



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Everaldo de Santana Silva

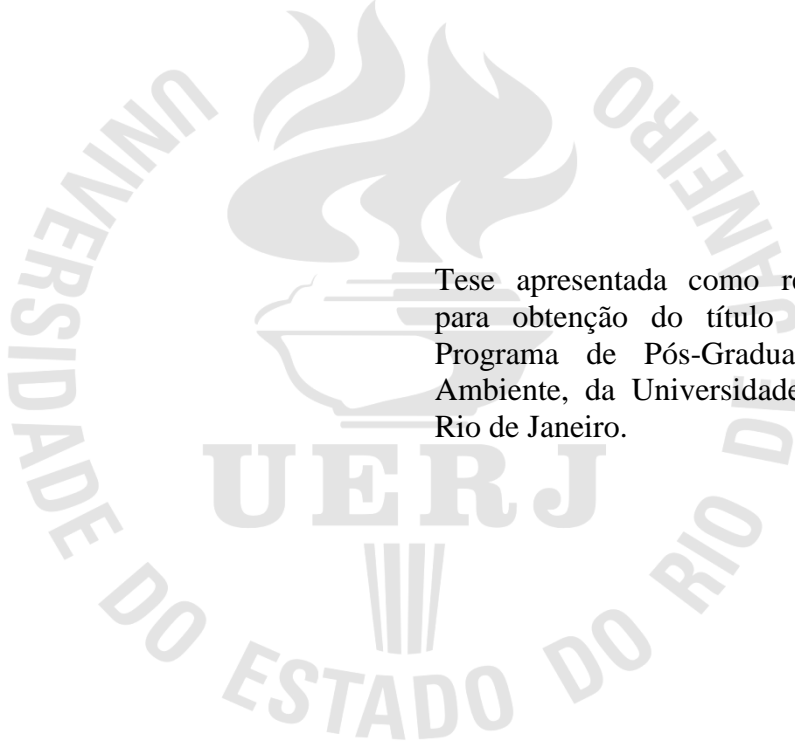
**Proposta e análise metodológica para verificação do Padrão D-2 da
Convenção BWM (IMO, 2004) referente ao *V. cholerae* O1 e O139: estudo
de caso no porto da Cidade do Rio de Janeiro (Brasil)**

Rio de Janeiro

2020

Everaldo de Santana Silva

Proposta e análise metodológica para verificação do Padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004) referente ao *V. cholerae* O1 e O139: estudo de caso no porto da Cidade do Rio de Janeiro (Brasil)



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio dos Santos Fernandez

Coorientador: Prof. Dr. Renato Geraldo da Silva Filho

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S586

Silva, Everaldo de Santana.

Proposta e análise metodológica para verificação do Padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004) referente ao *V. cholerae O1* e *O139*: estudo de caso no porto da Cidade do Rio de Janeiro (Brasil) / Everaldo de Santana Silva – 2020.

193 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio dos Santos Fernandez.

Coorientador: Renato Geraldo da Silva Filho.

Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

1. Água de lastro – Rio de Janeiro, Porto do (Rio de Janeiro, RJ) - Teses. 2. *Vibrio cholerae* - Rio de Janeiro, Porto do (Rio de Janeiro, RJ) - Teses. 3. Meio ambiente – Contaminação – Teses. I. Fernandez, Marcos Antonio dos Santos. II. Silva Filho, Renato Geraldo da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 574.9(815.3)

Patricia Bello Meijinhos CRB-7/ 5217- Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte

Everaldo de Santana Silva

Data

Everaldo de Santana Silva

Proposta e análise metodológica para verificação do Padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004) referente ao *V. cholerae* O1 e O139: estudo de caso no porto da Cidade do Rio de Janeiro (Brasil)

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 31 de Março de 2020.

Orientadores:

Prof. Dr. Marcos Antonio dos Santos Fernandez
Faculdade de Oceanografia - UERJ

Prof. Dr. Renato Geraldo da Silva Filho
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Maria Cecília Trindade de Castro
Diretoria de Portos e Costas (DPC) - Marinha do Brasil

Lohrengrin Dias de Almeida Fernandes
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)
Marinha do Brasil

Floriano Carlos Martins Pires Júnior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Renata Cristina Picão
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Reinaldo Souza dos Santos
Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2020

DEDICATÓRIA

À Professora Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos e amados pais, que me ensinaram desde os mais tenros anos da minha vida, a ser um cidadão benevolente, respeitoso e, acima de tudo, um determinado em busca dos meus sonhos e objetivos, dando alicerce fundamental a minha jornada. Junto a eles, faço menção aos meus vários filhos de 4 patas, vivos e que já se foram, que me encheram de pelos e muita alegria durante estes 5 anos de muito trabalho.

Um enorme beijo no coração da minha eterna parceira de dança Pâmela Fernandes, que me ajudou a desestressar com seus giros e rodopios sempre com um alegre sorriso, além de ser uma mulher e companheira ímpar em toda minha vida.

Um total carinho e agradecimento ao meu orientador Marcos Fernandez (FAOC UERJ), o qual, acima de tudo, tornou-se um amigo nesta jornada e ao meu coorientador Renato Filho (UNIRIO) pela paciência, parcimônia e compreensão.

Meu reconhecimento e obrigado a toda minha equipe do LABTOX UERJ, especialmente a Deloar Duda e todos os estagiários que ajudaram de forma concreta: Amanda Lopes, Sidharta Soares, Bárbara Costa, Lucas Swan, Eduarda Borba, Matheus Ventura e Vanessa Marks, assim como os amigos oriundos do mestrado Nádia Catalina e Flávio Cardoso (USP).

Agradecimento a todos meus colegas da turma 2015.1 do PPGMA/UERJ de e todos os outros, de outras turmas, com que tive contato no meu trilhar, assim como um especial reverenciamento a todos os professores que passaram na minha vida e deixaram comigo uma marca. Um especial agradecimento à Prof.^a Rosa Formiga e Elza Nefta e – claro - às secretárias Daniele e Jenifer do Programa. Aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação: Antonio Henrique Almeida de Moraes (IOC IOCRUZ) e Reinaldo Souza dos Santos (ENSP/FIOCRUZ) e aos membros da minha Banca de Defesa: Lohrengin Dias de Almeida Fernandes (IEAPM), Maria Cecília Trindade de Castro (Marinha do Brasil), Floriano Carlos Martins Pires Júnior (UFRJ), Renata Cristina Picão (UFRJ) e Reinaldo Souza dos Santos (ENSP/FIOCRUZ).

Gratidão aos parceiros construídos ao longo do projeto: Leonarndo Daemon, André Leone, Bárbara de Souza Cassiano, Wanderson Nicácio do Nascimento e Uelidelton da Rocha (INEA), Mestre Canarinho (traineira utilizada para amostragens), Altevir Caron (Porto de Itajáí-SC); Alexandre Leal Neto (Docas RJ), Viviane Zahner (IOC/FIOCRUZ), Flávio Costa Fernandes (IEAPM), Andressa Delbons e Ana Carolina Debelian (UNIRIO) e os Comandantes de Mar e Guerra da capitania dos portos Salles e Dondeo.

“An intelligent person solves a problem, a wise man prevents it.”

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, Everaldo de Santana. **Proposta e análise metodológica para verificação do Padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004) referente ao *V. cholerae* O1 e O139**: estudo de caso no porto da Cidade do Rio de Janeiro (Brasil). 2020. 193f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O processo atual de globalização impulsiona a movimentação marítima em todo mundo que, atualmente, responde por cerca de 90% de todas as trocas comerciais entre países, incrementando assim o volume de água de lastro movimentado e, conseqüentemente, o risco de bioinvasões. Entre todas as espécies presentes neste contexto, esse trabalho é direcionado ao *Vibrio cholerae* toxigênico (sorogrupos O1 e O139) causador da Cólera: doença entérica caracterizada por acentuado quadro de diarreia, que tem uma íntima relação com as condições ambientais, principalmente o saneamento básico. Entre os anos de 2000 a 2017, foram registrados cerca de 4,7 milhões de casos da doença (com aproximadamente 71 mil óbitos) sendo 81% destas ocorrentes na região áfrico-asiática. O tratamento é realizado por hidratação, antibióticos e em alguns casos vacinação. Entretanto, resistência bacteriana à medicação tem sido evidenciada, em função do processo de transferência genética horizontal. A convenção BWM (IMO, 2004) na sua regra D-2 (*Ballast Water Performance Standard*) estabelece o vibrio colérico toxigênico como um dos principais bioindicadores padronizados para o controle de qualidade dos sistemas de tratamentos de água de lastro a bordo. Desta forma, em função do intenso fluxo marítimo, a construção de uma metodologia que aponte possíveis “embarcações alvos” para verificação da conformidade do padrão D-2 é um importante desafio. Este trabalho tem como objetivo elaborar, testar e analisar uma proposta metodológica inicial para prevenção de introdução do *Vibrio cholerae* toxigênico em águas nacionais por descarga de água de lastro, em consonância com o padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004), no tocante à especificidade das embarcações a serem amostradas, tendo como estudo de caso o Porto da Cidade do Rio de Janeiro. A metodologia foi balizada na resposta a três perguntas norteadoras: (i) se a região de descarga é vulnerável à introdução do vibrio colérico toxigênico; (ii) se alguma embarcação visitante possui risco de introduzir o vibrio colérico toxigênico por água de lastro e (iii) se os lastros das embarcações visitantes, assim como o local de estudo, têm ocorrência do vibrio colérico toxigênico. Os resultados detectados pelo protocolo estabelecido conseguiram priorizar os “navios alvos” para inspeção com uma redução de mais 90% de todas as embarcações monitoradas, com visitas ao porto de estudo, no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2018 (25 meses). Todo protocolo utilizado foi analisado e melhorias e aprimoramentos são sugeridas na conclusão deste trabalho. O protocolo adotado se mostrou bastante promissor, com boas perspectivas de aperfeiçoamentos e aplicação em outros portos nacionais no que se refere à verificação do cumprimento do padrão D-2 na questão do *V. cholerae* toxigênico.

Palavras-Chaves: Cólera. *Vibrio cholerae*. Água de Lastro. Porto do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

SILVA, Everaldo de Santana. **Analisis and Proposal metodologic for verification of standard D-2 of Convention BWM (IMO, 2004) referred the *V. cholerae* O1 and O139: study of case in the port of city of Rio de Janeiro (Brazil).** 2020. 193f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The current globalization process drives maritime movement worldwide, which currently accounts for about 90% of all trade between countries, increasing the volume of ballast water handled and consequently, the risk of bioinvasions. Among all the species present in this context, this work is focused on the toxigenic *Vibrio cholerae* (serogroups O1 and O139) that causes Cholera: an enteric disease characterized by a marked diarrhea that is closely related to environmental conditions, especially basic sanitation. between 2000 and 2017, about 4.7 million cases of the disease were registered (with approximately 71 thousand deaths) and 81% of them occurred in the African-Asian region. Treatment is carried out by hydration, antibiotics and in some cases vaccination. However, bacterial resistance to medication has been evidenced because of the horizontal gene transfer process. The BWM convention (IMO, 2004) in its D-2 rule (Ballast Water Performance Standard) establishes toxigenic *vibrio cholerae* as one of the main standardized bioindicators for the quality control of ballast water treatment systems on board. Thus, because of the intense maritime flow, the construction of a methodology that points out possible “target vessels” to verify the compliance of the D-2 standard is an important challenge. This work aims to elaborate, test and analyze an initial methodological proposal to prevent the introduction of toxigenic *Vibrio cholerae* in national waters by ballast water discharge, according to the D-2 standard of the BWM Convention (IMO, 2004) regarding to the specificity of the vessels to be sampled, taking the Port of the City of Rio de Janeiro as a case study. The methodology was based on the answers to three guiding questions: (i) whether the discharge region is vulnerable to the introduction of toxigenic *Vibrio cholerae*; (ii) whether any visiting vessel has the risk of introducing toxigenic vibrio by ballast water and (iii) whether the ballast of visiting vessels has toxigenic *V.c.* as well as the study site. The results detected by the established protocol were able to prioritize the “target ships” for inspection with a reduction of over 90% of all monitored vessels, with visits to the port of study from January 2016 to January 2018 (25 months). Every protocol used was analyzed and improvements are suggested in the conclusion of this work. The adopted protocol indicated to be very promising, with good perspectives for improvements and application in other national ports regarding the verification of compliance with the D-2 standard in the issue of toxigenic *V. cholerae*.

Keywords: Cholera. *Vibrio cholerae*. Ballast Water. Port of Rio de Janeiro.

RESUMEN

SILVA, Everaldo de Santana. **Propuesta metodológica y análisis para verificación de la norma D-2 del Convenio BWM (IMO, 2004) referente *V. cholerae* O1 y O139:** estudio de caso del puerto de la ciudad de Río de Janeiro (Brasil). 2020. 193f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

El actual proceso de globalización impulsa el movimiento marítimo en todo el mundo, que actualmente representa aproximadamente 90% de todo el comercio entre países, lo que aumenta el volumen de agua de lastre manipulada y, en consecuencia, el riesgo de bioinvasión. Entre todas las especies presentes en este contexto, este trabajo está dirigido al *Vibrio cholerae* toxigénico (serogrupos O1 y O139) que causa el cólera: una enfermedad entérica caracterizada por una diarrea marcada, que está estrechamente relacionada con las condiciones ambientales, especialmente el saneamiento básico. Entre 2000 y 2017, se registraron alrededor de 4,7 millones de casos de la enfermedad (con aproximadamente 71 mil muertes), el 81% de los cuales ocurrieron en la región de Asia y África. El tratamiento se lleva a cabo mediante hidratación, antibióticos y, en algunos casos, vacunación. Sin embargo, se ha evidenciado resistencia bacteriana a la medicación, debido al proceso de transferencia horizontal de genes. La convención BWM (IMO, 2004) en su regla D-2 (*Ballast Water Performance Standard*) establece el vibrio de colesterol toxigénico como uno de los principales bioindicadores estandarizados para el control de calidad de los sistemas de tratamiento de agua de lastre a bordo. Por lo tanto, debido al intenso flujo marítimo, la construcción de una metodología que señala posibles "buques objetivo" para verificar el cumplimiento de la norma D-2 es un desafío importante. Este trabajo tiene como objetivo elaborar, probar y analizar una propuesta metodológica inicial para prevenir la introducción de *Vibrio cholerae* toxigénico en aguas nacionales por descarga de agua de lastre, en línea con el estándar D-2 del Convenio BWM (OMI, 2004), en relación con la especificidad de los buques a muestrear, tomando como caso de estudio el Puerto de la Ciudad de Río de Janeiro. La metodología se basó en la respuesta a tres preguntas orientadoras: (i) si la región de descarga es vulnerable a la introducción de *Vibrio cholerae* toxigénico; (ii) si algún buque visitante está en riesgo de introducir vibrio toxigénico por el agua de lastre y (iii) si el lastre del buque visitante, así como el sitio del estudio, tiene *V.c.* toxigénico. Los resultados " para inspección con una reducción de más del 90% de todos los buques monitoreados, con visitas detectados por el protocolo establecido pudieron priorizar los "buques objetivo al puerto de estudio, en el período de enero de 2016 a enero de 2018 (25 meses). Se analizaron todos los protocolos utilizados y se sugieren mejoras y perfeccionamientos al final de este trabajo. El protocolo adoptado demostró ser muy prometedor, con buenas perspectivas de mejoras y aplicación en otros puertos nacionales con respecto a la verificación del cumplimiento del estándar D-2 en el tema de *V. cholerae* toxigénico.

Palabras claves: Cólera. *Vibrio cholerae*. Agua de Lastre. Puerto de Rio de Janeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Trajetórias de todos os navios de carga maior do que 10.000 GigaTonelada em 2007. A escala de cores indica o número de viagens ao longo de cada rota e lista de classificação dos 20 portos mais centrais	29
Figura 2 -	Evolução do total de alguns tipos de cargas transportadas, em milhões de toneladas, por via marítima (1980 - 2017)	31
Figura 3 -	Transporte marítimo por região (2017): Percentagem de participação na tonelagem mundial	31
Figura 4 -	Projeção de Movimentação de Carga no Brasil até 2030 (por natureza de carga)	32
Figura 5 -	Principais destinos das exportações brasileiras (3º trimestre de 2017)	33
Figura 6 -	Principais origens das importações brasileiras (3º trimestre de 2017)	33
Figura 7 -	Localização do Porto da Cidade do Rio de Janeiro	35
Figura 8 -	Zoneamento do Porto do Rio de Janeiro	36
Figura 9 -	Esquema explicativo do processo de lastragem e deslastragem de navios	38
Figura 10 -	Esquema de tanque de lastro de navio graneleiro	39
Figura 11 -	Medidas de tratamento de água de lastro a bordo	46
Figura 12 -	Comparação de prós e contras dos principais sistemas de tratamento utilizados	47
Figura 13 -	Micrografia eletrônica de varredura de <i>Vibrio cholerae</i>	51
Figura 14 -	Classificação do <i>V. cholerae</i>	53
Figura 15 -	Mecanismo de ação da toxina colérica	56
Figura 16 -	Perfil de genes associadas à virulência em <i>V. cholerae</i> encontrado em estudo de Siriphap <i>et al.</i> , (2017)	59
Figura 17 -	Pandemias de Cólera	63
Figura 18 -	Morbidade mundial da Cólera entre 2000 e 2017	66
Figura 19 -	Porcentagem da distribuição de indivíduos infectados com o biótipo <i>Clássico</i> em comparação com o <i>El Tor</i>	79
Figura 20 -	Proposta metodológica do estudo	90
Figura 21 -	Pontos de monitoramento da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro)	91
Figura 22 -	Registros fotográficos dos pontos de monitoramento (tiradas em 29.06.2016)	92
Figura 23 -	“Rinsagem” da amostra para posterior coleta	99
Figura 24 -	Vista interna de um tanque de lastro com abertura para outro nível do tanque do Navio teste	100
Figura 25 -	Bomba adaptada de captação de amostra de lastro	101
Figura 26 -	Processamento das amostras de água, superficiais e de tanques de lastro, nas análises microbiológicas	102

Figura 27 -	Processo de filtração de amostras	103
Figura 28 -	Colônias presuntivas (amarelas) de <i>V. cholerae</i> em Ágar TCBS	105
Figura 29 -	Fluxograma de decisão dos Testes de triagem e Provas bioquímicas de identificação dos isolados bacterianos	108
Figura 30 -	Reações típicas de <i>V. cholerae</i> nos testes de triagem e provas bioquímicas	110
Figura 31 -	Comparação da variação de temperatura (°C) detectada no sítio de estudo pelas campanhas de monitoramento com as citadas nas referências selecionadas	120
Figura 32 -	Comparação da variação de pH detectada no sítio de estudo pelas campanhas de monitoramento com as citadas nas referências selecionadas	121
Figura 33 -	Comparação da variação de salinidade detectada no sítio de estudo pelas campanhas de monitoramento com as citadas nas referências selecionadas	122
Figura 34 -	Incidência Mundial acumulada de Cólera entre os anos 2013 a 2017	123
Figura 35 -	Total de Incidência de Cólera (por Continente): 2013 a 2017	124
Figura 36 -	Vinte países com maiores incidências acumuladas: 2013 a 2017	124
Figura 37 -	Mapa de incidência de Cólera entre os anos de 2013 a 2017	125
Figura 38 -	Evolução de acesso ao saneamento entre os anos de 2013 a 2017 (Global).	126
Figura 39 -	Evolução de acesso ao saneamento por continente (2013 a 2017)	126
Figura 40 -	Países com acesso ao saneamento inferior a 30% (2013 a 2017)	127
Figura 41 -	Exemplos de agravos à saúde humana e alguns fatores de contribuição antrópicas de emergência	133
Figura 42	Movimentação mensal de embarcações no porto da cidade do Rio de Janeiro no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2018	134
Figura 43	Movimentação, por origem, do porto do Rio de Janeiro e Incidência de Cólera (2016-2017)	135
Figura 44	Exemplo de erro detectado na ferramenta de AIS utilizada como apoio ao monitoramento	137
Figura 45	Suspiro de captação de amostra em Navio 2	140
Figura 46 -	Novo desenho metodológico sugerido para o desenvolvimento do estudo	147
Figura 47 -	Esquema de interação e controle de manobras de lastro sugerido via <i>Automatic Identification System</i>	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dez maiores portos brasileiros em movimentação de cargas entre o 3º trimestre de 2016 e o 3º trimestre de 2017	33
Tabela 2 -	Zoneamento do Porto do Rio de Janeiro	36
Tabela 3 -	Casos confirmados de Cólera por região do Brasil (1996 - 2005)	65
Tabela 4 -	Casos de Cólera na América Norte e Central entre 2010 e 2016	68
Tabela 5 -	Ocorrência da presença do <i>V.cholerae</i> em diversos pescados	75
Tabela 6 -	Coordenadas dos pontos de monitoramento na Baía de Guanabara (RJ/Brasil)	91
Tabela 7 -	Cálculo de Indicador de Incidência de Cólera (IIC)	94
Tabela 8 -	Cálculo de Indicador de Saneamento Básico (ISB)	95
Tabela 9 -	Graus de risco e alerta de acordo com o Risco da Origem de cada Embarcação (RO)	96
Tabela 10 -	Oligonucleotídeos iniciadores, temperaturas de anelamento e produtos amplificados nas reações de PCR simples	113
Tabela 11 -	Natureza da amostra, sorogrupos, faixa de pH, salinidade, temperatura e descrição dos artigos selecionados	116
Tabela 12 -	Faixas de variação de temperatura (°C) citadas nas referências selecionadas	118
Tabela 13 -	Faixas de variação do pH citadas nas referências selecionadas	118
Tabela 14 -	Faixas de variações de salinidade citadas nas referências selecionadas	119
Tabela 15 -	Relação de Países por risco detectado	128
Tabela 16 -	Percentuais de risco/países por continente	131
Tabela 17 -	Padrões físico-químicos e resultados da análise microbiológica detectada a partir da coleta do local de estudo (Baía de Guanabara/RJ) ...	136
Tabela 18 -	Parâmetros físico-químicos e resultados da análise microbiológica a partir da coleta de lastro diretamente nas embarcações	140

