos reservatórios e ambientes marinhos, o *V. cholerae* demonstra capacidade de modular rapidamente sua expressão gênica em resposta ao meio (CLEMENS *et al.*, 2017). Baseado no quantitativo de isolados de *V. cholerae* aliado à presença de genes de resistência, como *ompW* e *ompU*, e fatores de patogenicidade que incluem *tox*, *rtx*, *hlyA* e principalmente *ctxAB* deixam evidentes a manutenção de linhagens de *V. cholerae* capazes de causar doença grave em humanos no município de Uberlândia-MG.

7. CONCLUSÃO

Nossa investigação confirmou a presença da bactéria *V. cholerae* com genes de virulência importantes nas ETEs do município de Uberlândia. A presença da espécie e da diversidade de genes de virulência, incluindo o que codifica a toxina colérica, destaca a urgência na inclusão de exames complementares, diagnóstico diferencial em casos de diarreia aguda grave e estudos epidemiológicos que permitam a rastreabilidade do problema. Em nossa investigação, relatos apontam a necessidade de implantação de medidas de controle efetivas nas ETEs que garantam a qualidade do tratamento dos efluentes do município e a redução dos riscos à população exposta.

REFERÊNCIAS

ALI, M.; NELSON, A. R.; ANNA LENA LOPEZ; SACK, D. A. Updated global burden of cholera in endemic countries. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, 2015. Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003832>

AULET, O.; SILVA, C.; FRAGA, S. G.; et al. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 385–390, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000400002>

ANA- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Brasília, 2011. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2021/10/Guia-nacional-de-coleta-e-preservacao-de-amostras-2012.pdf>. Acesso em 17 de Agosto de 2022

AYDANIAN, A.; TANG, L.; J. GLENN MORRIS; JOHNSON, J. A.; O. COLIN STINE. Genetic diversity of O-antigen biosynthesis regions in *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 7, p. 2247–2253, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.01663-10>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, **Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica da Cólera**, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF Curso sobre Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica com enfoque em Cólera, 2008. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_colera2ed.pdf.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cólera**, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/colera/>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**; Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha> Acesso em 17 de Agosto de 2022

BROECK, D. V.; HORVATH, C.; Wolf M. J.; *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, no. 10, p. 1771–1775, 2007b. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.005>.

CÂMARA, F. P.; A Pandemia Esquecida; A cólera no Brasil. **International Journal of**

Psychiatry Maio de 2020 – Vol. 25 – Nº 5 2020 Disponível em:
<<https://www.polbr.med.br/2020/05/01/a-pandemia-esquecida-a-colera-no-brasil/>> Acesso em 17 de Agosto de 2022

CHAUDHURI, K.; CHATTERJEE, S. N.; An Introduction to Cholera: epidemics and pandemics. In: CHAUDHURI, Keya. **Cholera Toxins**. Bidhan Nagar: Springer, 2009. Cap. 1. p. 14-15. https://doi.org/10.1007/978-3-540-88452-1_1

CLEMENS, J. D.; G. BALAKRISH NAIR; AHMED, T.; QADRI, F.; HOLMGREN, J. Cholera. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1539–1549, 2017. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30559-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30559-7)

COOPER, D. B. The new “Black death”: Cholera in brazil, 1855-1856. **Social Science History**, v. 10, n. 4, p. 467–488, 1986. <https://doi.org/10.1017/S0145553200015583>

DABOUL, J.; WEGHORST, L.; DEANGELIS, C.; et al. Characterization of *Vibrio cholerae* isolates from freshwater sources in northwest Ohio. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0238438, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238438>

DEEN, J.; MENGEL, M. A.; CLEMENS, J. D. Epidemiology of cholera. **Vaccine**, v. 38, p. A31–A40, 2020. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.078>.

FONTOURA, D. S.; ANGERAMI, R. N.; OLIVEIRA, F.; et al. Relato de caso: Bacteremia por *Vibrio cholerae* não o1, não o139 em paciente com cirrose hepática no hospital de clínicas da universidade estadual de campinas. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 108–109, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.10.207>

FU, K.; LI, J.; WANG, Y.; et al. An Innovative Method for Rapid Identification and Detection of *Vibrio alginolyticus* in Different Infection Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00651>

FU, X.; ZHANG, J.; LI, T.; et al. The outer membrane protein OmpW enhanced *V. cholerae* growth in hypersaline conditions by transporting carnitine. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, 2018. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02703>.

GANIE, H. A.; CHOUDHARY, A.; SOMESH BARANWAL. Structure, regulation, and host interaction of outer membrane protein U (OmpU) of *Vibrio* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 162, 2022. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105267>.