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Genes associados à patogenicidade e sua localização no genoma de <i>V. cholerae</i>	58
Quadro 2 -	Genes de susceptibilidade/resistência a antibióticos que codificam a função de resistência e elementos genéticos portadores dos genes de resistência em <i>V. cholerae</i>	84
Quadro 3 -	Características diferenciais de <i>V. cholerae</i> e outras bactérias do ambiente marinho nos testes de crescimento em Ágar Nutriente 0% de NaCl, Teste da Oxidase, <i>String Test</i> , Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ace</i>	<i>Accessory cholera enterotoxin</i>
Ágar TCBS	Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
AN0	Ágar Nutriente 0% de NaCl
ANTAQ	Agência Nacional de Transporte Aquaviários
APA	Água Peptonada Alcalina
BHI	Infusão de Cérebro e Coração Bovino
BHI-Glicerol	Infusão de Cérebro e Coração Bovino + glicerol
BVS	Biblioteca Virtual de Saúde
BWM	Convenção <i>International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments</i>
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CMRVS	Coleção de Micro-Organismos de Referência em Vigilância em Saúde
CT	<i>Cholera Toxin</i>
EPS	<i>Extracellular Protein Secretion</i>
GEF	Fundo para o Meio Ambiente Global
GLOBALLAST	Programa Global de Gerenciamento de Água de Lastro
HGT	Transferência horizontal de genes
<i>hly</i>	Hemolisina.
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICE	Elementos conjugativos integrantes
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
<i>igG</i>	Imunoglobulina G
IIC	Indicador de Incidência de Cólera
IMGE	Plasmídeos auto-transmissíveis e de replicação autônoma
IMO	<i>International Marine Organization</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPC	Indicador País Contratante
IS	Sequências de inserção
ISB	Indicador Acesso ao Saneamento

LIA	Agar Lisina Ferro
LPS	Lipopolissacarídeo
MARPOL 73/38	Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios
MDR	<i>MultiDrug Resistant</i>
MEPC	Comitê de Proteção ao Meio Ambiente Marinho
N1	Navio 1
N2	Navio 2
NORMAM-20	Norma de Autoridade Marítima para Gerenciamento de Água de Lastro de Navios
NT	Navio Teste
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	<i>United Nations Organization</i>
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
RO	Risco Origem
<i>sIgA</i>	Imunoglobulina A secretora
TCP	<i>Toxin Coregulated Pilus</i>
TDF	Tanques de duplo fundo
TI	Total de Incidência de Cólera
TSA	Ágar Soja Trypticaseína
TSB	Caldo Soja Trypticaseina
TSI	Agar Tríplice Açúcar Ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNCLOS	Convenção Internacional das Nações Unidas sobre o Direito do Mar
VBNC	<i>Viable But Non-Culturable</i>
VC	<i>Viable and Culturable</i>
VPI	<i>Vibrio Pathogenicity Island</i>
XDR	<i>Extensive Drug Resistant</i>
<i>zot</i>	<i>Zonula occludens toxin</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	NAVEGAR É PRECISO: SOBRE A NAVEGAÇÃO	25
1.1	Um breve histórico da navegação	25
1.2	As embarcações e suas particularidades	27
1.3	A movimentação marítima	28
1.4	A dinâmica portuária	34
1.5	O Porto da Cidade do Rio de Janeiro	34
1.6	A água de lastro	38
1.7	Legislação e ações sobre gerenciamento de água de lastro	42
1.8	Gestão de água de lastro a bordo	46
2	O FLAGELO: A CÓLERA	49
2.1	Análise etimológica do termo “Cólera”	50
2.2	Etiologia da Cólera	50
2.3	Fatores ligados à virulência do <i>Vibrio cholerae</i>	54
2.3.1	<u>A toxina colérica (CT) e o elemento CTX</u>	54
2.3.2	<u><i>Pilus</i> corregulador de toxina (TCP) e a ilha de patogenicidade (VPI)</u>	56
2.3.3	<u>Outros genes associados à patogenicidade do <i>V. cholerae</i></u>	57
2.3.4	<u>Transferência gênica horizontal do <i>Vibrio cholerae</i></u>	60
2.4	Histórico da Cólera	60
2.4.1	<u><i>Status quo</i></u>	65
2.5	Aspectos epidemiológicos da Cólera	68
2.5.1	<u>Transmissão da doença</u>	71
2.5.2	<u>Associações ecológicas do vibrio colérico</u>	74
2.5.3	<u>Determinantes socioambientais</u>	76
2.6	Patogenia e quadro clínico da Cólera	78
2.7	Identificação de casos suspeitos e diagnóstico da Cólera	81
2.8	Tratamento da doença	82
2.8.1	Resistência antibiótica	82
2.9	Profilaxia da Cólera	85
3	OBJETIVOS	87
4	JUSTIFICATIVA	88
5	METODOLOGIA	89
5.1	Pergunta 1: A região de descarga é vulnerável à introdução do vibrio colérico toxigênico?	89
5.2	Pergunta 2: Alguma embarcação visitante possui risco de introduzir o vibrio colérico toxigênico por água de lastro?	93
5.2.1	<u>Indicador de Incidência de Cólera (IIC)</u>	93
5.2.2	<u>Indicador Saneamento Básico (ISB)</u>	94

5.2.3	<u>Indicador de País Contratante (IPC)</u>	95
5.2.4	<u>Determinação do Risco Origem de cada embarcação (RO)</u>	96
5.2.5	<u>Monitoramento de embarcações visitantes para seleção de alvos</u>	96
5.3	Pergunta 3: Os lastros das embarcações visitantes, assim como o local de estudo, têm ocorrência do vibrio colérico toxigênico?	97
5.3.1	<u>Coleta de amostras de águas superficiais portuárias</u>	97
5.3.2	<u>Amostragem de tanques de lastro</u>	98
5.3.3	<u>Processamento das amostras de água para análise microbiológica</u>	101
5.3.3.1	Filtração das amostras	102
5.3.3.2	Enriquecimento do filtrado	103
5.3.3.3	Amostras controles	104
5.3.3.4	Isolamento das amostras bacterianas	104
5.3.3.5	Repique das colônias suspeitas isoladas em Ágar TCBS	105
5.3.3.6	Armazenamento dos isolados bacterianos	106
5.3.3.7	Rotinas de identificação dos isolados bacterianos	106
5.3.3.8	Testes de triagem e provas bioquímicas	107
5.3.3.9	Caracterização molecular por PCR simples dos isolados bacterianos	111
5.3.3.10	Identificação molecular da espécie <i>Vibrio cholerae</i>	113
5.3.3.11	Determinação do sorogrupo O1 e O139 das amostras de <i>V. cholerae</i>	114
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
6.1	Pergunta 1: A região de descarga é vulnerável à introdução do vibrio colérico toxigênico?	115
6.2	Pergunta 2: Alguma embarcação visitante pode introduzir o vibrio colérico toxigênico por água de lastro?	122
6.3	Pergunta 3: Os lastros das embarcações visitantes, assim como o local de estudo, têm ocorrência do vibrio colérico toxigênico?	135
6.3.1	<u>Amostragem do sítio de estudo (Baía de Guanabara/RJ)</u>	135
6.3.2	<u>Amostragem de tanques de lastro</u>	136
	CONSIDERAÇÕES E RECOMENDAÇÕES FINAIS	142
	REFERÊNCIAS	152
	APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo	177
	APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (RO)	185

INTRODUÇÃO

Dos 509 milhões de quilômetros quadrados da Terra, 361 milhões são recobertos de água, sendo que boa parte desta porção da hidrosfera se apresenta navegável (SCHMIEGELOW, 2004).

Desde as primeiras embarcações a remo até os gigantes graneleiros atuais, a navegação acompanhou e forjou o desenvolvimento humano, facilitando a comunicação entre povos e a evolução da ciência (IMO, 2016).

Vivemos atualmente em uma era de interdependência global sem precedentes, na qual as fronteiras entre os países representam barreiras pouco importantes nas trocas comerciais entre as nações, e o atual processo de globalização não seria possível sem a participação da indústria naval. Sem este modal, o comércio intercontinental, o transporte a granel de matérias-primas, importação/exportação de alimentos e produtos manufaturados a preços acessíveis simplesmente não seria possível (IMO, 2012).

A navegação atualmente responde por cerca de 90% de todo intercâmbio comercial mundial, com movimentação em torno de 600 milhões de toneladas/ano (EUROPEAN BANK, 2014; IMO, 2016) e com uma previsão de crescimento de cerca de 150% deste modal até 2030 somente em território brasileiro (ANTAQ, 2018a).

Atualmente o comércio marítimo conta com complexas e intensas rotas comerciais em todo o mundo, servidas por aproximadamente 74.000 embarcações registradas em dinâmica de mar aberto (IMO, 2018), criando assim inúmeras e intrínsecas redes comerciais marítimas em todo o mundo (KALUZA *et al.* 2010).

O processo de globalização acaba por gerar novas e intensas demandas colocadas sobre os portos, que se tornaram elos de imensas cadeias logísticas que interagem em um intenso fluxo de comércio entre diferentes regiões, acarretando uma geração de influências maiores que a própria extensão portuária (MONIÉ; VIDAL, 2006).

No ano de 2018, as instalações portuárias brasileiras registaram uma movimentação de cerca de 1,1 bilhões de toneladas (aumento de 3,6% em comparação com 2017), sendo 825 milhões destas de longo curso, 163 milhões de cabotagem e 38 milhões de vias interiores, com aproximadamente 64 mil atracões.

Neste mesmo período, o porto do Rio de Janeiro teve, aproximadamente, 30 milhões de toneladas movimentadas, quando 15.727 milhões de toneladas foram de navegação de

cabotagem e 13.547 milhões de toneladas de longo curso (ANTAQa, 2019). Nesse mesmo ano, o porto da cidade do Rio de Janeiro realizou uma movimentação de aproximadamente 6 milhões de toneladas, com cerca de 2.600 embarcações visitantes, sendo aproximadamente 91% delas de longo curso (ANTAQ, 2018a).

Desde a segunda metade do século XX, a poluição dos oceanos tem sido incrementada pelas tecnologias usadas no modal marítimo (CAMANHO, 2007) e, com o atual aumento da frota, a navegação passou a ter papel importante no processo de poluição ambiental, seja pela produção de resíduos de carga, no incremento dos gases de efeito estufa, no lançamento de esgoto na água e na introdução de espécies invasoras por bioincrustação nos cascos ou por água de lastro (PEREIRA, 2012).

A dinâmica da navegação também exerce intensa pressão sobre a biota mundial, em que destacamos a ocasionada por compostos químicos utilizados nos sistemas anti-incrustantes, os chamados “*antifoulings*” (FERNANDEZ-ALBA *et al.*, 2002; GATIDOU *et al.*, 2007).

Estes passivos também possuem uma correlação direta com fatores de desenvolvimento socioeconômico, de modo que as regiões portuárias se revelam como as áreas vulneráveis com quadros de degradação acelerada, em geral agravados pelo recebimento de grandes cargas de efluentes urbanos (SILVA *et al.*, 2015).

A preocupação deste trabalho, no que se refere aos impactos ambientais causados pela dinâmica da navegação, foca na introdução de espécies carregadas por água de lastro, o que pode ocasionar um cenário de bioinvasão.

O cenário globalizado contemporâneo vem contribuindo de forma significativa para o aumento da movimentação marítima e, com isso, para a aceleração do processo de bioinvasão em todo o mundo oriunda deste modal (SEEBENS *et al.*, 2013).

O local de introdução de uma espécie invasora pode apresentar condições ambientais favoráveis à sobrevivência do organismo introduzido, sendo estes assim considerados poluentes biológicos (VILLAC *et al.*, 2008). Estas podem, dessa forma, gerar impactos em atividades econômicas, causando danos à atividade pesqueira, riscos sanitários, perda de espécies nativas, prejuízos em atividades agrícolas e impactos diretos e indiretos à saúde humana, entre outros (ZILLER; ZALBA, 2007).

As espécies exóticas invasoras contribuem diretamente para o processo de extinção de animais e vegetais autóctones, criando assim uma nova frente de custos para recuperação e

prevenção dos ambientes afetados, o que tem impactos na economia mundial de forma significativa (BRASIL, 2006).

Milhares de espécies marinhas invasoras podem ser transportadas por água de lastro, desde que sejam suficientemente pequenas para passarem pelas entradas das bombas de captação, e entre elas estão os organismos patogênicos à saúde humana como as bactérias (SATIR, 2014). Estes microrganismos representam uma grande preocupação, devido ao seu tamanho, taxa reprodutiva e alta densidade populacional (KIM *et al.*, 2015; STARLIPER *et al.*, 2015), além da alta resiliência em ambientes confinados como os tanques de água de lastro (RAMAIAH *et al.*, 2005).

A *International Marine Organization* (IMO) adotou, no ano de 2004, a *International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments* (BWM) (IMO,2004); que indica medidas de prevenção e salvaguarda da saúde ambiental e humana, na tentativa de prevenir, minimizar e, por fim - se possível - eliminar os riscos da introdução de organismos aquáticos nocivos e agentes patogênicos existentes na água de lastro dos navios que entram nos portos (IMO, 2016). Sua vigência foi estabelecida doze meses após sua ratificação, por, pelo menos, trinta países signatários, desde que esses países representassem cerca de 35% de toda a frota mercante em funcionamento. Desta forma, em oito de setembro de 2016, com a adesão da Finlândia, esse quantitativo foi alcançado e o prazo de 12 meses para efetividade se iniciou (IMO, 2018), tendo a convenção entrada em vigor em 08 de setembro de 2017.

“§ Um navio sujeito a esta Convenção poderá, em qualquer porto ou terminal de alto mar de outra Parte, estar sujeito à inspeção por funcionários devidamente autorizados por essa Parte com a finalidade de determinar se o navio está em conformidade com esta Convenção.” (IMO, 2018, artigo 9, parágrafo 1, p.5).

Essa determinação fala sobre a execução desta amostragem (objeto da G-2 e circulares decorrentes), quando em seu inciso 1.C determina que:

“Uma amostragem da Água de Lastro do navio, realizada conforme as diretrizes a serem desenvolvidas pela Organização (...).” (IMO, 2018, artigo 9, parágrafo 1, inciso c, p.6).

Se a análise apontar, no entanto, não conformidade na amostra do tanque, a mesma legislação, no artigo 10 (Detecção e violações e controle de navios), no inciso 3 dispõe:

“Se a amostragem descrita no Artigo 9.1(c) levar a um resultado ou der suporte a informações recebidas de outro porto ou terminal de alto mar, indicando que o navio representa uma ameaça ao meio ambiente, à saúde pública, às propriedades ou recursos, a Parte em cujas águas o navio está operando deverá proibir tal navio de descarregar Água de Lastro até que a ameaça seja afastada.” (IMO, 2018, artigo 10, parágrafo 3, p.6).

Assim sendo, embora existam diversos processos e equipamentos certificados para o tratamento das águas de lastro de homologação internacionalmente, atualmente, por parte da IMO, existem apenas orientações técnicas, e não a definição clara de padrões de amostragens.

Desta forma, técnicas de amostragem das embarcações a serem inspecionadas pelas autoridades portuárias em todos os países, para uma análise independente desses sistemas, são ainda metodologias não reconhecidas como oficiais, ficando no campo da prática e do ajuste; o presente projeto se encaixa exatamente nessa lacuna.

Com uma frota marítima mundial tão grande e intensa dinâmica de movimentação, o monitoramento da eficiência dos métodos de tratamento se torna um desafio para as autoridades competentes dos países que, em sua maioria, não possuem estrutura nem pessoal para realizar esse processo de forma completa e eficaz. Selecionar um navio para checagem, realizar amostragem e posterior análise requer uma força-tarefa e insumos especializados, já que isso demanda tempo, pessoal e principalmente disponibilidade de acesso aos tanques. Entretanto, com a vigência total da regra D-2, que o padrão estabelecido pela convenção BWM sobre padrões microbiológicos de eficácia das metodologias de tratamento realizado a bordo das embarcações que será descrita a diante, todos os sistemas instalados deverão prover pontos de acesso para tomada de amostras, facilitando todo este processo.

Por se tratar de um processo novo e com complicações legais e de logística, existe uma lacuna na construção de metodologias que se proponham a selecionar navios alvos a serem amostrados neste contexto (BRASIL, 2019).

A abordagem de uma embarcação para eventual amostragem e verificação de conformidades esbarra em aspectos legais e complexos, tais como: (i) número elevado de embarcações mercantes que visitam os portos diariamente e (ii) qualquer metodologia de averiguação deve ser previamente planejada, a fim de minimizar o tempo de ancoragem, para

não reter desnecessariamente as embarcações, como previsto nos textos dos tratados da IMO, visto que esta ação causaria sérios problemas na logística dos portos e dos navios, ocasionando um grande aumento de custos.

A BWM (IMO, 2004) se divide em duas linhas principais, com suas respectivas regulamentações: (i) o Plano de Gerenciamento de Água de Lastro, que visa ao detalhamento dos procedimentos adotados de segurança para o navio e tripulação, assim como a destinação dos sedimentos, e (ii) o Registro de Água de Lastro, que trata da parte operacional em aspectos tais como tratamento, troca, circulação e descarte, sendo esse registro dividido em três regulamentações principais: (i) Padrão D-1 (*Ballast Water Exchange Standard*), que trata das metodologias de tratamento da água dos tanques; (ii) Padrão D-2 (*Ballast Water Performance Standard*), que se preocupa com a qualidade do descarte no tocante a espécies eliminadas, usando para tais fins microrganismos bioindicadores de relevância para saúde humana e (iii) Padrão D-3 (*Approval Requirements for Ballast Water Management Systems*), que trata das regras dos testes e aprovação, pelos estados-membros, do processo tanto em terra como em água (EUROPEAN BANK, 2014; IMO, 2018). Isso inclui os sistemas de tratamento de água de lastro a bordo das embarcações e eventuais sistemas de tratamento instalados em terra como um serviço prestado de suporte a embarcações nas áreas portuárias que operam dentro das mesmas especificações.

No Brasil, a Norma de Autoridade Marítima para Gerenciamento de Água de Lastro de Navios, da Diretoria de Portos e Costa - NORMAM-20 (BRASIL, 2019) é o documento, com base na BWM (IMO, 2004), que descreve as diretrizes para prevenção e controle da introdução de espécies, assim como determina medidas de gestão e prevê sanções em caso de não cumprimento (BRASIL, 2019).

Neste íterim, as embarcações teriam em média cinco anos (a partir da data de validação da legislação e da data de construção do navio) para se adaptarem às novas regras (DRILLET *et al.*, 2013). Entretanto, após a entrada em vigor da BWM (IMO, 2004) em 2017, foi estabelecido, pela IMO, um novo calendário para o cumprimento da regra, dando para as embarcações o prazo até 07 de setembro de 2024 (IMO, 2020).

Nosso objeto de estudo está na aferição do padrão D-2 que adotou os seguintes critérios para a água de lastro descartada como organismos de referência: (i) menos que 1 Unidade Formadora de Colônia (UFC) por 100 mililitros de *Vibrio cholerae* (sorogrupos O1 e O139, os toxigênicos) ou menos de 1 UFC dessa bactéria por 1 grama (peso úmido) de

amostras de zooplâncton; (ii) menos de 250 UFC por 100 mililitros de *Escherichia coli* e (iii) menos de 100 UFC por 100 mililitros *Enterococcus* de origem intestinais (NG *et al.*, 2018).

A lógica por trás da legislação ser estabelecida em termos de microrganismos é a de que sua eliminação implica simultaneamente a eliminação de esporos, ovos, propágulos e embriões de outros possíveis candidatos a espécies invasoras (BRASIL, 2009a). Além disso, a eficiência dos sistemas de proteção dos cascos contra bioincrustação significa que este meio representa uma via proporcionalmente menos importante de introdução de espécies exóticas - daí o cuidado com esse tipo de proteção (FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007).

Ainda existem, no entanto, lacunas no conhecimento sobre a população bacteriana presente nos tanques de lastro, se comparar com outros microrganismos, tais como seres planctônicos (LYMPEROPOULOU; DOBBS, 2017), em que a baixa luminosidade acaba por favorecer a ação dos organismos heterotróficos em detrimento da produção fotossintética, contribuindo, assim, para produção de biofilmes bacterianos (SHIKUMA; HADFIELD, 2010) comprovados, inclusive, em estruturas submersas em zonas portuárias (HEDE; KHANDEPARKER, 2018).

Dentre esses microrganismos, o presente trabalho destaca o *Vibrio cholerae*, pertencente à família *Vibrionaceae*, que são autóctones de ambientes aquáticos e se apresentam em formas livres, parasitas e em biofilmes bentônicos e tem como função ecológica a degradação de quitina (CHOWDHURY *et al.*, 2017; KOKASHVILI *et al.*, 2015).

Segundo a literatura, *V. cholerae* apresenta ampla faixa de sobrevivência no ambiente, tendo como condições ideais salinidades (entre 0,5 e 20), pH (entre 7,0 e 9,0) e temperaturas (entre 20°C e 30°C) (CHOWDHURY *et al.*, 2017; HUQ *et al.*, 1984; KOKASHVILI *et al.*, 2015; MILLER *et al.*, 1984). Vários trabalhos, contudo, vêm demonstrando que esses parâmetros podem apresentar faixas cada vez mais variáveis (NG *et al.*, 2018; RIVERA *et al.*, 2013) e que, em situações ambientais desfavoráveis, a bactéria pode entrar em um estado fisiológico diferenciado denominado de “*Viável, mas Não Cultivável*” (VNC) (FERDOUS *et al.*, 2018; MARTINELLI, 2007).

A maioria das bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* são inofensivas aos seres humanos, salvo o *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, que são amplamente conhecidos como patógenos causadores de doenças intestinais severas (BURKS *et al.*, 2017). É estimado que mundialmente ocorra cerca de 80.000 infecções/ano, resultado da exposição a esses três patógenos, seja por meio de frutos do mar contaminados ou por atividade de recreação com contato direto com a água. Esta situação indica claramente a presença desses

microrganismos patogênicos na coluna de água costeira (RALSTON *et al.*, 2012; SCALLAN *et al.*, 2011).

A associação do vibrião colérico com diversos organismos vivos é altamente documentada: com cladóceros e rotíferos (TAMPLIN *et al.*, 1990), com bivalves filtradores (PEREIRA *et al.*, 2007), com mosquitos da ordem Díptera (BROZA; HALPERN, 2001; HALPERN; IZHAKI, 2017), com tartarugas de casco mole (WANG *et al.*, 2007), com aves migratórias e peixes (HALPERN; IZHAKI, 2017; HOSSAIN *et al.*, 2018; MITCHELL *et al.*, 2017; SENDEROVICH *et al.*, 2010; MITCHELL *et al.*, 2017). Tem, no entanto, sua maior representabilidade entre os copépodos (BRATLET; AZAM, 2005).

Outro reservatório importante para o vibrio são os substratos quitinosos presentes nos chamados biofilmes bentônicos (NOGUEIRA *et al.*, 2002). A associação do *V. cholerae* a esses biofilmes pode ser vista como uma vantagem ecológica, uma vez que nesse ambiente ocorre uma grande quantidade de nutrientes, condição que tornam essas bactérias aptas à sobrevivência por longos períodos, provendo proteção e nutrientes (FERNÁNDEZ-DELGADO *et al.*, 2016), o que favorece seu ciclo de vida principalmente em ambientes estuarinos (SULTANA *et al.*, 2018).

O *V. cholerae* é um bastonete encurvado com forma de vírgula, gram-negativa, anaeróbio facultativo flagelado polar, possuindo mais de 200 sorogrupos com base no antígeno O dos lipossacarídeos da sua parede celular (LI *et al.*, 2009).

As amostras dos sorogrupos O1 e O139, produtoras da toxina colérica, são responsáveis por uma doença intestinal severa, com características epidemiológicas próprias conhecidas como Cólera ou Cólera epidêmica (CDC, 2018a).

As amostras de outros sorogrupos, coletivamente denominadas de “não-O1/não-O139”, não produtoras da toxina colérica, são responsáveis por infecções intestinais brandas de caráter esporádico e por infecções extra-intestinais, como septicemia, infecções de feridas, peritonite, infecções de pele, celulite, fasciíte necrozante, endoftalmia, infecções do ouvido, colecistite e meningite (CDC, 2018a; CHOWDHURY *et al.*, 2017).

O sorogrupo O1 divide-se em dois biótipos: o *Clássico* e o *El Tor*, em que o último se distribui em três sorotipos: *Ogawa*, *Inaba* e *Hikojima* (SACK *et al.*, 2004). Entretanto, uma nova cepa, denominada O139 ou Bengal, descoberta em 1992, vem causando significativos casos da doença em todo o mundo (CHOWDHURY *et al.*, 2017).

Alguns estudos já identificaram a presença de cepas O1 e O139 em amostras de tanques de lastro (NG *et al.*, 2018; RIVERA *et al.*, 2013) e outros trabalhos relacionaram

surtos da doença a descarga de lastro (DRAKE *et al.*, 2007; MIMURA *et al.*, 2005; RUIZ *et al.*, 2000).

A Cólera apresenta uma alta taxa de incidência em regiões afetadas por problemas sociais e de infraestrutura (MUKHOPADHYAY, 2015; SOMBOONWIT *et al.*, 2017), principalmente no tocante à deficiência de saneamento básico e causas adicionais, tais como falta de informação, analfabetismo e pobreza (BWIRE *et al.*, 2017), conforme indicam expressivas incidências em regiões com acentuados quadros de desigualdades sociais (EILER *et al.*, 2007; WHO, 2018).

Estudos vêm relacionando surtos da doença às condições ambientais, tais como sazonalidade e alterações climáticas, que acabam por magnificar as condições de vulnerabilidade ambiental para sobrevivência do vibrio (CHOWDHURY *et al.*, 2017; KOKASHVILI *et al.*, 2015; LO IACONO *et al.*, 2017; MOORE *et al.*, 2017; WORDEN *et al.*, 2006).

Entre os anos de 2010 e 2016, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), foram registrados, no mundo, 1.891.094 casos de Cólera com 29.772 mortes (taxa de letalidade de aproximadamente 1,6). Entre estes casos, 47% ocorreram no continente Africano, 41% no continente Americano, 10% na Ásia, 2% na Oceania e apenas 0,01% na Europa (WHO, 2017).

Como medidas profiláticas, a reposição de eletrólitos e prescrição de antibióticos são as metodologias mais utilizadas: a doxiciclina é tipicamente a primeira opção de tratamento, seguido por outras drogas, tais como cotrimoxazol, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, furazolidona (BURKS *et al.*, 2017). A resistência do *V.cholerae*, porém, a estes fármacos, é altamente relatada (DENGO-BALOI *et al.*, 2017; FERNÁNDEZ-ABREU *et al.*, 2017; MASOUMI-ASL *et al.*, 2017), sendo necessária a realização de mais estudos, a fim de caracterizar o padrão de susceptibilidade a antimicrobianos do *V. cholerae* (BURKS *et al.*, 2017).

No que tange à prevenção, a vacinação se apresenta como uma medida complementar, apesar de apresentar baixa eficácia e ser utilizada apenas em situações em países em estado de emergência. Investimentos em saneamento, educação e comunicação se apresentam como as medidas mais eficazes, não só para a Cólera, mas também para outras doenças de transmissão fecal-oral (DONADEU *et al.*, 2009).

Diante da situação apresentada, fica evidente a necessidade de uma constante fiscalização e monitoramento da biota ocorrente nos tanques de lastro, a fim de verificar a

eficácia das metodologias de tratamento utilizadas pelas embarcações na eliminação do *V. cholerae*, reduzindo, assim, o risco de introdução dessa bactéria em novos ambientes e minimizando a iminência de novos surtos da doença. Esta preocupação perpassa pelo processo de amostragem e análise de águas dos tanques de lastro e, desse modo, a verificação da conformidade com o padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004), em que este projeto se integra.

1 NAVEGAR É PRECISO: SOBRE A NAVEGAÇÃO

A navegação pode ser definida como a condução de uma embarcação do seu ponto de partida ao seu ponto de chegada e representa uma importante ferramenta para a aquisição do conhecimento, trocas comerciais e conquista de ambientes, facilitando a evolução da ciência e a comunicação entre vários grupos humanos (MAGALHÃES, 2002).

1.1 Um breve histórico da navegação

A aventura da navegação tem sua origem na região do mar Mediterrâneo, onde se estabeleceram três agrupamentos humanos importantíssimos: os gregos, os egípcios e os fenícios (ACQUARONE, 1955, p.25).

O povo da Grécia era formado por astutos construtores navais, que criaram a primeira estrutura de atracadouro de navegação: o cais (MAGALHÃES, 2002). A Grécia apresentava uma situação geográfica favorável e os gregos eram conhecidos como navegadores destemidos, como descritos por Sthepanides (2001), na lenda dos Argonautas.

O território dos egípcios estava todo cortado por um importante rio: o Nilo. Logo, toda sua navegação era basicamente fluvial (ACQUARONE, 1955, p.40).

Os fenícios tinham seu olhar para o horizonte e possuíam bosques ricos em cedros e ciprestes (preciosos para construção naval). Junto com o progresso da arte náutica dos fenícios, veio também a atividade comercial. Seus navios apresentavam uma simplicidade única, sem lugar para ornamentos nem imagens: grandes embarcações pontudas com flancos

arredondados e munidos de uma quilha que lhes assegurava estabilidade (MAGALHÃES, 2002).

Com o início do século X, embarcações advindas da Escandinávia começaram a sulcar os mares, chamadas pelos vikings de “*drakars*”. No século XII, tendo como berço a grande bacia do Mediterrâneo, as Cruzadas contribuíram para a construção de estaleiros e aperfeiçoamento das embarcações a vela (MAGALHÃES, 2002) e, durante o século XV, em busca de fortuna, conhecimento e expansão territorial, os europeus iniciaram o período das Grandes Navegações, liderados pela Península Ibérica (Portugal e Espanha). Data daquela época o advento das caravelas (ACQUARONE, 1955, 63p.).

A exploração das Américas e do Extremo Oriente ocasionou um intenso movimento marítimo na primeira metade do século XVI, com muita rivalidade comercial entre países europeus e pilhagens nas colônias, inclusive no Brasil (MAGALHÃES, 2002). A situação das embarcações, naquele período, era totalmente insalubre, acarretando significativas baixas no contingente das tripulações, atribuídas a inúmeras doenças infectocontagiosas como o escorbuto, a tifo e a peste (LEWINSOHN, 2003, 107p.).

Durante o século XVIII, a rivalidade deu lugar a uma aproximação maior entre as nações, aumentando o fluxo marítimo comercial e produzindo uma constante evolução dos veleiros, que adentraram o século XIX (MAGALHÃES, 2002). Seus interiores foram melhorados em compartimentação e aeração: embarcações maiores, mais pesadas e revestidas com chapas de cobre, permitindo uma melhor navegabilidade e rapidez, atingindo o ápice do seu desenvolvimento nos *clippers*, os veleiros comerciais mais velozes da história (ACQUARONE, 1955, 45p.).

Com as rotas marítimas mais conhecidas, as tripulações melhor selecionadas e os instrumentos náuticos de maior confiabilidade, passou a existir uma navegação mercante de estilo que hoje nos seria familiar (BRASIL, 2006), com rotas e datas de travessia bem seguras e determinadas.

O período de busca constante por novas terras e - conseqüentemente - a exploração de territórios contribuiu para o desenvolvimento da arte naval: o barco a vela e a vapor combinados começaram a serem fabricadas, as organizações de cabotagem surgiram, as hélices foram alocadas na popa em substituição às rodas dos flancos, possibilitando uma maior velocidade e aumento de dimensões no tamanho das embarcações.

Essa evolução nos sistemas de propulsão levou do vapor em motores de expansão até as turbinas a vapor, aos motores a diesel e a óleo combustível, enquanto a soldagem substituiu

os rebites, até que surgissem navios como os grandes graneleiros, contêineres e cruzeiros que cortam os mares do mundo todo hoje em dia (MAGALHÃES, 2002).

1.2 As embarcações e suas particularidades

Embarcações são estruturas flutuantes utilizadas para o transporte de carga, pessoas ou animais entre lugares através do ambiente aquático, construídas por diversos materiais, tais como madeira, ferro, aço, alumínio, fibra de vidro, entre outros (MONTEALEGRE-QUIJANO; LAURINO, 2011).

Em termos de medidas, pode-se dizer que os navios apresentam mais de 30 metros de comprimento, os barcos, 10 a 29 metros e os botes ou chalanas até 9 metros. A extremidade anterior de qualquer embarcação é chamada de proa, enquanto a porção posterior é chamada de popa. Olhando da popa para a proa, o lado direito é denominado estibordo ou boreste e o lado esquerdo, bombordo (BARROS, 2001, 20p.).

As embarcações podem ser classificadas quanto (i) à finalidade, (ii) material constituinte e (iii) sistema de propulsão (MONTEALEGRE-QUIJANO; LAURINO, 2011). Quanto ao material constituinte, podem ser classificadas em: madeira, alumínio, ferro, aço, fibra de vidro ou mistos e, quanto à propulsão, podem ser classificadas em embarcações a vela, de propulsão mecânica e a vapor (FONSECA, 2002).

Outra classificação importante, quanto ao tipo de navegação, difere as embarcações em (i) Longo Curso, que são aquelas que fazem traslado interpaíses, geralmente oceânicas, e de (ii) Cabotagem, que são aquelas que fazem viagens exclusivamente em águas nacionais sem perder a costa continental de vista, a dita navegação “doméstica” (TEIXEIRA *et al.*, 2018, pg. 402).

Outro ponto importante referente às embarcações está sobre a exteriorização da nacionalidade, de um navio, que se dá com o uso da bandeira de seu Estado. Ao ser registrado em um País, a embarcação passa a possuir um vínculo com esse Estado, ficando, assim, sujeito ao seu regime jurídico, o que lhe agrega proteção diplomática em águas internacionais (DUARTE, 2013). Entretanto, ocorre na navegação o recurso às chamadas “*Bandeiras de Conveniência*”, também conhecidas como bandeira de necessidade, independência, aluguel ou pavilhões de conveniência, que são registro da embarcação em um Estado que não seja o do

proprietário ou armador (ITF, 2020). A prática possibilita que a embarcação esteja sob tutela de poucas ou nenhuma exigência quanto às normas e padrões internacionais, já que os países que cedem suas bandeiras costumam apresentar normas mais brandas, tais como as baixas preocupações com o quantitativo de carga máxima, cobranças trabalhistas mais permissivas e de procedimentos e normas de segurança mais comedidas, aumentando assim as chances de acidentes (DUARTE, 2013).

Segundo a Convenção BWM (IMO, 2004) as embarcações sujeitas às regras descritas no artigo três (pág. 5) são: (a) navios autorizados a arvorar a bandeira de uma Parte e (b) navios não autorizados a arvorar a bandeira de uma Parte, mas que operem sob a autoridade de uma Parte e, desta forma, o presente estudo está focado em toda e quaisquer embarcação que atenda os quesitos supracitados.

Dependendo da sua capacidade e da sua rota, todas as embarcações podem ser vetores de transferência de espécies invasoras em escalas geográficas diferentes (SOUZA *et al.*, 2009). Daí a necessidade de regulamentar as características, os sistemas e as manobras das embarcações.

1.3 A movimentação marítima

A navegação, apesar de sempre contribuir para o desenvolvimento do conhecimento humano, é primeiramente um negócio internacional, que se altera e se conforma juntamente com o crescimento econômico (FONSECA, 2008).

O modal marítimo se apresenta como a via mais eficiente de transporte de mercadoria entre nações, com alta capacidade de carga e a menor relação custo-benefício, ajudando, desta forma, o desenvolvimento dos povos e nações (IMO, 2016).

A navegação responde por cerca de 90% de todo o transporte comercial internacional (IMO, 2016) e apresenta uma complexa rede de rotas comerciais em todo o mundo, servidas por aproximadamente 74.000 embarcações registradas nas rotas de mar aberto na virada do século (IMO, 2004).

Devido a toda essa dinâmica, atualmente existem complexas rotas comerciais marítimas em todo o mundo (KALUZA *et al.*, 2010). No registro total de embarcações,

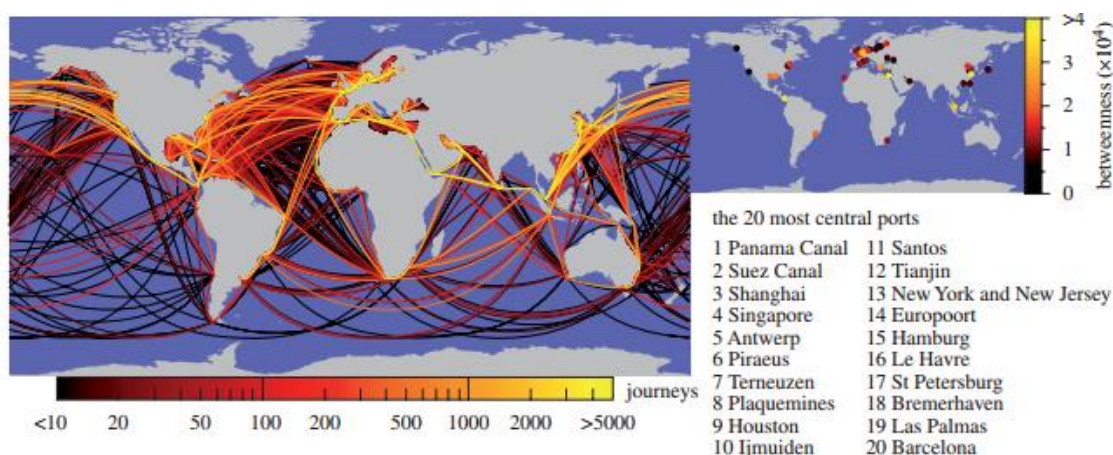
Panamá, Libéria, Ilhas Marshall, Hong Kong, Bahamas e Singapura são as principais bandeiras, detentoras das maiores frotas registradas no mundo (IMO, 2012).

A Figura 1 ilustra a complexa rede de rotas marítimas existentes atualmente, assim como os principais portos mundiais em nível de movimentação.

O total de carga transportada por esta via era de aproximadamente 8 bilhões de toneladas por milhas no final da década de 1970 e passou para 32 bilhões de toneladas por milhas em 2008 (ICS&ISF, 2010).

Com uma frota global de quase 104 mil embarcações, em 2011, o volume transportado foi de cerca de 1.4 bilhões de toneladas por milhas-ano. Já em 2013, aproximadamente 3.8 bilhões de toneladas milhas-ano (Clarkson Research Services, 2014).

Figura 1 - Trajetórias de todos os navios de carga maior do que 10.000 GigaTonelada em 2007. A escala de cores indica o número de viagens ao longo de cada rota e lista de classificação dos 20 portos mais centrais



Fonte: KALUZA *et al.*, 2010.

No ano de 2015, ocorreu um decréscimo do número de embarcações circundantes (aproximadamente 103 mil), quando navios - cada vez maiores - foram construídos e transportaram cerca de 5.5 bilhões de toneladas-milha naquele ano. No mesmo período, aproximadamente 4 mil embarcações novas foram postas em funcionamento para atender essa demanda mundial: dentre elas, 45,2% foram graneleiros, 27,7% petroleiros e 15,2% porta-containers (UNCTAD, 2019).

Em 2016, Grécia, Japão, China, Alemanha e Singapura detinham quase 50% de toda frota mercante atuante no transporte de cargas; o Brasil ocupava a 27ª posição. Quanto à

bandeira de registro, Panamá, Libéria, Ilhas Marshall, Hong Kong e Singapura apresentaram cerca de 58% dos navios registrados. A República da Coreia, a China e o Japão foram responsáveis pela construção de 92% de toda frota marítima global em 2016, enquanto Bangladesh, Paquistão e China foram responsáveis por 95% de todos os desmanches mundiais (UNCTAD, 2019).

Com a recuperação econômica mundial visualizada em 2017, após cinco anos de recessão, o comércio global de mercadorias por via marítima foi estimado em 10,7 bilhões de toneladas (UNCTAD, 2019).

No ano de 2018, o comércio marítimo global teve um crescimento mais lento em com volumes aproximados de 11 bilhões de toneladas transportadas, com cerca de 94,2 mil embarcações em operação, refletindo uma desaceleração generalizada mundial em toda área de comércio internacional e também uma mudança no padrão de construção das embarcações individuais, cada vez maiores e mais lucrativas (UNCTAD, 2019).

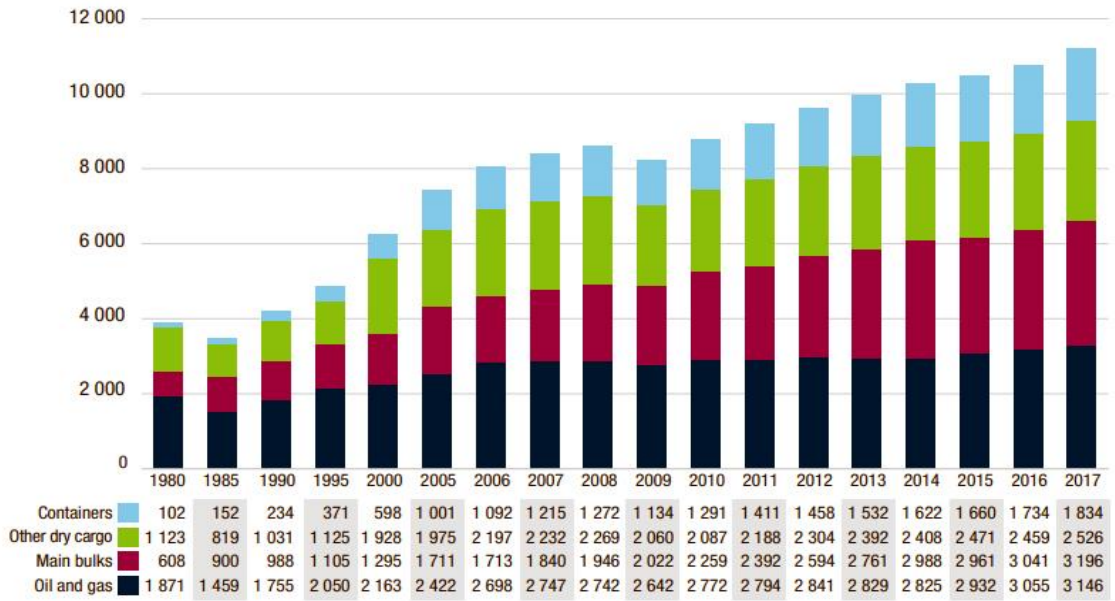
Segundo o *Review of Marine Transport da United Nations Conference on Trade and Development* (UNCTAD, 2019), projetou-se uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 3,8% entre os anos de 2019 a 2023 em transporte de cargas pelo modal marítimo. Se a tendência mundial de crescimento for mantida, estima-se que, em 2060, o total de carga transportada será aproximadamente na ordem de 23 bilhões de toneladas ano (UNCTAD, 2019).

Os dados da evolução do número do total de toneladas transportadas por alguns tipos de cargas - entre os anos de 1980 a 2017 - estão representados na Figura 2, assim como a representação gráfica da contribuição, por continente, do transporte marítimo em 2017, na Figura 3 adiante.

No Brasil, que apresenta aproximadamente nove mil quilômetros de costa, abrigando cerca de 25% de toda a sua população na faixa litorânea (BRASIL, 2009a), existem cerca de 175 instalações aquaviárias, com cerca de 99 portos e terminais, onde a navegação é responsável por cerca de 90% do volume de todo o transporte comercial (ANTAQ, 2018a).