GAO, H.; XU, J.; LU, X.; et al. Expression of hemolysin is regulated under the collective actions of HapR, Fur, and HlyU in *Vibrio cholerae* El Tor serogroup O1. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, 2018. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01310>

GOEL, A. K.; JIANG, S. C. Genetic determinants of virulence, antibiogram and altered biotype among the *Vibrio cholerae* O1 isolates from different cholera outbreaks in India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 814–818, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.022>

KAPER, J. B.; MORRIS, J. G.; LEVINE, M. M. Cholera. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 48–86, 1995. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>

KARUNASAGAR, I.; RIVERA, I.; JOSEPH, B.; et al. ompU genes in non-toxigenic *Vibrio cholerae* associated with aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 338–343, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01984.x>

Kothary MH, Lowman H, McCardell BA, Tall BD. Purification and characterization of enterotoxigenic El tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. **Infection and Immunity**. 2003;71:3213-3220. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3213-3220.2003>

KUMAR, P.; JAIN, M.; GOEL, A. K.; et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 234–238, 2009. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.002089-0>.

LINHARTOVÁ, I.; BUMBA, L.; MAŠÍN, J.; et al. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1076–1112, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x>

MATAMP, N.; BHAT, S. Phage Endolysins as Potential Antimicrobials against Multidrug Resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: Current Status of Research and Challenges Ahead. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 84, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030084>

MARIN, M. F. A. Epidemiologia Genômica de *Vibrio cholerae* da Epidemia de Cólera na América Latina. Rio de Janeiro, 2013. 174 f. **Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) – Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/6982>> Acesso em 17 de Agosto de 2022

MIZUNO, T.; DEBNATH, A.; MIYOSHI, S.-I. **Hemolysin of vibrio species**. M. Blumenberg, M. Shaaban, A. Elgaml (eds.), *Microorganisms*, IntechOpen, London, 2019 <https://doi.org/10.5772/intechopen.88920>

MOACIR G.; LÚCIA, M. Os primeiros cinco anos da sétima pandemia de cólera no Brasil: The first five years. **Informe Epidemiológico do Sus**, v. 8, n. 3, 1999. <http://dx.doi.org/10.5123/S0104-16731999000300003>

NANDI, B; NANDI, R. K.; GHOSE, A. C. **Rapid method for Species-Specific Identification of vibrio cholerae using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW**. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4145-4151.2000>.

OJEDA, A.; CHADI; I KAHWAJI. *Vibrio Cholerae*. **StatPearls. Treasure Island**. 4 jun 2021. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252355>> Acesso em 17 de Agosto de 2022

PEZZOLI, L. Global oral cholera vaccine use, 2013–2018. **Vaccine**, v. 38, p. A132–A140, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.086>.

POPOVIC, T.; BOPP, C.; RJAN OLSVIK; WACHSMUTH, K. **Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for vibrio cholerae 01**. 1993. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.9.2474-2482.1993>

ROSEN, GEORGE. O Industrialismo e o Movimento Sanitário. In: ROSEN, George. **UMA HISTÓRIA DA SAÚDE PÚBLICA**. São Paulo: Unesp, 1994. Cap. 5. p. 168-170.

SACK, D. A.; R BRADLEY SACK; G BALAKRISH NAIR; SIDDIQUE, A. Cholera. **The Lancet**, v. 363, n. 9404, p. 223–233, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15328-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15328-7)

SANTOS, A.C. Um século de cólera: itinerário do medo. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 4, n. 1, p. 79–110, 1994. <https://doi.org/10.1590/S0103-73311994000100005>

SHARMA, A.; ANIMESH NAVIN CHATURVEDI. Prevalence of virulence genes (*ctxA*, *stn*, *OmpW* and *tcpA*) among non-O1 *Vibrio cholerae* isolated from fresh water environment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 209, n. 6, p. 521–526, 2006. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.06.005>

SILVA, CARLOS LEONARDO BAHIANSE DA. Doutores e canhões: o corpo de saúde do Exército Brasileiro na Guerra do Paraguai (1864-1870). **Tese (Doutorado em História das Ciências e da Saúde)** - Casa de Oswaldo Cruz / Fiocruz, Rio de Janeiro, 2012. 359 f. Disponível em <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/17803>> Acesso em 17 de Agosto de 2022

SOMBOONWIT, C; MENEZES, L. J.; HOLT, D. A.; SINNOTT, J. T.; SHAPSHAK, P. Current views and challenges on clinical cholera. **Bioinformation**, v. 13, n. 12, p. 405–409, 2017. <https://doi.org/10.6026/97320630013405>

SOUSA, O. V.; MACRAE, A.; MENEZES, F. G. R.; et al. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1725–1734, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.07.006>

UBERLÂNDIA, Prefeitura de: **Estação de Tratamento de Esgoto Uberabinha passará por reforma e ampliação**. 15 de Dez 2020. Disponível em: <<https://www.uberlandia.mg.gov.br/2020/12/15/estacao-de-tratamento-de-esgoto-uberabinha-passara-por-reforma-e-ampliacao/>>. Acesso em 17 de Agosto de 2022

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION; **HAITI Disease Outbreak News**. 26 out 2010. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2010_10_26-en> .

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Cholera**. 6 fev 2021 Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cholera>> Acesso em 17 de Agosto de 2022