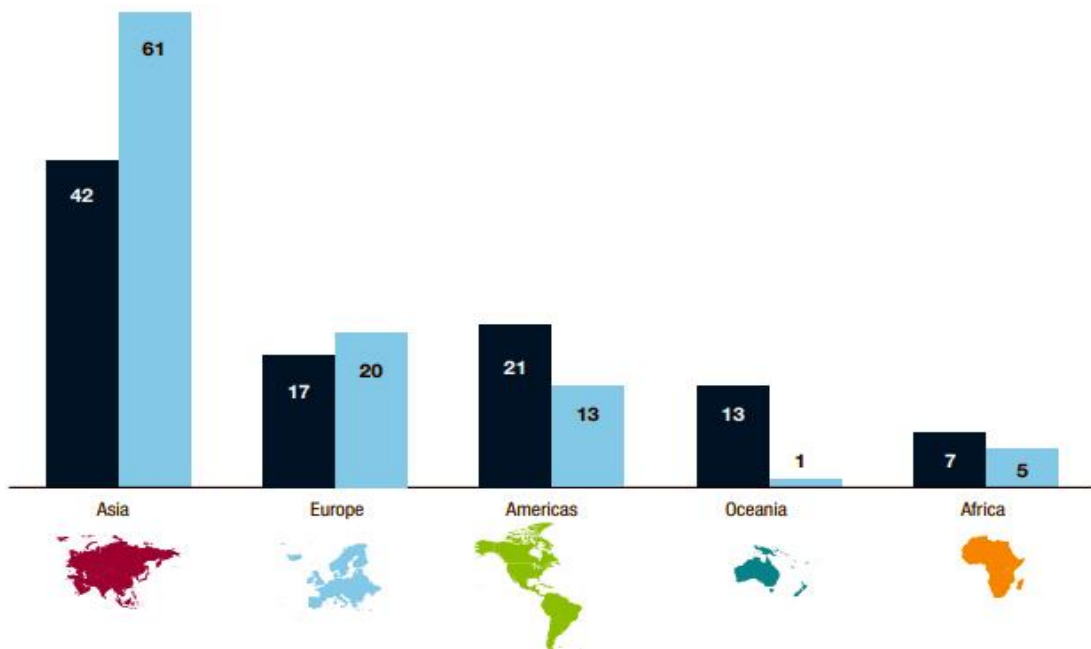
Estima-se um crescimento da movimentação de carga em cerca de 150% entre os anos de 2012 e 2030, em território brasileiro, conforme representado na Figura 4 segundo dados da Agência Nacional de Transporte Aquaviários (ANTAQ) (ANTAQ, 2018a).

Figura 2 - Evolução do total de alguns tipos de cargas transportadas, em milhões de toneladas, por via marítima (1980 - 2017)



Fonte: UNCTAD, 2019.

Figura 3 - Transporte marítimo por região (2017): Percentagem de participação na tonelagem mundial

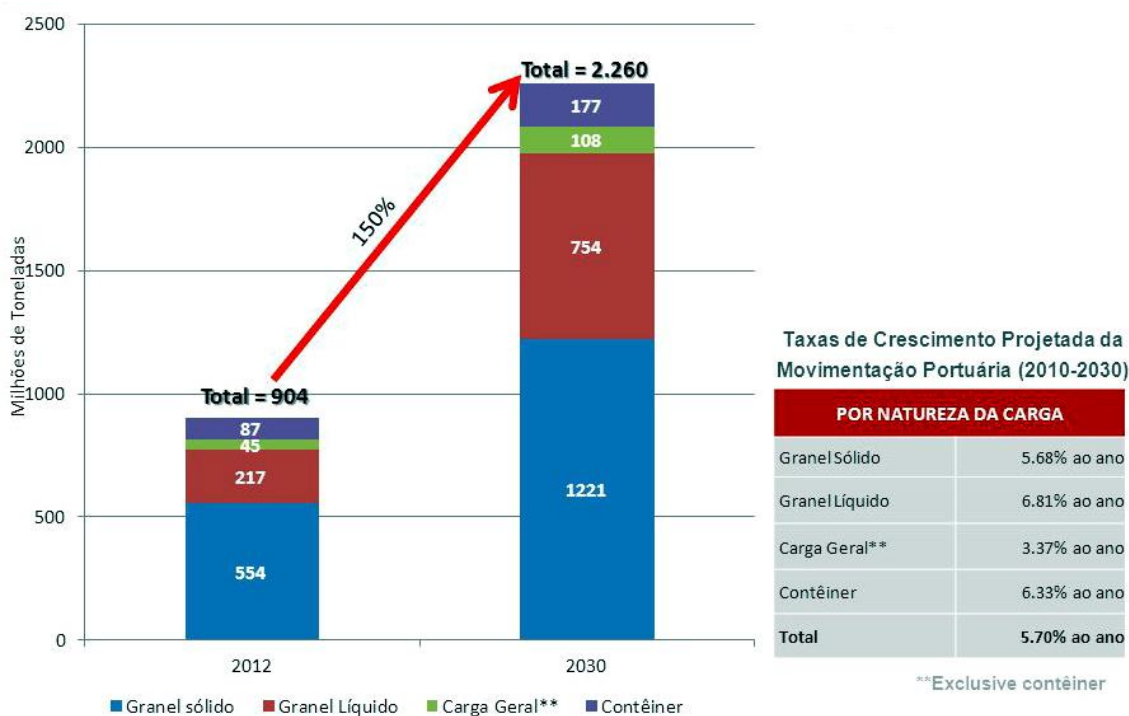


Legenda: ■ carregado (exportação) ■ descarregado (importação)

Fonte: UNCTAD, 2019.

A movimentação portuária total brasileira em 2018 foi na ordem de cerca de 1,2 bilhões de toneladas, representando um crescimento de 2,7% em comparação com o ano anterior (ANTAQ, 2018a). Neste mesmo ano, a navegação de longo curso, em território brasileiro, foi responsável por cerca de 853 milhões de toneladas, enquanto a navegação de cabotagem e de vias interiores por cerca de 264 milhões. Os estados que mais receberam visitas de longo curso foram: São Paulo (31.175.782 toneladas) com destaque para o porto de Santos (23.440.335 toneladas), Paraná (18.855.017 toneladas), quando o porto de Paranaguá teve 12.702643 toneladas movimentadas e o estado do Rio de Janeiro (15.998.329 toneladas), com destaque para o terminal aquaviário de Angra dos Reis (Porto de Itagaí) com 4.325.058 toneladas (ANTAQ, 2018a).

Figura 4 - Projeção de Movimentação de Carga no Brasil até 2030 (por natureza de carga)



Fonte: ANTAQ, 2018a.

No que se refere a trocas comerciais marítimas brasileiras, em volume de carga, segundo dados da Agência Nacional de Transportes Aquaviários (ANTAQ, 2018b), no 3º trimestre de 2017, os maiores parceiros foram a China, Estados Unidos e Espanha, conforme ilustrado nas Figuras 5 e 6.

Figura 5 - Principais destinos das exportações brasileiras (3º trimestre de 2017)

	País Destino	Toneladas	%
1º	China	77.475.478	45,6%
2º	Japão	8.070.563	4,7%
3º	Malásia	7.973.654	4,7%
4º	Estados Unidos	6.885.514	4,0%
5º	Holanda	6.350.160	3,7%
6º	Coréia Do Sul	4.474.736	2,6%
7º	Espanha	3.802.078	2,2%
8º	Singapura	3.779.923	2,2%
9º	Egito	3.483.009	2,0%
10º	Omã	3.055.138	1,8%
	Outros Países	44.701.903	25,9%

Fonte: ANTAQ, 2018b.

Figura 6 - Principais origens das importações brasileiras (3º trimestre de 2017)

	País Origem	Toneladas	%
1º	Estados Unidos	9.192.014	24,0%
2º	China	3.395.482	8,9%
3º	Argentina	2.285.728	6,0%
4º	Colômbia	1.898.558	5,0%
5º	Rússia	1.387.573	3,6%
6º	Espanha	1.311.901	3,4%
7º	Bélgica	1.245.291	3,3%
8º	Argélia	1.226.394	3,2%
9º	Canadá	1.208.041	3,2%
10º	Austrália	1.202.500	3,1%
	Outros Países	13.936.383	36,4%

Fonte: ANTAQ, 2018b.

Os dez portos que mais movimentaram cargas, assim como as respectivas variações, são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dez maiores portos brasileiros em movimentação de cargas entre o 3º trimestre de 2016 e o 3º trimestre de 2017

Porto / Terminal	UF	Poder	Tonelada (Milhões)	Varição (%)
Terminal Ponta da Madeira	MA	Privado	44,1	▲ 13,06%
Santos	SP	Público	29,5	▲ 11,7%
Terminal de Tubarão	SC	Privado	28,3	▼ 4,43%
Itaguaí	RJ	Público	13,6	▼ 15,5%
Paranaguá	PR	Público	13,5	▲ 38,3%
Terminal de São Sebastião	SP	Privado	12,3	▲ 3,38%
Terminal da Ilha Guaíba	RJ	Privado	11,4	▼ 5,03%
Terminal de Angra dos Reis	RJ	Privado	10,6	▼ 1,70%
Rio Grande	RS	Público	7,1	▲ 8,5%
Suape	PE	Público	6,0	▼ 0,2%

Legenda: ▲ acréscimo ▼ decréscimo

Fonte: ANTAQ, 2018b.

1.4 A dinâmica portuária

A evolução da dinâmica portuária sempre caminhou em consonância com as constantes reorganizações de espaços produtivos e as novas dinâmicas de expansão comercial e territorial, incluindo assim mudanças em tecnologias e mão de obra (MONIÉ; VIDAL, 2006).

O porto é um conjunto organizado de instalações, com funções variadas atinentes à dinâmica portuária, localizado em um território denominado sítio portuário (CASTRO; ALMEIDA, 2012).

A eficiência portuária está diretamente ligada, não somente a sua própria dinâmica interna, mas também ao seu entorno, com as atividades produtivas relacionadas aos seus serviços oferecidos (MONIÉ; VIDAL, 2006). Esta dinâmica ilustra bem a ideia do *Porto Clássico ou Porto Cidade*; este sempre está inserido em uma metrópole, fazendo assim parte da dinâmica dela (CASTRO; ALMEIDA, 2012).

A globalização tem gerado novos desafios e demandas sobre os portos, que acabam por se tornarem conexões de imensas cadeias logísticas entre íntimos fluxos de comércio entre regiões diferentes, fazendo do porto uma área de interferências maiores que somente um local de recebimento e partida de embarcações (MONIÉ; VIDAL, 2006).

Desta forma, os portos passam a ter usos múltiplos, caracterizando-se como polos de atração de investimentos e mão de obra, impulsionando e incrementando as economias locais das regiões onde estão localizados, atendendo demandas cada vez maiores de produtos e serviços que utilizam a via marítima para seu escoamento (CUNHA, 2006).

1.5 O Porto da Cidade do Rio de Janeiro

O Estado do Rio de Janeiro apresenta, entre portos e terminais, 12 instalações portuárias, com administrações públicas e privadas. Entre eles está o Porto da Cidade do Rio de Janeiro, que é 100% público, administrado pelas Companhias Docas S/A (USUPORTRJ, 2020).

O Porto do Rio de Janeiro foi fundado em julho de 1910 e está localizado na costa ocidental da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro, Brasil), conforme a Figura 7 e possui 6.740 metros de estruturas de cais contínuo e mais 883 metros de instalações, contando com 10 armazéns externos (capacidade de 13.100 metros toneladas de armazenamento), e com uma bacia de torneamento de cerca de 1.1150 metros de extensão com profundidade de 10 a 73 metros (PORTOSRIO, 2019).

A estrutura portuária está dividida nos cais Gamboa, São Cristóvão e Caju e outros dois cais de finalidades específicas (Mauá e Manguinhos), em que cada trecho é zoneado conforme sua área de atividade. Apresenta como exemplo de terminais privados o Torguá, Petrobrás S.A, Esso, Shell entre outros (PORTOSRIO, 2019).

Figura 7 - Localização do Porto da Cidade do Rio de Janeiro



Fonte: O AUTOR, 2020.

O zoneamento dos três principais cais do Porto da cidade do Rio de Janeiro está representado na Figura 8, assim como na Tabela 2.

Figura 8 - Zoneamento do Porto do Rio de Janeiro



Fonte: LABTRANS, 2014.

Tabela 2 - Zoneamento do Porto do Rio de Janeiro

ZPC	Cais Caju
TLC	Terminal de Granéis Líquidos
TCO	Terminal de Contêineres
TRR	Terminal <i>Roll-on Roll-off</i> (veículos)
ZPS	Cais São Cristóvão
TPS	Terminal de Produtos Siderúrgicos
TLS	Terminal de Granéis Líquidos
TGS	Terminal de Carga Geral e Neo Granéis
TTS	Terminal de Trigo
ZPS	Cais São Cristóvão
TPS	Terminal de Produtos Siderúrgicos
TLS	Terminal de Granéis Líquidos
TGS	Terminal de Carga Geral e Neo Granéis
TTS	Terminal de Trigo
ZPG	Cais Gamboa
APO	Área de apoio ao OGMO
TG1	Terminal 1 de Carga Geral
TT1	Terminal 1 de Trigo
TPP	Terminal de Bobinas de Papel para Imprensa
TG2	Terminal 2 de Carga Geral
TSG	Terminal de Produtos Siderúrgicos
TT2	Terminal 2 de Trigo
TPA	Terminal de Passageiros
TLG	Terminal de Granéis Líquidos
PRP	Área relacionada ao Plano de Revitalização Urbana Portuária

Fonte: LABTRANS 2014.

As principais rodovias que fazem conexão com o Porto do Rio de Janeiro são a Rodovia Presidente Juscelino Kubitschek (BR-040), Rodovia Translitorânea (BR-101) e Rodovia Santos Dumont (BR-116) (LABTRANS, 2014).

O acesso aquaviário ao porto é feito por um canal com 18,5 km de extensão, 200 metros de largura mínima e 17 metros de profundidade. Dessa extensão, 11.100 metros conduzem até os fundeadouros e os outros 7.400 metros na direção norte vão até o terminal de petróleo “Almirante Tamandaré” a uma profundidade que varia entre 20 e 37 metros. O canal de acesso interno se conecta ao canal dragado da Baía de Guanabara com profundidade de 17 metros e taxa de assoreamento baixa (LABTRANS 2014).

O calado no canal de acesso às instalações do Cais Comercial, compreendido em parte do Cais da Gamboa, é de 10 metros. Nas marés cheias, é limitado ao máximo de 10,9 metros (LABTRANS, 2014).

O tráfego de embarcações está localizado no acesso ao trecho de cais compreendido entre o Cais da Gamboa e parte do Cais de São Cristóvão. O calado é de 7,5 metros referido ao nível médio do mar e limitado ao máximo de 8,5 metros em ocasião de marés cheias (LABTRANS, 2014).

O canal de acesso ao cais do Caju, onde estão localizados os terminais de contêineres, tem cerca de 150 metros de largura. O calado máximo recomendado para esse canal é de 12,6 metros. Nas marés cheias, o limite é de 13 metros. No acesso aos terminais de contêineres, o canal faz uma curva que foi recentemente dragada pelos próprios terminais para permitir a passagem de navios de 306 metros. Nos canais internos da área portuária, a velocidade está limitada a seis nós (LABTRANS, 2014).

O porto da Cidade do Rio de Janeiro movimentou, em 2017, cerca de 6 bilhões de toneladas em carga (4,8 bilhões por navegação de longo curso), e 67,4% foi de carga containerizada (ANTAQB, 2018).

Os terminais privados estaduais foram responsáveis por cerca de 70% de toda a movimentação portuária. As maiores cargas foram minérios e derivados com aproximadamente 115 bilhões de toneladas e 66 bilhões de toneladas de combustíveis (ANTAQB, 2018).

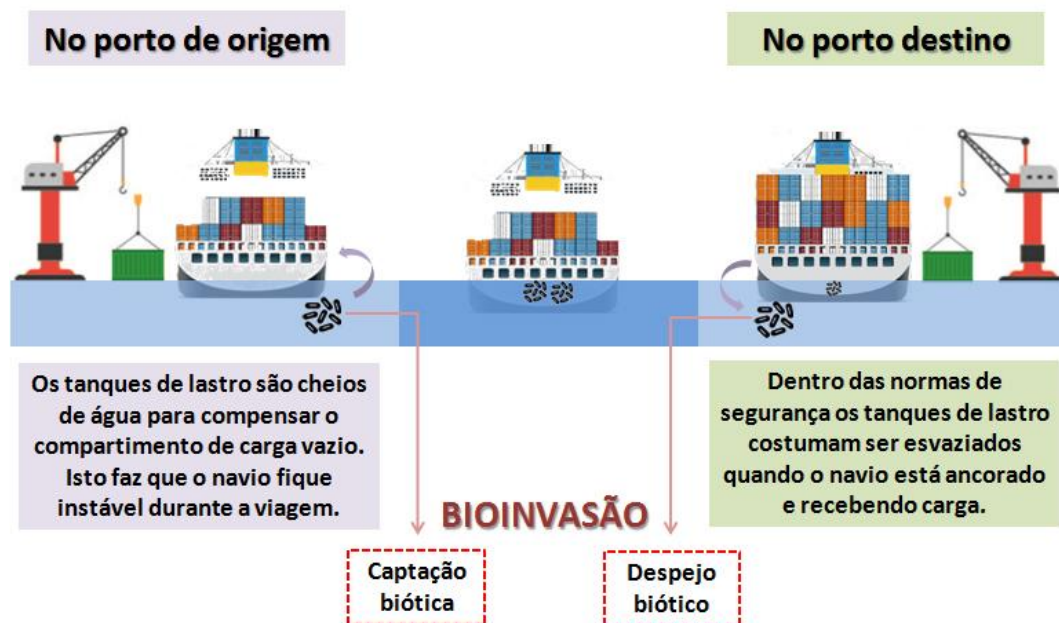
No que se refere a problema da água de lastro, estudo realizado por Castro *et al.* (2010) estimou o aporte - aproximado - de 870 mil metros cúbicos recebido pelo porto (com uma estimativa de 2 milhões de metros cúbicos), entre os anos de 2005 a 2006, e os principais “doadores” foram navios tanques advindos de portos nacionais da Região Nordeste.

1.6 A água de lastro

As embarcações no passado apresentavam problemas de equilíbrio e estabilização, que foram resolvidos pela inserção de peso no interior das mesmas, ocasionando uma melhor penetração do casco na água e, conseqüentemente, uma maior estabilidade ao navegar. Estes pesos, anteriormente feitos por rochas, foram substituídos pela lastragem líquida por volta de 1880, exigindo assim melhorias na estrutura dos navios. A partir de 1945, com o término da Segunda Grande Guerra, deu-se a definitiva substituição do lastro sólido pela lastragem hídrica (SILVA *et al.*, 2004).

Quando o navio é descarregado, a água local é captada por bombas centrífugas de grande vazão e armazenadas nos tanques de lastro, a fim de lhe causar um afundamento e, assim, conservar sua estabilidade. A água permanecerá nesses compartimentos até que a embarcação chegue ao seu porto de carregamento, onde, à medida em que a carga é colocada nos porões do navio, a água de lastro é descartada no ambiente (SILVA *et al.*, 2004), contribuindo assim para o processo de bioinvasão conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema explicativo do processo de lastragem e deslastragem de navios



Fonte: O AUTOR, 2020.

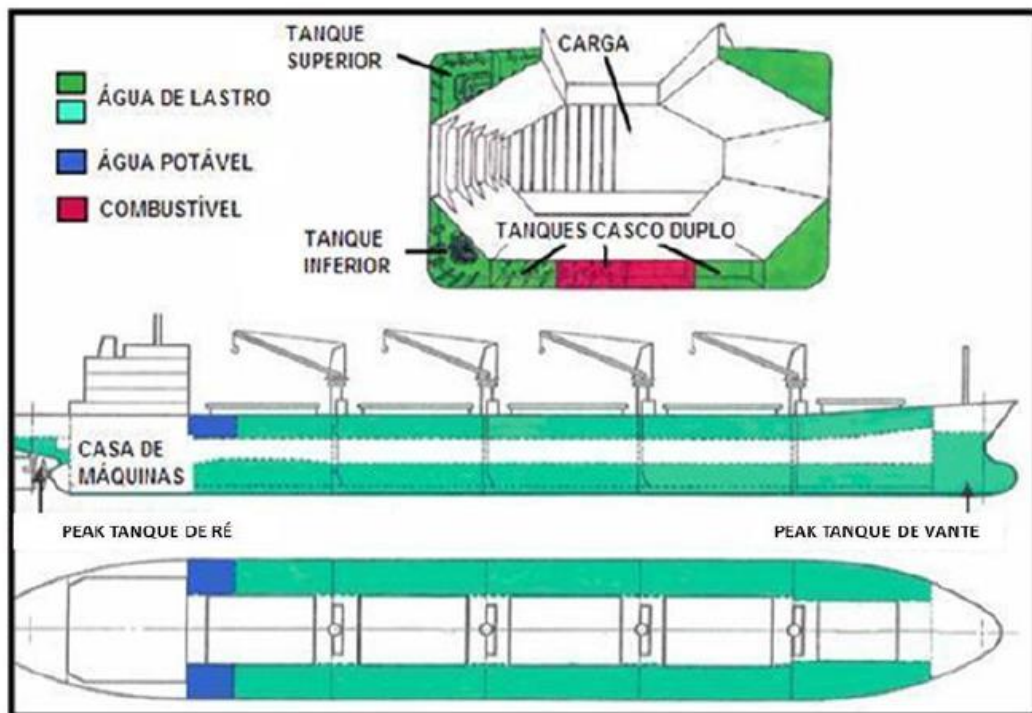
Um agravante neste cenário é que a água pode ser captada de vários lugares por um único tanque, em que o principal fator determinante da quantidade de água nos tanques de lastro é a curva de estabilidade de cada navio (PEREIRA, 2012).

Os tanques de lastro ficam dispostos ao longo de todo o casco do navio, podendo ter várias configurações, dependendo do tipo de embarcação, com esgotamento ocorrendo por: (i) Tanques de Duplo Fundo (TDF), cujo transporte de água ocorre por sucção e possuem uma tubulação própria, vindo do fundo do navio até a bomba na praça de máquinas e (ii) Tanques Superiores, que são esgotados por gravidade, através de aberturas na lateral do navio (BRASIL, 2009b).

Na maioria dos casos, o acesso a esses tanques é bastante complicado, com passagens estreitas, ambientes insalubres, com pouca ventilação e iluminação, dificultando as manobras de amostragens e inspeção direta no tanque (PEREIRA, 2012).

A Figura 10 mostra um esquema de disposição dos tanques de lastro presentes em um navio do tipo graneleiro.

Figura 10 - Esquema de tanque de lastro de navio graneleiro



Fonte: PEREIRA, 2012.

A água de lastro tem sido considerada mundialmente como o principal meio de transferência de espécies aquáticas, animais e/ou vegetais entre ambientes costeiros, uma vez que os cascos não são em princípio veículos pelo uso de tintas antiincrustantes venenosas (FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007). Estima-se que, a cada ano, cerca de 10 bilhões de toneladas cúbicas de água são transportadas em todo mundo via lastro de navio, com cerca de 7 mil espécies carreadas diariamente (ZHANG *et al.*, 2017).

A eficiência da água de lastro, neste contexto, dá-se principalmente pela alta taxa de captura de organismos presentes na água e pelo ambiente confinado criado nos tanques, que pode ocasionar a criação de um microcosmo excelente para reprodução de algumas espécies neles contidos (BRASIL, 2009b; WERSCHKUN *et al.*, 2014).

Os efeitos diretos da bioinvasão para o meio ambiente estão relacionados a modificações dos ecossistemas, causando desequilíbrio entre espécies relacionadas, o que pode refletir em impactos sociais e econômicos para a sociedade (SACHS, 2012; SOUZA *et al.*, 2019).

A maioria das espécies transportadas por água de lastro não resistem às condições impostas pela viagem e morre (MIMURA *et al.*, 2005); entretanto, muitas sobrevivem, algumas inclusive em forma de cistos, e voltam as suas condições normais quando lançadas no novo ambiente (CASTRO *et al.*, 2010).

Apesar de existirem numerosas invasões bem sucedidas em todo mundo, causando aproximadamente 34% das extinções de espécies animais registradas (BRISKI *et al.*, 2013), representando uma ameaça para a vida, atividades econômicas e culturais, poucos dos organismos introduzidos conseguem sucesso no novo ambiente (SATIR, 2014).

O processo de invasão é configurado por etapas: transporte, chegada, sobrevivência e estabelecimento, que determinarão o êxito ou fracasso (BRISKI *et al.*, 2013). Para o estabelecimento de uma espécie invasora em um novo habitat, alguns fatores são determinantes como (i) características biológicas intrínsecas da espécie e sua associação positiva com as características do ambiente em que estão sendo introduzidas e (b) condições geográficas e físico-químicas do local de descarga (clima, temperatura, salinidade, correntes, ventos) que interferem diretamente no sucesso ou fracasso de invasão de uma determinada espécie (COLWELL, 2018).

Segundo Seebins *et al.*, (2013), os portos de Singapura (Singapura), de Kaohsiung, Xiamen, Qingdao (China), de Hong Kong (Hong Kong), de Suez e Said (Egito), de Busan (Coreia do Sul), de Long Beach e Los Angeles (Estados Unidos), de Jebel Ali (Dubai), de

Kawasaki e Yokohama (Japão), de Durban (África do Sul), de Fujairah (Emirados Árabes Unidos), de La Plata (Argentina) e de Santos (Brasil) se apresentaram como os portos de maiores riscos de introdução de espécies por lastro, devido principalmente ao quantitativo de movimentação portuária, assim como alto grau de impactos ambientais destas áreas.

Os navios contêineres sugerem uma maior preocupação, não só pela grande quantidade de lastro utilizado quando estão vazios, mas também pela intensa movimentação de lastro nas diversas movimentações de cargas em todo percurso realizado. Quanto à distância entre os portos de destino e origem de maior risco, foram aqueles que variaram entre 8 mil a 10 mil quilômetros (SEEBENS *et al.*, 2013).

Entre todas as espécies transportadas pela água de lastro, encontram-se também agentes patogênicos que podem representar um alto risco à saúde humana mundial (ALTUG *et al.*, 2012), uma vez que, nas áreas de portos, o despejo de esgoto urbano é realizado com frequência, podendo ser captados pelas bombas de lastragem das embarcações (PEREIRA, 2012).

A possibilidade de disseminação de doenças infecciosas, associadas à facilitação de disseminação através dos meios de transporte modernos pode causar efeitos adversos para a saúde humana com repercussões para o ambiente, em particular nos casos de introdução de espécies exóticas e/ou patogênicas no habitat aquático, após processos de lastragem e deslastragem de navios em todo o mundo (PAZ; BERCINI, 2009). Neste ínterim, é importante destacar o risco de cruzamento entre a espécie invasora com espécies nativas, além de aumentar a sua resistência (ALTUG *et al.*, 2012).

Segundo estudos de LV *et al.*, (2017), em amostragem de sedimentos de lastro de navios ancorados no Porto de Jiangyin (China), provenientes de diversas origens, 80% da microfauna era composta de bactérias possuidoras do gene que codifica a porção 16S do rRNA, que é uma pequena subunidade da composição ribossômial de seres procariontes (PADILLA; COSTA *In*: TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, p.37). Nesse estudo, também foi detectada a presença de sulfeto devido à corrosão do metal pela atividade bacteriana e oxidação da matéria orgânica, tornando o microambiente no tanque menos aeróbico.

A problemática das bioinvasões por água de lastro se mostra como um desafio que tem uma relação direta com o comércio internacional, sendo considerado um tipo de poluição transfronteiriço com complexas medidas de prevenção e controle de cooperação internacional (ZANELLA, 2010). Esta questão possui correlação direta com fatores de desenvolvimento

socioeconômicos; as regiões portuárias se apresentam como as mais vulneráveis neste processo (SILVA *et al.*, 2015).

A similaridade ambiental entre o porto doador e o porto receptor é um fator determinante de risco, principalmente no tocante a fatores físicos como temperatura e salinidade das águas, biológicos como predadores e disponibilidade de alimento (EUROPEAN BANK, 2014).

Outro fator importante se pauta nas alterações climáticas que tendem a tornar propícias as condições de invasão, principalmente no que diz respeito ao aumento da temperatura e salinidade (SILVA *et al.*, 2015), como será visto com mais detalhe adiante.

1.7 Legislação e ações sobre gerenciamento de água de lastro

Em 1960 o ambiente marinho começou a ganhar importância nas principais discussões internacionais sobre o meio ambiente, sendo que, em 1972, foi adotada a Convenção sobre prevenção da poluição marinha por alijamento de resíduos e outros materiais (ZANELLA, 2010).

A Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios (MARPOL, 73/78), conhecida como a Convenção de Londres, discorre em seus vários anexos sobre o potencial impacto do modal marítimo ao ambiente, e desta forma tem como propósito estabelecer regras de eliminação da poluição por óleo e outras substâncias danosas ao ambiente advindo de navios.

Essa mesma Convenção cita, de forma indireta, a água de lastro como assunto de preocupação com base na regra três (anexo II), e os países poderiam definir como poluição a descarga de água de lastro efetuada em seu território que não obedecesse às suas leis locais (SILVA *et al.*, 2004).

No ano de 1982, foi adotada a Convenção Internacional das Nações Unidas sobre o Direito do Mar (UNCLOS), conhecida como a Convenção de *Montego Bay*, que em seus artigos 194 e 196, mencionaram respectivamente a função do Estado em tomar providências de preservação do ambiente marinho no tocante à entrada de novas espécies nos ecossistemas (SOUZA *et al.*, 2004).

A IMO foi criada como agência internacional especializada para o transporte marítimo pela *United Nations Organization* (ONU) com a responsabilidade focada na segurança e eficiência do transporte marítimo e cuidado com a saúde dos oceanos, criando para isto mecanismos legais para prevenção da poluição marinha e garantia das embarcações (EUROPEAN BANK, 2014).

A problemática da água de lastro, entretanto, só veio a ser tratada de forma mais enfática no ano de 1991, através do Comitê de Proteção ao Meio Ambiente Marinho (MEPC) com caráter de aconselhamento ou recomendação na prevenção à introdução de agentes patogênicos e demais organismos aquáticos (GONÇALVES, 2014).

Em 1997, o MEPC adotou a resolução A.868 (20), com diretrizes para o controle e gerenciamento da água de lastro dos navios, para minimizar a transferência de organismos aquáticos nocivos e agentes patogênicos (SILVA *et al.*, 2004).

A IMO, com o apoio do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) e do Fundo para o Meio Ambiente Global (GEF), elaborou, em 2000, o projeto intitulado originalmente como *Remoção de Barreiras para a Implementação Efetiva de Controle de Água de Lastro e Medidas de Gestão em Países em Desenvolvimento*, posteriormente denominado Programa Global de Gerenciamento de Água de Lastro ou apenas *GLOBALLAST* (GLOBALLAST, 2004).

O programa, considerando a vulnerabilidade de bioinvasões por água de lastro de navios, selecionou seis portos de países em desenvolvimento: Porto de Itaguaí (Brasil), Porto de Dalian (China), Porto de Bombaim (Índia), Porto de Kharg Island (Irã), Porto de Saldanha (África do Sul) e Porto de Odessa (Ucrânia), fornecendo assistência técnica, capacitação e compromisso institucional aos participantes, com a finalidade de que cada país-membro fosse capaz de elaborar seu próprio plano de gerenciamento de água de lastro de maneira eficiente, contribuindo assim para a criação de um arcabouço pra futuras estratégias de gestão do problema (GLOBALLAST, 2004).

Em 2004 a IMO adotou a Convenção BWM (IMO, 2004) com propostas mais eficazes no tocante à prevenção, minimização e eliminação de introdução de organismos aquáticos nocivos e agentes patogênicos existentes na água de lastro, propondo medidas tais como: tratamento a bordo, troca de lastro oceânico, plano de gerenciamento nos navios, com as seguintes exceções: (i) navios sem lastro ou com lastro permanente; (ii) de cabotagem com bandeira do próprio país; (iii) cabotagem com bandeira de outro país que tenham autorização para tal fim e (iv) navios de guerra (IMO, 2004).

No seu artigo 18, ela estabelece que a mesma só entraria em vigor doze meses após ratificada por pelo menos 30 (trinta) países, cujas frotas mercantes combinadas constituíssem não menos que 35% (trinta e cinco por cento) da arqueação bruta da frota mercante mundial, em que tais requisitos foram atingidos em 2016 (IMO, 2016). Tal quantitativo foi obtido em 2016 e, desta forma a convenção entrou em vigor em 2017. Entretanto, o cumprimento do padrão D-2 (que será detalhado nos próximos parágrafos) foi postergado até 2024 para navios já em operação pelo anexo 2 da convenção MEPC 297/72 de abril de 2018 (IMO, 2018).

A referida Convenção se dividiu em duas linhas principais, com suas respectivas regulamentações: (i) Plano de Gerenciamento de água de lastro, que visa ao detalhamento dos procedimentos adotados de segurança para o navio e tripulação, assim como a destinação dos sedimentos, quanto à gestão da água de lastro e (ii) Registro de água de lastro, que trata da parte operacional, tais como tratamento, troca, circulação e descarte (IMO, 2016).

A regulamentação D-1 trata das metodologias de descarte da água dos tanques de lastro em que, segundo a regulamentação B-4, descreve-se a troca da água requerida na ordem de 95%, feita sempre em uma área distante a 200 milhas náuticas da terra mais próxima com pelo menos 200 metros de profundidade (NG *et al.*, 2018), podendo ocorrer, conforme inciso 1.2. da BWM (IMO, 2004), a 50 milhas náuticas da costa e com águas de pelo menos 200 metros de profundidade, quando a regra original não puder ser atendida.

A regulamentação D-2 se preocupa com a qualidade do descarte quanto às espécies eliminadas, usando para tal fim microrganismos de relevância para a saúde humana, como bioindicadores (EUROPEAN BANK, 2014) com a seguinte padronização: (i) *Vibrio choleraes* (sorogrupos *O1* e *O139*) com menos de 1 UFC por 100 mililitros ou menos de 1 UFC por 1 grama (peso úmido) de amostras de zooplâncton; (ii) *Escherichia coli* com menos de 250 UFC por 100 mililitros e (iii) *Enterococos* de origem intestinal com menos de 100 UFC por 100 mililitros (NG *et al.*, 2018).

A fim de garantir a eficiência das metodologias de tratamento de água de lastro e segurança da tripulação, a regulamentação D-3 trata das regras dos testes e aprovação pelos estados-membros do processo tanto em terra como em água (IMO, 2004).

Outra preocupação se dá na questão do tratamento e destino dos sedimentos contidos nos tanques de lastro, coletados juntos com a água, principalmente em portos estuarinos ou rasos, e parte é deslastrada, acarretando a formação de biofilmes e/ou formação de cistos ou esporos, além de poder conter metais pesados e tóxicos (MAGLIÉ *et al.*, 2017).

Em adição à Convenção, a IMO prevê um comprometimento dos portos e terminais na construção de infraestrutura para limpeza e manutenção dos tanques de lastro, assim como armazenamento dos sedimentos e promoção de facilidades para pesquisas técnicas científicas que venham agregar tecnologias à BWM, assim como o monitoramento de efeitos da gestão de água de lastro em águas sob sua jurisdição (IMO, 2004).

No tocante à fiscalização das embarcações, a BWM (IMO, 2004), em seu artigo 9, afirma que qualquer navio sujeito à Convenção poderá ser inspecionado, seja no porto ou terminal ou até mesmo em alto mar, por autoridade competente, com verificação da presença do certificado estatutário internacional de gestão de água de lastro e dos demais documentos previsto na Convenção (IMO, 2004).

No âmbito nacional, as regulamentações sobre água de lastro se iniciaram com a adoção, no ano de 2000, da Norma da Autoridade Marítima Brasileira de número 08 NORMAM-08/DPC, a qual obteve revisões conforme a Portaria nº 49/DPC 2015, que faz a obrigatoriedade da obtenção do Formulário de Água de Lastro, devidamente preenchido, no ato da inspeção pelo *Port State Control* e posterior envio à Capitania dos Portos local (CASTRO *et al.*, 2017). A Resolução MEPC 252 (67), apesar de apresentar somente linhas gerais, traz para a luz toda esta importância, direcionando o “Estado do Porto” no controle da convenção BWM (IMO, 2004).

Em 2001, reforçado pelo surto de Cólera na Baía de Paranaguá (RIVERA *et al.* 2013), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) torna obrigatório, segundo a Resolução RDC 217/2001, a adoção de esforços para minimizar problemas de saúde pública associados à água de lastro, quanto a vigilância epidemiológica e controle de vetores nos portos. Esta Resolução, posteriormente atualizada pela RDC 72/2009, levanta a possibilidade de amostragens de tanques de lastro para identificação desses organismos patogênicos, assim como a verificação de parâmetros físicos e químicos descritos no artigo 28 (CASTRO *et al.*, 2017).

Em 2002, a ANVISA concluiu um estudo exploratório, anexado ao programa *GLOBALLAST*, que identificou e caracterizou agentes patogênicos, em água de lastro, em nove portos brasileiros, detectando a presença de *V.cholerae*, Colifagos, Enterococos fecais, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (ANVISA, 2002)

Após estudos de levantamento da biota nativa, foram realizadas pesquisas sobre possíveis impactos da interação dessas espécies, sugerindo a criação de metodologias de

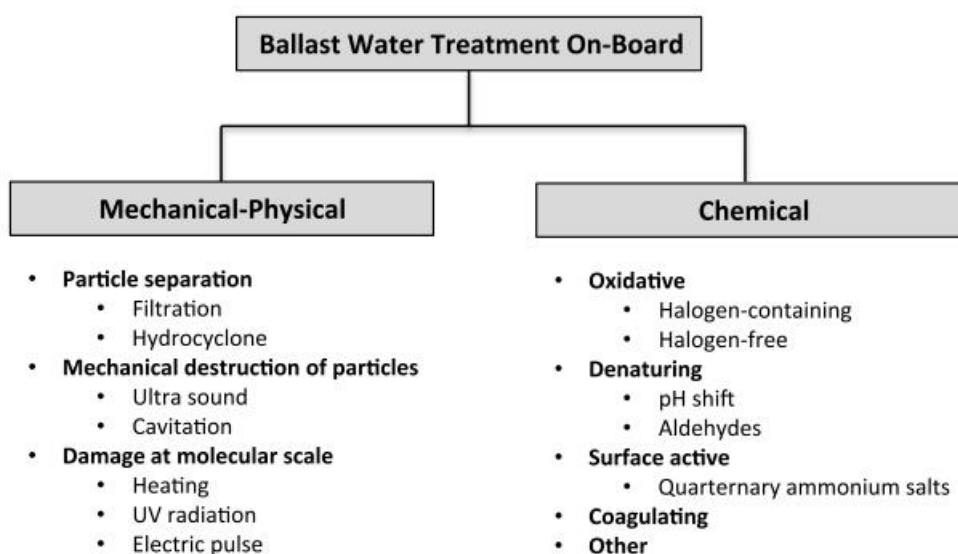
avaliação de risco, focando nas mais perigosas de introdução e estabelecimento, bem como identificar os recursos naturais potencialmente ameaçados (GLOBALLAST, 2004).

Em 2005, a Diretoria de Portos e Costas (DPC), após intensos diálogos com todo setor marítimo brasileiro, adotou a NORMAM-20 (CASTRO *et al.*, 2017), que se apresenta como documento de maior impacto, no que tange ao gerenciamento da água de lastro até hoje. Nela estão descritas obrigações para as embarcações e seus agentes, incluindo o preenchimento e envio do Formulário de Água de Lastro (CASTRO *et al.*, 2010). Essa normativa sofreu revisão no que tange a obrigatoriedade de sistemas de gerenciamento de água de lastro conforme a Portaria 26/DPC de 2014 (CASTRO *et al.*, 2017).

1.8 Gestão de água de lastro a bordo

Diversos métodos de tratamento a bordo vêm sendo elaborados na tentativa de mitigar a descarga de espécies exóticas no porto de destino em consonância à legislação BWB (IMO, 2004) (NG *et al.*, 2018). Conforme Satir (2014) e Werschkun *et al.*, (2014) estas metodologias podem ser classificadas consoante mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Medidas de tratamento de água de lastro a bordo



Fonte: WERSCHKUN *et al.*, 2014.

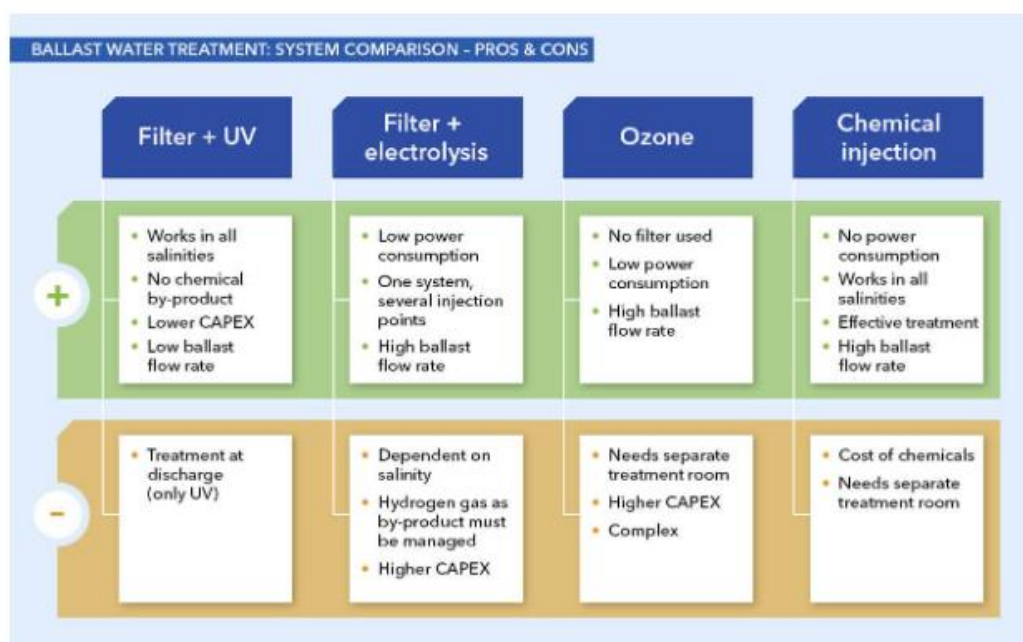
Quase 100% de eficácia é atingida quando os procedimentos são feitos de forma combinada: com tratamento primário (filtração) e posterior tratamento secundário, tais como irradiação Ultra Violeta (UV), ozonização, eletrocloridratação, entre outros (BRISKI *et al.*, 2015; CARNEY *et al.*, 2017; GROB; POLLET, 2016; SATIR, 2014; WERSCHKUN *et al.*, 2014).

A Figura 12 ilustra os principais prós e contras das mais habituais metodologias utilizadas para atender o padrão D-2.

Starliper *et al.*, (2015) utilizaram Hidróxido de Sódio para elevação de pH e comprovaram a diminuição da densidade populacional de algumas espécies de bactérias presentes em tanques de lastro, enquanto Árias-Lafargue (2014) sugerem que essa técnica seja usada em paralelo com outra de aquecimento da água com o próprio calor das caldeiras, que assim se resfriariam.

Os efeitos das metodologias de tratamento de lastro nem sempre são satisfatórios por vários motivos, e entre eles pelo simples fato de as águas serem diferentes em todo mundo, e desta forma necessitar de estudos de sinergia específicos, ou de estudos mais complexos tendo em vistas as inúmeras qualidades de águas mundiais (ZHANG *et al.*, 2017).

Figura 12 – Comparação de prós e contras dos principais sistemas de tratamento utilizados para o padrão D-2



Fonte: MARINE IMPACT, 2020.

Apesar de o ambiente marinho possuir propriedades naturais que limitam o estabelecimento da maior parte da microbiota patogênica, alguns subprodutos originados das metodologias de tratamento podem ocasionar a magnificação do problema após sua utilização (MORENO-ANDRÉS *et al.*, 2018). Wennberg *et al.*, (2013) aponta que alguns processos utilizados para desinfecção de tanques de lastro diminuem o número de bactérias viáveis aeróbicas, favorecendo a atividade das bactérias anaeróbicas.

Os tratamentos químicos podem gerar passivos com efeitos agudos pelo seu uso, como, por exemplo, a formação de fortes agentes oxidantes com efeitos de longo prazo que acabam por interagir com a biota, principalmente no tocante a efeitos hormonais e reprodutivos até interações genéticas e neoplasias (WERSCHKUN *et al.*, 2014).

A utilização de radiação ultravioleta (sozinha ou acompanhada de desoxigenação) é uma das metodologias mais utilizadas por seu alto grau de eficácia e eliminação de organismos (MORENO-ANDRÉS *et al.*, 2018). Esta metodologia, contudo, pode acabar gerando uma recolonização dos tanques por espécies sobreviventes, uma vez que a competição ou predação é diminuída (GROB; POLLET, 2016). No caso específico de bactérias, elas podem ser favorecidas pela matéria orgânica oriunda da morte de outros organismos, criando assim um microcosmo propício ao processo de colonização (WENNBERG *et al.*, 2013).

Como a esterilização total da água de lastro é praticamente impossível, adota-se na prática uma metodologia de minimização de risco (SILVA *et al.*, 2004) em que as metodologias de tratamento devem se preocupar com fatores como segurança, praticidade, baixo custo, eficiência e aceitação ambiental (SILVA, 2012).

Segundo a coluna do Engenheiro Senior Martin Olosson denominada “*Type-approved USCG-compliant ballast water treatment system now widely available*” do site *Marine Impact* (MARINE IMPACT, 2020), existiam em 2019 aproximadamente 60 sistemas de tratamento aprovados pela IMO, que tiveram que passar por testes de aprovação em laboratórios independentes credenciados; cerca de 30 mil embarcações operantes, no mesmo ano, ainda não possuíam nenhuma metodologia instalada. Ainda segundo Martin, esses tratamentos apresentam um custo total aproximado, variando entre 0,5 a 3 milhões de dólares por navio.

Quanto aos processos de troca de água de lastro, a metodologia considerada como de maior efeito preventivo é a troca em alto-mar (profundidade superior a 200 metros e a 200 milhas náuticas da terra mais próxima), em que geralmente os organismos costeiros ou de

água doce não sobrevivem, por se tratar de uma região com características desfavoráveis devido à temperatura baixa e escassez de nutrientes (ZANELLA, 2010). Um sério problema desta metodologia é a segurança da embarcação em alto-mar durante este processo, o que, aliado a fatores ambientais, pode representar determinantes de alto risco para a segurança da embarcação e sua tripulação (SILVA *et al.*, 2004). Compreensivelmente, em condições de navegação adversas, esse procedimento é evitado pelos capitães das embarcações.

De acordo com Silva *et al.*, (2004), as principais metodologias para a troca de água de lastro no mar são: (1) Deslastro total e carregamento subsequente/sequencial que consiste na troca quase total do volume dos tanques. As manobras devem ser realizadas em sequência, sendo um tanque por vez ou em pares. Esta metodologia se apresenta como a de maior eficiência, apesar dos problemas; (2) A operação em Fluxo Contínuo que compõe a troca do lastro sem esvaziar os tanques, enchendo-os com uma quantidade três vezes maior do que a armazenada e descarregando os tanques pelos suspiros no convés e (3) O Método Brasileiro de Diluição que envolve o carregamento da água de lastro através do topo do tanque e, simultaneamente, a descarga dessa água (deslastramento) através do fundo do tanque, na mesma vazão, de tal forma que o nível de água no tanque permaneça constante.

2 O FLAGELO: A CÓLERA

Durante toda a história da humanidade, os flagelos associados às doenças infectocontagiosas na população humana tiveram sua essência causal na vida em comunidade e como este aglomerado humano lidava com o ambiente a sua volta (ROSEN, 2000, 31p). No caso da Cólera, esta dinâmica não se apresentou de forma diferente. Com suas causas diretamente ligadas a questões socioambientais, majoritariamente a condições de saneamento básico, sendo este um ótimo indicador para direcionamento de ações preventivas (SILVA *et al.*, 2019).

A patologia sempre ocasionou altos acometimentos em todas as suas pandemias (FÉRNANDEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014). Graças à doença, temos hoje métodos investigativos de estudo em saúde pública, que foi preconizado por John Snow, o qual teve na Cólera sua motivação na busca de processos examinadores detalhados, sendo considerado o pai da Epidemiologia (PEREIRA; VEIGA, 2014).

Atualmente, em pleno século XXI, é difícil acreditar que a Cólera ainda consiga ser uma doença com elevadas taxas de incidência em regiões negligenciadas; a relação entre saúde humana e inacessibilidade a serviços básicos e pobreza é intrínseca (ARAÚJO *et al.*, 2013). Desta forma, a Cólera se apresenta, atualmente, como uma doença preocupante em todo mundo, principalmente pela sua severidade sintomática, resiliência do organismo e facilitadores socioambientais que, cada vez mais, contribuem para a vulnerabilidade das populações humanas, conduzindo ao flagelo.

2.1 Análise etimológica do termo “Cólera”

A palavra cólera tem sua raiz etimológica no grego “*kholé*”, que significa bile e do latim “*cholera*”, pois se acreditava, conforme a doutrina da patologia humoral que norteou o pensamento médico por mais de dois milênios, que o excesso de bile no organismo tornava a pessoa com “mau humor”; daí o adjetivo colérico, encolerizado ou bilioso (REZENDE, 1997). Embora a maioria dos léxicos indique o mesmo étimo para cólera, no sentido de ira, e Cólera, doença, o nome da doença aparentemente não se vincula à bile. Três outros étimos têm sido admitidos: (i) do grego *kholás*, ácfos, intestinos, (ii) do grego *kholédra*, as, calha para escoamento de águas e (iii) do hebraico *choli-ra*, doença terrível (REZENDE, 1997). Esta dupla sinonímia acaba por ocasionar, na Língua Portuguesa, o que chamamos de erros de gênero, e, em regras gerais, na língua culta nacional, palavras terminadas em “a” tendem a ser precedidas do artigo “a”, o que lhes confere uma conotação feminina. Não há, assim, como fugir da aceitação de que se deve dizer “a Cólera”, quando falamos da patologia e “o Cólera” quando o que tratamos é o agente etiológico da mesma (CANDEIAS, 1991; REZENDE, 1997).

2.2 Etiologia da Cólera

O *Vibrio cholerae*, o agente causal da cólera, pertence à família *Vibrionacea* que abriga oito gêneros (*Vibrio*, *Allmonas*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*,

Photobacterium e Salinivibrio), sendo o gênero *Vibrio* o mais numeroso, comportando aproximadamente 147 espécies (BACTERIO.NET, 2019).

As bactérias desta família são abundantes em ambientes aquáticos, suspensas na coluna d'água, em vida livre, parasitando plâncton ou tecido de vários organismos marinhos (CHOWDHURY *et al.*, 2017; KOKASHVILI *et al.*, 2015). Apresentam função ecológica de degradação da quitina, sendo capazes de serem patogênicas tanto para invertebrados como para vertebrados (RIVERA *et al.*, 2001). Podem ser classificadas quanto à quantidade de sais dissolvidos na água em halofílicos e não halofílicos (KOKASHVILI *et al.*, 2015).

O *V. cholerae* foi primeiramente observado ao microscópio por Filippo Pacini, em 1854, quando sua forma em vírgula foi descrita, sendo seu isolamento em cultura pura realizado em 1884 por Robert Koch (HARRIS *et al.*, 2012). É um bastonete encurvado, gram-negativo, com cerca de 1,4 - 2,6 μm de comprimento e apresenta um único flagelo polar.

Classicamente a Cólera se apresenta como uma doença diarreica aguda causada pelo *V.cholerae* do sorogrupo O1. Deste modo, os outros sorogrupos passaram a ser denominados *V.cholerae* não O1, estando esses envolvidos ocasionalmente em casos isolados de diarreia e de uma variedade de infecções extraintestinais (WHO, 2019).

A Figura 13 apresenta uma foto de microscopia de varredura de exemplares do *Vibrio cholerae*.

Figura 13 - Micrografia eletrônica de varredura de *Vibrio cholerae*



Fonte: Bacterian in Photos, 2018.

O *V.cholerae* do sorogrupo O1 pode ser dividido nos biotipos “*Classical*” e “*El Tor*” com base nos resultados de testes como de susceptibilidade à polimixina B, metabolismo do citrato, proteólise, hemólise, motilidade, produção de acetoína (Teste de Voges-Proskauer) e produção de biofilme. Ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os genes de uma adesina (*tcpA*) e de uma subunidade da toxina colérica (*ctxA*), seguidos do sequenciamento dos produtos obtidos também possibilitam essa diferenciação (SON; TAYLOR, 2011).

As amostras do sorogrupo O1 de *V.cholerae* possuem também três frações antigênicas de superfície (fatores A, B e C) que possibilitam sua divisão nos sorotipos *Ogawa* (frações A e B), *Inaba* (frações A e C) e *Hikojima* (frações A, B e C). Esses sorotipos não são completamente estáveis, podendo existir conversões antigênicas entre eles, particularmente em função de mutações no gene *wbeT* (KEDDY *et al.*, 2007).

Em 1992, uma amostra do sorogrupo não O1 de *V.cholerae* causou um grande surto de Cólera em Bangladesh e países vizinhos, substituindo as do sorotipo O1, dos biótipos *Clássico* e *El Tor*, que coexistiam nessa região. Esse clone epidêmico foi caracterizado como pertencente ao sorogrupo O139 *Bengal*, sendo prevalente nos anos de 1992 e 1993. Essa prevalência foi perdida para um novo clone de *V.cholerae* O1 do biótipo *El Tor*, que se manteve nos anos 1994 e 1995 (CHOWDHURY *et al.*, 2017; FARUCHE *et al.*, 1997).

Em 1996 ocorreu o ressurgimento do sorotipo O139 como a principal causa de Cólera em Calcutá, que passou a coexistir com as amostras do sorogrupo O1 do biótipo *El Tor* (CHOWDHURY *et al.*, 2017; FARUCHE *et al.*, 1997).

O genoma de *V.cholerae* O1 é constituído de dois cromossomos, I (maior) e II (menor). No cromossomo I, estão os principais genes relacionados às funções essenciais e viabilidade celular, bem como *locis* gênicos associados à virulência. No cromossomo II, estão genes envolvidos no transporte de açúcares, íons metálicos e ânions, na codificação de proteínas ribossomais, na transdução e no reparo do DNA, muitos desses essenciais para adaptação ao habitat natural de *V. cholerae*. Um exemplo claro dessa relação é a presença dos genes responsáveis pela codificação da quitinase, enzima envolvida na degradação da quitina presente em exoesqueletos do zooplâncton, no qual a bactéria, em geral, está associada ao ambiente marinho (HEIDELBERG *et al.*, 2000).

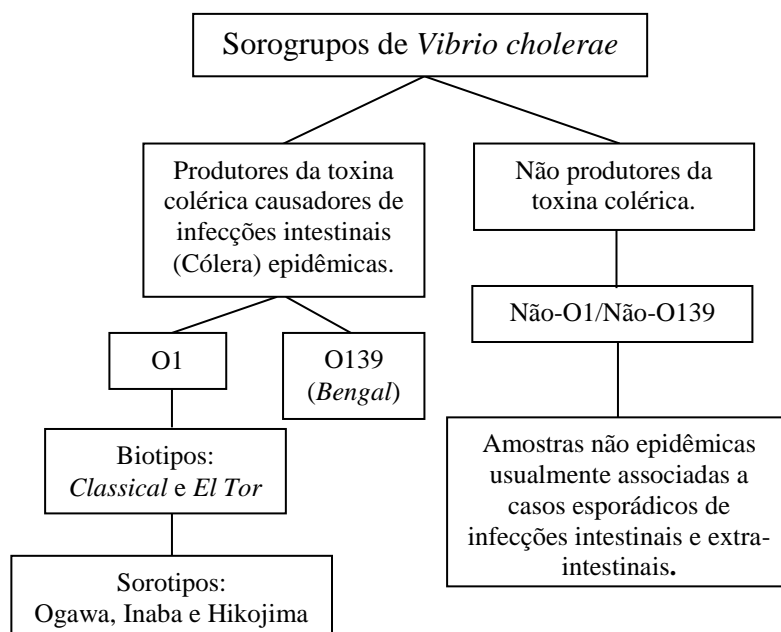
O cromossomo I abriga também a maior parte dos genes associados à virulência da bactéria, estando esses na Ilha de Patogenicidade de Vibrio (*Vibrio Pathogenicity Island* – VPI) como os genes *tcp* que codificam o *Pilus* Corregulador de Toxina (*Toxin Coregulated*

Pilus - TCP) e no elemento CTX, como os genes *ctxA* e *ctxB*, que codificam a toxina colérica (*Cholera Toxin* - CT). Também são encontrados genes envolvidos na coordenação da expressão dos genes de virulência, como o *toxR* (HEIDELBERG *et al.*, 2000).

Deste modo, as amostras de *V. cholerae* pertencentes ao sorogrupo O1 - e posteriormente ao O139 - foram reconhecidas como causadoras da infecção intestinal com características epidêmicas conhecidas para a Cólera (CHOWDHURY *et al.*, 2017).

Amostras pertencentes aos outros sorogrupos (não-O1/não-O139) são considerados como bactérias autóctones do ambiente costeiro e marinho, particularmente por não produzirem fatores de virulência como a a toxina colérica (CT) e o pilus de colonização (TCP) típicos das amostras epidêmicas (CHOWDHURY *et al.*, 2017). Apesar disso, podem causar casos esporádicos de diarreia (“*cholera-like diarrhea*”), bem como existem relatos da sua participação em infecções extraintestinais como infecções da pele, abscesso, celulite, fasciite necrotizante, endoftalmia, urinária, otite, colecistite, septicemia, meningite (CHEN *et al.*, 2015; CHOWDHURY *et al.*, 2017). Essas amostras não-O1/não-139, causadoras dessas infecções, possuem diferentes genes que codificam fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade, como o da toxina termo-estável (*nag-st*), da hemolisina (*hly*) e da CT (PURDY *et al.*, 2010). Uma visão esquemática dessa classificação é apresentada na Figura 14, adaptada de Fernández e Alonso (2009).

Figura 14 - Classificação do *V. cholerae*



Fonte: Adaptado de FERNÁNDEZ; ALONSO, 2009.

2.3 Fatores ligados à virulência do *Vibrio cholerae*

Os principais genes responsáveis pela patogenicidade dos sorogrupos O1 e O139, bem como os que atuam na sua regulação, estão localizados na ilha de patogenicidade VPI e no elemento CTX. Essas regiões do DNA bacteriano decorrem da inserção dos genomas dos fagos filamentosos VPIΦ e CTXΦ (KARAOLIS; KAPER, 1999).

Estudos indicam que esses genes de virulência, associados a estes elementos, ou seus homólogos, estão dispersos entre cepas ambientais de diversos sorogrupos, constituindo, assim, um reservatório desses genes, reforçando a possibilidade da origem ambiental de amostras patogênicas de *V.cholerae* (BOYD *et al.*, 2000; RAJANNA *et al.*, 2003).

Na ilha de patogenicidade VPI das amostras da 6ª (biotipo *Clássico*) e 7ª (biotipo *El Tor*) são codificadas 29 potenciais proteínas, algumas essenciais para a patogenicidade do *V. cholerae*, como as constituintes do TCP, requerido para a adesão e colonização do *V. cholerae* no intestino, e as reguladoras de genes de virulência como a *ToxT*, *TcpP* e *TcpH* (RAJANNA *et al.*, 2003).

2.3.1 A toxina colérica (CT) e o elemento CTX

A existência da CT como causadora da sintomatologia da Cólera foi sugerida pela primeira vez em 1884 por Robert Koch e sua existência foi demonstrada em 1959 por dois grupos de investigadores trabalhando independentemente na Índia com a introdução de filtrados ou lisados de culturas no trato intestinal de coelhos (KAPER *et al.*, 1995). A purificação foi realizada por Finkelstein e LoSpalluto (1969), que acabou por fundamentar vários trabalhos posteriores à descoberta da estrutura, receptores de ligação e modo ação da CT.

A CT pertence à classe de toxinas AB₅, constituída de uma única subunidade A (ctA) e um pentâmero de subunidades B (ctB). A subunidade CTB permite a ligação do complexo à superfície celular da holotoxina AB₅ nas células-alvo, e CTA possuem atividade catalítica, sendo, portanto, a holotoxina AB₅ necessária para seus efeitos tóxicos. As toxinas da classe AB₅, com base nas diferenças na sequência de aminoácidos e da atividade catalítica, são

subdivididas nas famílias da CT, da toxina de Shiga (ST) e a da toxina pertussis (PT) (KUMAR; TURNBULL, 2018).

Os genes *ctxA* e *ctxB*, que codificam as subunidades A e B da CT, são encontrados no elemento genético CTX que apresenta diferenças no biotipo das amostras do sorogrupo O1, particularmente no gene *rstR* (Clássico - CTX^{cla}; *El Tor* - CTX^{El Tor} ou CTX-1). Com a extinção do biotipo *Clássico* nos anos 1980, relacionado à emergência do biotipo *El Tor*, a partir 1962, foram detectadas amostras atípicas do biótipo *El Tor*. O sequenciamento do elemento genético CTX dessas amostras mostrou um mosaico de CTX^{cla} e CTX-1. Na costa do Golfo dos EUA, entre 1973 e 1986, também foram detectadas amostras do biótipo *El Tor* com um sequenciamento de CTX distinto (CTX^{USGulf}) (SAFA *et al.*, 2010).

O processo de síntese da CT ocorre, em um primeiro momento, com a secreção das subunidades A e B separadamente para espaço periplasmático, em que existirá a montagem e formação da holotoxina AB₅, que será posteriormente secretada para o meio extracelular através de um sistema denominado *Extracellular Protein Secretion* (EPS) (CHAUDHURI; CHATTERJEE, 2009).

A subunidade CTB permite a ligação da CT ao gangliosídeo GM1, um glicoesfingolípido presente na maioria das membranas celulares de células eucarióticas. Apesar de não ser um fator de virulência primário, sua ação possibilita a ligação da CT às células do hospedeiro (KAPER *et al.*, 1995). A subunidade CTA é responsável pelo papel tóxico da CT, sendo após sua secreção realizada através da membrana externa da bactéria clivada proteoliticamente nas cadeias A1 e A2, que permanecem unidas na holotoxina por pontes dissulfeto (KUMAR; TURNBULL, 2018).

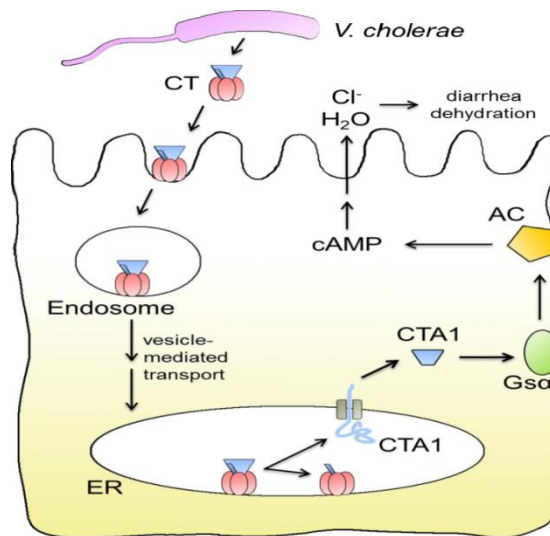
Após a ligação da holotoxina CT nas microvilosidades do bordo em escova das células do intestino delgado, existe sua internalização, e a vesícula endossômica, contendo a CT, segue por transporte retrógrado até o retículo endoplasmático, onde as subunidades A e B são separadas. Após a separação da subunidade A, a cadeia A1 é translocada para o citosol e catalisa a transferência de uma unidade ADP-ribose do NAD⁺ para um resíduo de arginina da proteína Gs, ou seja, uma ação de ADP-ribosiltransferase. Esta modificação na proteína Gs provoca a perda da capacidade de converter GTP para GDP. A manutenção de GTP ativado faz com que sejam produzidas quantidades cada vez maiores (> 100 x) de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), provocando a abertura dos canais de Cl⁻ na membrana celular. O resultado do aumento dos níveis de cAMP é um grande afluxo de Cl⁻ e água para a “luz”

intestinal, bem como a diminuição da absorção de NaCl, determinando a diarreia aquosa típica da doença (KAPER *et al.*, 1995, KUMAR; TURNBULL, 2018).

Os efeitos em voluntários (homens adultos e saudáveis) da administração oral da CT purificada junto com cimetidina e NaHCO₃, para neutralizar o ácido gástrico foi estudado por Levine *et al.*, (1983). A resposta de voluntários à toxina foi dose dependente. A ingestão de 5 µg da CT determinou em três voluntários cinco a seis evacuações com um volume total de fezes de 1,020 a 1,695 mL, sendo que, em um quarto voluntário, ocorrem 33 evacuações e o volume de fezes foi de 6,023 mL. Já a administração de 25 µg a dois voluntários determinou 47 a 50 evacuações, com um volume total de fezes de 21 a 22 litros. A duração do quadro de diarreia nos voluntários variou de 30 a 90 horas, dependendo da dose da CT.

Na Figura 15, é apresentado, esquematicamente, o mecanismo de ação da CT em contato com celular intestinal.

Figura 15 - Mecanismo de ação da toxina colérica



Fonte: VANBENNEKOM (2013).

2.3.2 Pilus corregulador de toxina (TCP) e a ilha de patogenicidade (VPI)

O TCP é um *pili* do tipo IV que está presente em muitas bactérias gram-negativas, podendo ser encontrado em pelo menos uma gram-positiva, sendo essenciais para a aderência

a células e colonização do hospedeiro (VARGA *et al.*, 2006). São estruturas longas, finas, flexíveis e capazes de promover a autoagregação, possibilitando às bactérias formar microcolônias, concentrando assim área de secreção da CT (MANNING, 1997).

O TCP apresenta uma importante inter-relação com a presença dos genes que codificam a CT, pois atua como receptor específico do fago CTXΦ, que carrega no seu genoma estes genes e possibilita a conversão fágica do *V. cholerae* em toxigênico (LI *et al.*, 2008). O principal constituinte do TCP é a proteína TcpA (*major pilin*) e sua síntese, como de outros componentes estruturais e de regulação, que é codificada por genes do *cluster tcp* que faz parte da VPI. Outro componente, a TcpB (*minor pilin*), atua na montagem e na retração do TCP (NG *et al.*, 2016).

A análise de amostras isoladas da 6ª (biotipo Clássico) e 7ª (biotipo *El Tor*) pandemias mostrou divergências no sequenciamento da VPI no gene *tcpA* ou ao seu redor. Em virtude da imunogenicidade do TCP, essa variabilidade pode decorrer de seleção natural, sendo possível que essas diferenças afetem a interação da bactéria com fagos que utilizem o TCP como receptor (KARAOLIS; KAPER, 1999). No *cluster tcp*, as diferenças entre os biótipos Clássico e *El Tor* são mais significativas na região intergênica *tcpI-tcpP* (89% de identidade), na *tcpH-tcpA* (87% de identidade) e no domínio de codificação C-terminal da *tcpA* (identidade de 77%) (OGIERMAN *et al.*, 1993; OGIERMAN *et al.*, 1996; IREDELL e MANNING, 1994a,b). Com relação ao sorogrupo O139, o sequenciamento do gene *tcpA* mostrou que este era idêntico ao do biotipo *El Tor* (RHINE; TAYLOR, 1994).

2.3.3 Outros genes associados à patogenicidade de *V. cholerae*

CT e TCP são imprescindíveis à patogenicidade de *V. cholerae*. Além desses, a análise do seu genoma permite a identificação de outros fatores de virulência, em particular que codificam enterotoxinas, cuja ação agrava a sintomatologia determinada pela CT.

No Quadro 1, proposto por Reild e Klose (2002), existe a apresentação dos principais genes relacionados à codificação desses fatores, bem como sua localização.

No elemento genético CTX, podem ser encontrados o gene da enterotoxina *Accessory cholera enterotoxin (ace)* e o gene da toxina das junções oclusivas *Zonula occludens toxin (zot)*. A *ace* estimula a secreção aniônica, de modo dependente de cálcio, induzindo o acúmulo de fluidos na luz intestinal (CHATTERJEE *et al.*, 2011). A enterotoxina

Zot interage com receptores das células das vilosidades intestinais do intestino delgado, com subsequente ativação de sinalização intracelular, levando à desorganização das zônulas de oclusão, aumentando a permeabilidade do epitélio intestinal (PÉREZ-REYTOR *et al.*, 2018).

Quadro 1 - Genes associados à patogenicidade e sua localização no genoma de *V. cholerae*

Gene name	Function	Location	Virulence (v)/environmental (e)
<i>ace</i>	M13 gene VI homologue formerly 'accessory enterotoxin'	CTX ϕ phage	v
<i>acfABCD</i>	accessory colonization factors, function unknown	VPI	v
<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase ToxT-activated	VPI	?
<i>aphAB</i>	regulatory proteins	chromosome	v
<i>cep</i>	M13 gene VIII homologue formerly 'core-encoded pili'	CTX ϕ phage	v
<i>chi</i> genes	chitinase homologues	chromosome	e
<i>ctxAB</i>	CT subunits A, B	CTX ϕ phage	v
<i>flrC</i>	flagellar transcriptional regulator	chromosome	v/e
<i>irgA</i>	iron-regulated outer membrane protein	chromosome	v
<i>msh</i> genes	type IV pili (mannose-sensitive hemagglutinin)	chromosome	e
<i>ompU, T</i>	outer membrane porins	chromosome	v/e
<i>orfU</i>	M13 gene III homologue	CTX ϕ phage	v
<i>rfb</i> genes	O-antigen biosynthesis	chromosome	v/e
<i>rst</i> genes	regulation, integration, replication	CTX ϕ phage	v
<i>rtxA</i>	'repeats in toxin' toxin, cross-links cellular actin	chromosome	?
<i>tagA</i>	ToxT-activated gene	VPI	?
<i>tcpA</i>	toxin co-regulated pili major subunit (type IV pili)	VPI	v
<i>tcpPH</i>	transmembrane regulatory proteins	VPI	v
<i>toxRS</i>	transmembrane regulatory proteins	chromosome	v/e
<i>toxT</i>	virulence transcriptional activator	VPI	v
<i>wav</i> genes	LPS core oligosaccharide synthesis	chromosome	v/e
<i>zot</i>	M13 gene I homologue formerly 'zonula occludens toxin'	CTX ϕ phage	v
<i>vps</i> genes	exopolysaccharide synthesis	chromosome	e

Fonte: adaptado de REIDL; KLOSE (2002).

A função destas outras toxinas, que não a CT, na patogênese da cólera, ainda não é totalmente conhecida, não conseguindo elas, somente, causar a enfermidade (LEVINE *et al.*, 1988). Estas podem contribuir no processo diarreico e outros sintomas observados em acometimentos por cepas CT negativas (KAPER *et al.*, 1995).

Estudo de SIRIPHAP *et al.*, (2017) evidencia uma alta variação genética de cepas, de amostras ambientais e clínicas da Tailândia, demonstrando que características genéticas se apresentam de forma variada e nem sempre são assertivas na caracterização de potencial de virulência. .

A Figura 16 mostra a variabilidade da presença de genes associados à virulência, em cepas do *V. cholerae*, conforme estudo de Siripahp *et al.*, (2017).

2.3.4 Transferência gênica horizontal do *Vibrio cholerae*

A interação de cepas não patogênicas com outras patogênicas pode conferir os artifícios toxigênicos por processo de conjugação bacteriana (CHIANG; MEKALANOS 1999). Fato comprovado por Figueiredo *et al.*, (2005) ao analisar genomas de cepas patogênicas, ao perceber a flexibilidade de aquisição de expressão gênica para produção de CT em duas regiões do DNA microbiano. Estudos de Faruque *et al.*, (1997) demonstraram a possibilidade de conversão de cepas não toxigênicas em toxigênicas, pelo fago de transcrição com toxina colérica, quando em contato com o ambiente gastrointestinal. Segundo Chowdhury *et al.*, (2017), pressões ambientais tais como resistência do hospedeiro, salinidade, pH, temperatura entre outros pode desencadear um processo mutacional no organismo, conferindo o ferramentário toxigênico ao organismo.

Na emergência do *V.cholerae* O139, duas hipóteses surgiram para explicação do aparecimento desta nova cepa: (i) a aquisição de genes da toxina colérica e outros fatores de virulência, pelo sorogrupo não O1 através de processo de conjugação bacteriana e (ii) a perda da capacidade de produção de antígenos O1 e aquisição da produção de antígenos O139, pelo sorogrupo O1, pelo mesmo processo de conjugação (KARAOLIS; KAPER, 1999). Alguns estudos mostram a mutação do *El Tor* para O139 (BIK *et al.*, 1995; COMSTOCK *et al.*, 1995), e outros apontam para a probabilidade de uma forma não O1 também adquirir as características toxigênicas (BROWN *et al.*, 1999). Estudos amostrais de Karaolis *et al.*, (1995) e Rivera (1995), isolados da sexta e sétima pandemias (*Clássico* e *El Tor* respectivamente) indicaram a possibilidade destes serem derivados da forma não patogênica, que se modificaram pelo processo de transferência horizontal, resultando, assim, em novas formas de emergência. Outro estudo Klinzing *et al.*, (2015), em isolados da sétima pandemia da Indonésia, aponta mutação de cepas O1 para O139 e/ou possível hibridismo.

2.4 **Histórico da Cólera**

Além de todas as formas de transmissão, o vibrio colérico pode se espalhar globalmente no intestino de pessoas assintomáticas, o que dificulta a determinação exata dos locais de origem (HENDRIKSEN *et al.*, 2011). Segundo registros históricos, que datam de

400 a 500 a.C., a doença é originária da Ásia (especificamente da Índia), com propagação em rituais Hindus. Quando os peregrinos se banhavam no rio Ganges e retornavam às suas regiões de origem davam origem a diversos surtos epidêmicos paralelos (ROSEN, 2000). Durante o período das grandes navegações, a Cólera teve grande expansão pelo transporte de pessoas, fato este que veio a se repetir durante o século XIX pelo mesmo motivo (FÉRNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014).

A primeira pandemia de Cólera, conhecida como Cólera Asiática (LIPPI; GOTUZZO; CAINI, 2016), teve sua origem na região de Bengala (atualmente dividida entre Bangladesh e Índia), em 1817, causando mais de 20.000 mortos durante a primeira semana (FÉRNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014). Alastrou-se rapidamente pela região de Calcutá e do delta do rio Ganges para Malásia, Singapura, Bangkok, Filipinas e China, acompanhando a peregrinação dos praticantes hindus e a navegação, chegando ao Japão em 1822 e atingindo posteriormente a Síria pelos rios Tigres e Eufrates (GUZMÁN; MONTES, 2000).

A segunda pandemia teve seu início em 1826, na China, e se disseminou pela região da Mongólia, Pérsia e Europa pelo Mar Cáspio, Norte da África e chegando às Américas, por meio da navegação, no Canadá e Estados Unidos (FÉRNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014). A doença se aprofundou em Meca, em 1831, trazida pelos peregrinos mulçumanos vindos da Índia, e, nos anos seguintes, atingiu países americanos como Cuba, Guiana, México, Guatemala, Nicarágua, Panamá, Jamaica, Brasil e Colômbia (este pelo porto de Cartagena), que registraram casos da Cólera (QUEVEDO, 1992).

Em 1852, a terceira pandemia tomou corpo na região da Índia, atingindo rapidamente a Indonésia, Pérsia, Mesopotâmia e Europa, avançando, em 1853, para os Estados Unidos, Colômbia, Venezuela, Argentina, Brasil, Uruguai, China, Japão e territórios da África (SNOW, 1999). Em 1854 ocorreu a descrição microscópica do *Vibrio cholerae* por Filipo Pacini e os trabalhos de John Snow sobre a relação da doença com a água são reconhecidos (SNOW 1999; ROSEN, 2000).

Durante a quarta pandemia (1863 a 1875), considerada uma das mais catastróficas devido aos altos índices de morbi-mortalidade, os primeiros casos foram registrados no Peru, Bolívia, Estados Unidos e Europa, ocasionando quase 260 mil registros na Rússia (FÉRNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014), na Índia 360 mil e na Europa 450 mil acometimentos (BELTRÃO, 2007).

Entre os anos de 1881 e 1886 (quinta pandemia), a doença castigou severamente a cidade de Nova Iorque (EUA). Na Rússia, neste mesmo período, foram registrados cerca de 800 mil casos (GUZMÁN; MONTES, 2000)

Na sexta pandemia, a expansão da Cólera foi favorecida pela Primeira Guerra Mundial, chegando a quase todos os países participantes do conflito (FÉRNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014).

Em 1961 iniciou-se a sétima pandemia com epicentro na Indonésia, estendendo-se pela Índia e região do Oriente Médio. Na Indonésia, a magnitude dos casos foi favorecida por períodos de tempestades e enchentes (KLINZING *et al.*, 2015). Em 1973 alcançou a Europa e África, castigando particularmente a Itália e a Nigéria (GUZMÁN; MONTES, 2000). Nesse período, foi constatada a eficiência do processo de hidratação como recurso terapêutico em refugiados da guerra que ocorria entre a Índia e o Paquistão (QUEVEDO, 1992).

Antes do início da sétima pandemia, o continente americano não registrava nenhum caso da doença desde 1962. Em 1991, na ocasião da sua chegada, foram registrados cerca de 322 mil casos somente no Peru (HARVEZ; ÁVILA, 2013). A doença se alastrou para o Equador, Colômbia, Brasil, Bolívia e México, existindo especulações que, nesses dois últimos países, a disseminação foi favorecida pelo movimento de guerrilha e tráfico de drogas (BAHAMONDE, 2013). No ano de 2000, 21 dos 35 países do Continente americano já haviam sido atingidos pela Cólera (CALLABRA; MARQUETTI, 2013).

As pandemias de Cólera, com suas respectivas extensões temporais e continentais e origens estão representadas na Figura 17.

Quando a doença chegou ao território latino-americano, não recebeu a devida atenção, podendo este fato explicar a não notificação de casos registrados desde 1850 nesta parte do Globo (LEWINSOHN, 2003).

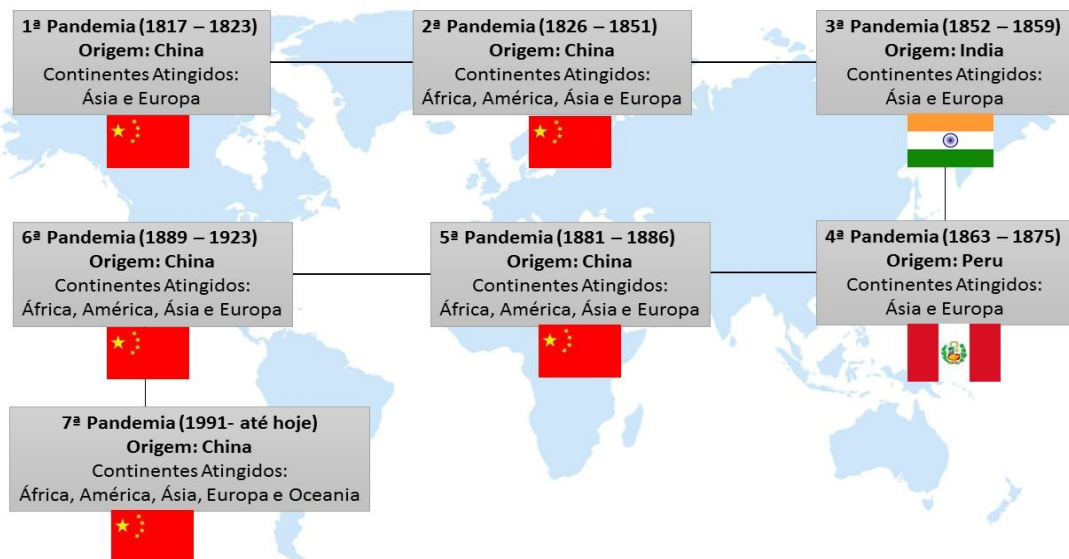
Durante a segunda pandemia, ela entrou no continente americano favorecida pela dinâmica de navegação nos Estados Unidos e Canadá (FÉRNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014).

Já na terceira pandemia, em 1855, a doença foi introduzida no Brasil por tripulantes de uma embarcação oriunda da cidade do Porto (Portugal). Na cidade de Grão-Pará (Pará), a doença rapidamente se alastrou para Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro (BELTRÃO, 2007).

Poucos trabalhos sobre a doença são descritos no Brasil colonial; contudo, entre eles, destaca-se o de Copper (1986), que vem a preencher um hiato importante, descrevendo, de forma detalhada, como a epidemia invadiu, de 1855 a 1856, o território brasileiro,

ocasionando cerca de 200 mil mortes em uma população de aproximadamente 8 milhões de habitantes.

Figura 17 - Pandemias de Cólera



Fonte: Adaptado de Fernández-Flórez; Cáceres-Manrique (2014).

A Cólera chegou ao Rio de Janeiro, em julho de 1855, por intermédio de um escravo que veio a bordo de uma embarcação oriunda de Salvador. Na ocasião foram registrados até 180 óbitos/dia somente no mês de novembro, atingindo cerca de 5 mil óbitos até julho de 1856, na grande maioria dos casos acometendo negros (KODAMA *et al.*, 2012).

No início da década de 1960, a Cólera ressurgiu em solo brasileiro, durante a quarta epidemia, no estado de Santa Catarina e Mato Grosso, com aproximadamente 4 mil casos e 1 mil óbitos (BELTRÃO, 2007).

Segundo Gerolamo e Penna (2000), até 1991 o Brasil era uma área indene para a Cólera, contudo a epidemia assolou o país, oriunda da China, que se disseminou para países da Ásia, Oriente Médio, África e regiões da Europa, com casos eventuais nos Estados Unidos desde 1970. Esta pandemia chegou ao solo latino-americano pela costa do Peru, em 1991, e posteriormente para 14 países sul-americanos, entre eles o Brasil, onde a introdução se deu pela região Amazônica no alto Solimões e foi se alastrando, progressivamente, pela Região Norte (PASSOS, 1999). Os primeiros casos da doença, referentes a essa pandemia, foram

registrados em abril de 1991, nos municípios de Benjamim Costant e Tabatinga (GEROLOMO; PENNA, 1999).

Após sua introdução, a doença se disseminou na região Nordeste, em função das condições precárias de saneamento e qualidade de vida da população principalmente nos bolsões de pobreza das periferias dos grandes centros urbanos (PASSOS, 1999). O silêncio dos meios de comunicação e o desconhecimento por parte da população sobre a doença, assim como a letargia das autoridades e organismos nacionais de saúde pública só foi quebrado quando os níveis de incidência alcançaram valores alarmantes (GEROLOMO; PENNA, 1999).

Na época, a vulnerabilidade de outras regiões brasileiras, principalmente nos bolsões de pobreza ocorrentes nas periferias dos grandes centros urbanos (PASSOS, 1999), dá-se exatamente pelas condições precárias de saneamento e da falta de informação sobre a Cólera, também chamada de “*O Mal do Ganges*” (BELTRÃO, 2007).

Uma das principais preocupações sobre o ressurgimento de casos de Cólera na época era a descoberta de marcadores socioambientais que pudessem orientar ações de controle e prevenção, assim como interagir com políticas públicas no combate da enfermidade (GEROLOMO; PENNA, 2000).

Segundo Beltrão (2007), durante muito tempo, a crença em controle preventivo das doenças infectocontagiosas, por meio da vacinação e tratamento à base de medicamentos, ações no ambiente, tais como saneamento, foram esquecidas, não sofrendo investimentos e modificações significativas.

Em 1999, a doença atingiu a cidade portuária de Paranaguá (Paraná), registrando 467 casos com três óbitos (LEWINSOHN, 2003). Este fato se apresentou como inesperado, já que a região acometida apresentava um grau de desenvolvimento urbano maior que a Região Nordeste, seja na questão de moradia como no saneamento básico, o que levantou questões instigantes sobre a origem e transmissão do problema, criando assim um quadro de incertezas e especulações (GEROLOMO; PENNA, 1999). Não se deve, contudo, descartar nenhuma hipótese na explicação deste caso, assim como a ocorrência de outros mecanismos de transporte do agente, como apontado por McCarthy e Khambaty (1994) sobre possíveis introduções por água de lastro.

Na Região Nordeste, após o auge em 1999 (4.279 casos), a incidência da doença foi reduzida a 733 casos no ano 2000 e a 7 casos no ano 2001. Entretanto, ela reapareceu em

2004 (21 casos) e em 2005 (5 casos), sempre na Região Nordeste, sendo considerada erradicada nos anos seguintes (BRASIL, 2010).

O quantitativo de casos registrados da doença em solo brasileiro entre os anos de 1996 e 2005 estão representados na Tabela 3.

Em estudos conduzidos por Mendes-Marques *et al.*, (2013), utilizando a técnica de *Swab*, foram isoladas 30 cepas do sorogrupo 01 na bacia hidrográfica do Rio Capibaribe (Pernambuco), o que mostra que o organismo ainda está presente em solo brasileiro.

Tabela 3 - Casos confirmados de Cólera por região do Brasil (1996 - 2005)

Região	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Norte	81	48	17	0	0	0	0	0	0	0	0	146
Nordeste	936	2.996	2.728	4.279	733	7	0	0	21	5	0	11.705
Sudeste	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	13
Sul	0	0	0	467	0	0	0	0	0	0	0	467
Centro-Oeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	1.017	3.044	2.745	4.759	733	7	0	0	21	5	1	12.332

Nota: (*) dados sujeitos à revisão.

Fonte: BRASIL, (2010).

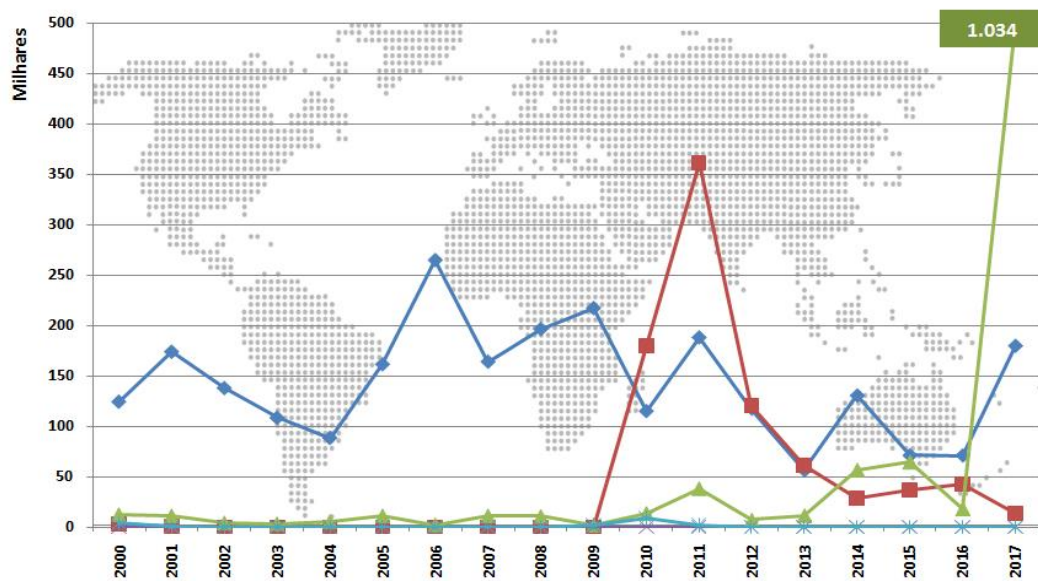
2.4.1 *Status Quo*

A atual situação da Cólera no mundo paira sobre as novas potencialidades etiológicas com origem em processos de interatividade com determinantes antrópicos, que acabam por gerar um processo mutacional ou de resistência em bioagentes já existentes, assim como o aumento do campo de atuação dos mesmos (GRISSOTI, 2004).

A problemática do saneamento, que, sem dúvida, é o principal agente magnificador da Cólera, encontra-se fortemente associada ao modelo econômico (SILVA, 2019a). Atualmente, as fronteiras políticas e distâncias entre as nações não são mais empecilho para a propagação rápida de uma enfermidade infectocontagiosa, pois, em questões de minutos, horas ou dias, um simples surto pode facilmente adquirir o patamar de pandemia.

A Cólera é um dos principais problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, principalmente em áreas de ocorrência de populações negligenciadas (NADRI *et al.*, 2018). Entre os anos de 2000 e 2016, aproximadamente 83% dos casos mundiais ocorreram somente na região da África e Ásia, principalmente em períodos de chuvas (RIECKMANN *et al.*, 2012), conforme representado Figura 18.

Figura 18 - Morbidade mundial da Cólera entre 2000 e 2017



Lengenda: ◆ África ◆ América ◆ Ásia ◆ Europa ◆ Oceania

Fonte: Adaptado de WHO, (2017).

Atualmente o cenário se mantém; e países destes dois continentes são responsáveis por quase 99% dos casos em todo o mundo, principalmente porque estas regiões experimentam problemas graves de saneamento e desigualdades sociais (DONADEU *et al.*, 2009).

Durante o período de 2010 a 2017, a Cólera se apresentou como um gravíssimo problema de saúde pública em todo o planeta, com grandes epidemias, como as que ocorreram no Haiti e no Iêmen, e surtos de doenças endêmicas em áreas da África subsaariana e da Ásia (DONADEU *et al.*, 2009).

A patologia se apresenta como uma doença grave de notificação compulsória e imediato globalmente (BRAGA; WERNECK, 2009, p.106) e, desde 2013, a OMS e a Organização Panamericana de Saúde (OPA) lançaram um alerta da doença em todo o

continente Americano, principalmente pelos casos ocorridos no Haiti, República Dominicana e Cuba (FERNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014).

Um fator preocupante, principalmente em países com populações negligenciadas, são os problemas com as subnotificações, pois muitos subestimam a potência da infecção. Segundo Ali *et al.*, (2012), os dados mundiais totais de incidência de Cólera, disponibilizados pela Organização Mundial de Saúde, expressam somente de 5 a 10% da realidade, em que cerca de 2,86 milhões de casos ocorrem anualmente com cerca de 95 mil mortes.

Na África e na Ásia, a Cólera persistiu durante todas as sete pandemias, apresentando-se nas regiões de forma endêmica ou epidêmica, com alta taxa de mortalidade, contribuindo, assim, para a manutenção de outras crises, como a fome e os conflitos armados (LESSLER *et al.*, 2018). Em Uganda, no período de 2011 a 2015, nas regiões que registraram maiores números de casos da doença, mais de 50% da população não possuíam latrinas em suas casas, sendo comum a prática de fecalismo ao ar livre, próximo a mananciais utilizados como fonte de água de consumo, para pesca e recreação, sendo observado que a população acometida tinha mínima ou nenhuma informação sobre prevenção da Cólera (BWIRE *et al.*, 2017). Observações semelhantes foram feitas em um estudo realizado no Kenya, quando, em 2015, ocorreu o ressurgimento da doença (COWMAN *et al.*, 2017). Os países europeus e norte-americanos, segundo Somboonwit *et al.*, (2017), conseguiram se livrar, por anos, do perigo da Cólera com investimento em saneamento básico.

O Haiti, a primeira república negra do mundo, possuía, em 2010, uma população de 10 milhões de habitantes (UNO, 2017) e sua história é marcada por uma série de governos ditatoriais, conflitos civis, problemas socioeconômicos, quadros graves de injustiça e desigualdades sociais, uma população com alto índice de subnutrição, e com um sistema de saneamento extremamente precário, em que práticas de fecalismo ao ar livre ainda persistiam. Este país amargava o título de país mais pobre das Américas, com um Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0,404 e o menor Produto Interno Bruto (PIB) entre os países americanos (CALLABRA; MARQUETTI, 2013; FERNADEZ-FLÓREZ; CÁCERES-MANRIQUE, 2014). O país foi acometido, em 2010, por um terremoto de magnitude sete na escala Richter, que destruiu várias cidades e causou um número elevado de mortos e feridos, agravando, ainda mais, o quadro de degradação sanitária e social da região (GONZALEZ *et al.*, 2011). Este cenário apresentou um campo fértil para a instalação do surto de Cólera iniciado no mesmo ano, que apresentou 30 mortes em um único dia na área rural no entorno da capital de Porto Príncipe (PIARROUX *et al.*, 2011).

Todo o quadro de caos que se instalou no Haiti foi observado na epidemia de Cólera ocorrida em Moçambique entre os anos de 1973 e 1992, em decorrência de fatores magnificantes análogos: menor PIB da África, alta densidade populacional, Guerra Civil e problemas de saneamento (ARAGON *et al.*, 1994). Atualmente a dinâmica de globalização acaba por criar condições dinâmicas nos processos infectocontagiosos, pois a patologia pode rapidamente se tornar uma epidemia, e, posteriormente, uma pandemia, como, por exemplo, ocorreu com a disseminação da doença para os países vizinhos do Haiti.

O quantitativo de incidência da doença no continente americano entre os anos de 2010 e 2016 está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Casos de Cólera na América Norte e Central entre 2010 e 2016

Países	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Canadá	2	9	0	1	4	3	1
Chile	0	1	0	2	24	0	0
Cuba	0	0	417	181	76	0	0
Haiti	179.379	340.311	112.076	58.809	27.753	36.045	41.421
México	1	1	2	187	14	1	0
República Dominicana	195	20.851	7.919	1.954	603	546	1.159
Estados Unidos	15	42	18	14	14	4	14
Venezuela	0	49	0	4	0	0	0

Fonte: Adaptado de WHO, 2017.

Em pleno século XXI, a Cólera, mundialmente de forma generalista, apresenta-se como uma doença com altas taxas de morbidade e mortalidade, tendo sua principal causa em precariedade nas condições de saneamento básico (WHO, 2017), contribuindo, assim, para a preocupação de ações sociais preventivas e de caráter de monitoramento nos corpos d'águas, principalmente os de abastecimento urbano, coleta de pescados ou recreação.

2.5 Aspectos epidemiológicos da Cólera

Entende-se por vigilância epidemiológica o conjunto de ações, com objetivo de proporcionar conhecimento, detecção e prevenção de qualquer condicionante que possa interagir na vulnerabilidade de saúde de uma população, assim como propor medidas de controle no tocante a uma referida doença (WHO, 2006, 15p).

No que tange à Cólera, o conhecimento e comportamento das demais doenças diarreicas que assolam o local são medidas necessárias para que se realize uma vigilância de forma mais eficiente, assim como o estabelecimento de vias de entrada e áreas de risco e monitoramento quali-quantitativo de casos (BRASIL, 2010).

As observações realizadas por John Snow são congruentes com a função da vigilância epidemiológica e foram as primeiras a estabelecer uma correlação entre a contaminação com o consumo de água de poço contaminada por fezes e a epidemia de Cólera que assolava Londres. Possivelmente, este foi o primeiro estudo sobre a ecologia do *V. cholerae*, estabelecendo as bases da moderna epidemiologia e demonstrando como essas informações poderiam ser aplicadas como estratégia de controle da disseminação das infecções (SNOW, 1999, 28p).

A ocorrência de bactérias em vida livre no ambiente aquático é bastante limitada, devido às condições desfavoráveis como a falta de nutrientes e a temperatura da água; as bactérias tendem, contudo, a se adaptar às adversidades ambientais, o que pode representar uma profunda influência com processos de doenças, principalmente as emergentes (WEINER, 1999).

O vibrião colérico é autóctone de ecossistemas aquáticos favoráveis, contrariando o pensamento de que os mesmos chegaram aos mananciais advindos do trato digestivo humano (SILVA *et al.*, 2015). Esta ideia, de que esse patógeno tinha como habitat o intestino humano e que sobreviveria no ambiente aquático somente por curto período, ainda prevalecia no final dos anos 1970 (COLWELL *et al.*, 1977).

Diferentes estudos, em áreas onde a Cólera era não endêmica, detectaram a presença de amostras de *V. cholerae* não toxigênico, sugerindo que a associação com hospedeiros humanos era um pequeno aspecto do ciclo de vida dessa bactéria e desnecessário para sua persistência no ambiente aquático (LUTZ *et al.*, 2013).

O ambiente estuarino é considerado como reservatório de populações das espécies de vibrios (KAYSNER; HILL, 1994) e o *V. cholerae* tem como habitat uma vasta área geográfica (ALBERT *et al.*, 1993; HUQ *et al.*, 2005), e essa capacidade de sobreviver em diversos nichos ambientais decorre, em grande parte, da evolução de respostas adaptativas a estressores, como, por exemplo, a privação de nutrientes, flutuações de salinidade, alternância a temperaturas e resistência à predação por protistas heterotróficos e bacteriófagos (LUTZ *et al.*, 2013).

Como estratégia de resistência durante condições desfavoráveis, o *V.cholerae* tem como ação a conversão em formas viáveis, mas não cultiváveis “*Viable But Non-Culturable*” (VBNC) (COLWELL, 2000; THOMAS *et al.*, 2006). Neste estado, a bactéria, apesar de metabolicamente ativa, perde a capacidade de se multiplicar em meios de cultura de uso rotineiro, podendo sair deste estado quando introduzida em intestino humanos (WU *et al.*, 2016). Fatores como salinidade, temperatura, pH, oxigênio dissolvido, assim como radiação solar podem influenciar este fenômeno (FERNÁNDEZ-DEGALDO *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016). Sob a forma viável, mas não cultivável, estes, ao entrar em contato com organismos possuidores de quitina ou intestino humano, podem voltar a sua forma viável, reafirmando o descrito acima (FERNÁNDEZ-DEGALDO *et al.*, 2015). Outra estratégia que o vibrio colérico dispõe contra os estresses ambientais é a associação com superfícies abióticas e bióticas (quitinoso e gelatinoso de origem animal ou vegetal do plâncton) formando biofilmes (HUQ *et al.*, 1996; AKSELMAN *et al.*, 2010; SHIKUMA; HADFIELD, 2010). Esta conexão acaba por permitir um meio de dispersão, quando esta associação se dá por hospedeiro móvel (COSTERTON *et al.*, 1995; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004).

Segundo Colwell e Huq (1994), existe uma influência positiva entre a disponibilidade de íons Na^+ e o crescimento de *V.cholerae* em ambiente aquático, que pode contribuir para uma maior resistência da bactéria a agentes químicos, tais como sais de cloro e alumínio, bem como confere maior proteção quanto à ação dos ácidos do suco gástrico no trato digestório humano (CHOWDHURY *et al.*, 2017).

Quanto a fatores físico-químicos dos ambientes aquático, como salinidade, pH e temperatura, o vibrio colérico se mostra como organismo euribionte, com ocorrência em amplas faixas destes parâmetros, conforme dados levantados nos resultados deste trabalho. Montilla *et al.*, (1996), entretanto, em ensaios laboratoriais, mostraram que, em condições diferentes de salinidade 15, 30°C de temperatura e pH de 8.5, ocorre dificuldade de isolamento de cepas toxigênicas de regiões endêmicas.

Outro estudo laboratorial de Miller *et al.*, (1984) apontou que cepas sorogrupo O1 sobreviveram a temperaturas de 25°C, com salinidade entre 0 e 3 e pH entre 7.0 e 8.5. Em cultivos de cepas ambientais por Huq *et al.* (1984) e Kokashvili *et al.* (2015), foi verificado que salinidade na faixa proximal de 15, temperatura acima de 30°C e pH por volta de 8.5 são as faixas ideais para sobrevivência do organismo, conforme os experimentos, e que estes valores podem ser mais variáveis quando o vibrio se encontra associado a copépodos.

Estudos de Kenyon *et al.*, (1983) isolaram cepas não O1 de amostras ambientais marinhas com salinidades entre 3.0 e 31.7, assim como Rivera *et al.*, (2013) em amostras de tanques de lastro. Silva *et al.*, (2015) identificaram cepas não-O1 em águas da Baía de Guanabara (RJ/Brasil) em condições de salinidade acima dos 20.

2.5.1 Transmissão da doença

O papel crítico da água na transmissão da Cólera foi precocemente reconhecido, sendo este claramente demonstrado por John Snow durante a segunda pandemia da doença, quando observou que os casos da Cólera se distribuíam predominantemente ao redor de poços públicos abastecidos por uma bomba d'água no distrito de Soho em Londres (SNOW, 1999). A captação da água por esta bomba se dava no rio Tâmsa em um ponto abaixo dos grandes despejos de esgoto, chegando à conclusão que a disseminação da doença ocorria por água contaminada com fezes contendo o vibrião colérico (KAPER *et al.*, 1995; LIPPI; GOTUZZO; CAINI, 2016).

A transmissão se dá preferencialmente pela ingestão de água contaminada com o vibrião colérico. Eventualmente a transmissão pode ocorrer pela veiculação da bactéria por alimentos lavados com água contaminada. Para que ocorra a doença, é necessária a ingestão de uma dose infectante elevada (10^8 a 10^{11} bactérias), em função da sensibilidade da bactéria ao pH ácido estomacal (CHIANG; MEKALANOS, 1999).

Um ponto de atenção, no tocante à transmissão da Cólera, é que cerca de 75 a 80% dos infectados não desenvolvem os sintomas, mas representam importante rota de transmissão da doença (NADRI *et al.*, 2018).

Os alimentos podem se tornar uma fonte de contaminação do *V.cholerae*, em particular os frutos do mar consumidos sem cocção ou cocção parcial, pois estes podem se contaminar a partir de fontes ambientais e servir como veículo tanto em situações endêmicas quanto epidêmicas (KAPER *et al.*, 1995).

Pereira *et al.*, (2007), em estudo de pesquisa histológica, encontrou presença de vibrios, entre eles o *V.cholerae* não O1 em amostras de mexilhões disponíveis para consumo humano. Outros trabalhos citados na sessão 1.2.5.2 (“Associações Ecológicas”) relatam a presença do vibrio em outras espécies utilizadas para consumo humano.

A possibilidade de veiculação da bactéria por vegetais crus consumidos na forma de saladas, sem cocção prévia, foi observada durante a sétima pandemia de Cólera em Santiago no Chile. A região metropolitana dessa cidade conta com suprimento de água de consumo tratada, com controle bacteriológico regular, contudo parte do esgoto da região não possui tratamento e, em algumas épocas (verão sem chuvas), é utilizado na irrigação de vegetais. Essa prática já havia sido incriminada como um dos fatores responsáveis por manter a endemicidade da febre tifóide em Santiago, sendo agora responsabilizada pela transmissão da Cólera.

O *V.cholerae* foi isolado das águas residuais usadas para irrigar essas culturas e, após o início do surto, o governo proibiu a venda em restaurantes e lanchonetes de saladas contendo vegetais crus, bem como realizou uma campanha agressiva na mídia alertando a população sobre os perigos dessa prática de cultivo dos vegetais, medidas estas que contribuíram no controle da disseminação da doença (LEVINE, 1991).

Outra possibilidade, comum nas doenças de transmissão fecal-oral, seria a contaminação dos alimentos durante a manipulação. Em 1986, durante a epidemia de Cólera na Guiné, África Ocidental, Louis *et al.*, (1990) realizaram dois estudos epidemiológicos sobre fatores de risco para transmissão da doença. Foi observado que o consumo de sobras de alimentos de uma refeição principal, consumidos em outras refeições sem conservação por refrigeração e sem reaquecimento, estava envolvido com casos de Cólera mais frequentemente que outros alimentos. Nesse estudo foi mostrado que os membros das famílias estudadas possuíam o hábito de, na refeição, compartilharem com as mãos o alimento diretamente da panela onde foram preparados.

A multiplicação da bactéria no alimento, introduzida possivelmente pelas mãos contaminadas de portadores assintomáticos foi possível, pois o alimento envolvido (molho de amendoim) apresentava condições adequadas (pH 6,0) ao crescimento do *V. cholerae*, como comprovado em avaliações laboratoriais. Essa forma de contaminação dos alimentos diferia consideravelmente das formas até então descritas que envolviam alimentos cuja contaminação se dava por contaminação do seu ambiente de produção ou na manipulação do alimento imediatamente antes do consumo.

O comércio de alimentos produzidos em áreas endêmicas de Cólera pode representar um risco aos países importadores. Em agosto de 1991, foi descrito em Maryland, por Taylor *et al.*, (1993), o primeiro surto de Cólera nos Estados Unidos causado por um alimento importado: o alimento em questão foi leite de coco congelado importado da Tailândia, sendo

que investigações no local de produção evidenciaram contaminação das superfícies de manipulação desse alimento por água contaminada com a bactéria.

Em voluntários saudáveis da América do Norte, foram necessárias doses de 10^{11} UFC de *V.cholerae*, administradas em solução salina tamponada (pH 7,2), para causar diarreia. Quando a acidez estomacal foi neutralizada pela administração de 2 g de bicarbonato de sódio imediatamente antes da administração do inóculo bacteriano, a dose infectante para 90% dos indivíduos foi reduzida para 10^6 UFC. Essa dose foi semelhante à observada quando da ingestão de arroz e peixe; contudo, existia o acometimento de 100% dos indivíduos estudados (KAPER *et al.*, 1995).

Poucos dados estão disponíveis sobre a dose infectante que ocorre durante as epidemias de Cólera. Embora as condições possam variar consideravelmente de uma comunidade para outra, os estudos sugerem que a dose na natureza está na faixa de 10^2 a 10^3 (GLASS; BLACK, 1992). Esses valores são difíceis de serem estimados, pois, quando *V. cholerae* é liberado nas fezes dos doentes, ele apresenta um fenótipo denominado de “estado de hiperinfectiosidade”, em que a dose infectante é reduzida em 10 a 100 vezes.

Em relação à contaminação da água por fezes humanas, esse estado persiste 5 a 24 horas, sugerindo que essas bactérias são mais importantes na disseminação da doença do que aquelas que se adaptam ao meio ambiente. Quando esse estado de hiper infectiosidade é incorporado aos modelos matemáticos, na estimativa do número de casos de um surto de Cólera pode ser observada a natureza caracteristicamente exponencial observada nas epidemias de Cólera (HARRIS *et al.*, 2012).

Os pacientes infectados com os sorogrupos O1 ou O139 que são assintomáticos geralmente eliminam o organismo por apenas alguns dias; no entanto, pacientes sintomáticos abandonam o organismo entre dois dias e duas semanas e raramente mais (NELSON *et al.*, 2009; WEIL *et al.*, 2009;).

Outro ponto de atenção no contexto da transmissão do vibrio, conforme relatado e descrito anteriormente, dá-se pela entrada de formas viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) do microrganismo no hospedeiro humano.

Colwell *et al.*, (1996) demonstrou que estas podem sobreviver à acidez estomacal e serem convertidas em formas viáveis cultiváveis (VC), ao chegarem no lúmen do intestino, e assim o colonizarem. Um estudo de Almagro-Moreno *et al.*, (2015), entretanto, sugere que o estado de hipocloridria gástrica (pós-prandial, uso de medicamentos inibidores da liberação de H^+) pode reduzir a dose infectante para 10^4 - 10^5 bactérias.

O *Vibrio cholerae* possui fatores de transcrição (*toxR* e *TCP*) localizados no interior da membrana no microrganismo, que possuem áreas capazes de responder a sinais ambientais. Uma vez que consigam passar pelo pH ácido da região estomacal do hospedeiro, eles podem ativar outro fator (*toxT*) que ativa diretamente os genes de patogenicidade (MORGAN *et al.*, 2011).

2.5.2 Associações ecológicas do vibrio colérico

A associação de bactérias do gênero *Vibrio* com diversos “substratos vivos” tem sua maior representatividade entre os copépodes (BRATLET; AZAM, 2005). Estudos encontraram amostras de *V. cholerae* do sorogrupo O1 aderidas a diferentes organismos planctônicos (copépodas, cladóceros e rotíferos) em Bangladesh (TAMPLIN *et al.*, 1990), assim como foi evidenciada uma alta taxa de associação dessa bactéria com copépodes da espécie *Mesocyclops longisetus* (ARAUJO *et al.*, 1996).

A presença do vibrio colérico também foi descrita em mosquitos da ordem Diptera (BROZA; HALPERN, 2001; HALPERN; IZHAKI, 2017), tartarugas de casco mole (WANG *et al.*, 2007), aves migratórias e peixes (HALPERN; IZHAKI, 2017; HOSSAIN *et al.*, 2018; MITCHELL *et al.*, 2017; SENDEROVICH *et al.*, 2010).

A associação do vibrio colérico com peixes vem sendo estudada, como a utilização de modelos empregando o Peixe Zebra (*Danio rerio*, Buchanan, 1822) para uma melhor compreensão do papel dos peixes na natureza como reservatórios aquáticos de *V. cholerae* (MITCHELL *et al.*, 2017).

Em estudo realizado por Hossain *et al.*, (2018), em 48 indivíduos do peixe Hilsha (*Tenualosa ilisha*) comumente utilizado para consumo humano em Bangladesh, foi detectada a presença do *Vibrio cholerae* com o gen da toxina colérica (*ctxA*), em 20% dos peixes amostrados. Levantamento bibliográfico realizado por Halpern e Izhaki (2017) encontrou o relato da presença de *V. cholerae* em 30 espécies de peixes diferentes, conforme a Tabela 5, concluindo os autores que os peixes podem disseminar essa bactéria no ambiente aquático e transferi-la para aves marinhas através do consumo dos peixes, tendo, portanto, os peixes um importante papel na disseminação do patógeno.

Tabela 5 - Ocorrência da presença do *V.cholerae* em diversos pescados

Etiologia	Local da Amostras	Ocasião/Localidade Ano	Sorogrupo	Referências
O peixe Hilsa (<i>Hilsa ilisa</i>) foi associado à transmissão de Cólera endêmica. Peixe Hilsa, infectado com <i>V. cholerae</i> se reproduz abundantemente no rio Hoogly que atravessa Calcutá (Índia).	Índia	Endemicidade da Cólera na Índia associada ao Peixe Hilsa	O1	Pandit; Hora (1951)
Ingestão de peixe cru	Tailândia	Surto em 1959 Tailândia	O1 El Tor	Morgan <i>et al.</i> , 1960
Manuseio e ingestão de peixes em reuniões sociais	Tanzânia	Surto na Tanzânia	O1	Killewo <i>et al.</i> , 1989
Pesca, cozimento e ingestão de peixe em lago	Lago na Itália	Itália	Não-O1	Piantieri <i>et al.</i> , 1982
Consumo de peixe fresco e defumado	Guiné	Conagry, Guiné	O1	St. Louis <i>et al.</i> , 1990
Consumo de peixe pouco salgado	Oceano Pacífico	Ilhas Guam, 1974	*	Merson <i>et al.</i> , 1977
Peixe salgado	Oceano Pacífico	Ilhas Gilberto, 1974	*	McIntyre <i>et al.</i> , 1979; Kuberski <i>et al.</i> , 1979
Um surto de Cólera em 67 pacientes (com 11 mortes) foi correlacionada com manuseio e ingestão de peixes em reuniões sociais.	Tanzânia	Região da aldeia Butiama do Mara (Tanzânia)	O1	Killewo <i>et al.</i> , 1989
Consumo de peixe cru importado ilegalmente da Albânia	Itália	Itália, 1994	O1	Maggi <i>et al.</i> , 1997
Ingestão de peixe seco	Tanzânia	Área rural ao sul da Tanzânia	O1 El tor sorotipo Ogawa	Acosta <i>et al.</i> , 2001
Paciente infectado após manuseio de pescado importado para Nigéria	Nigéria	Alemanha, 2001	O1 El tor sorotipo Inaba	Schürmann <i>et al.</i> , 2002
Consumo Isca branca importada da Indonésia	Indonésia	Sidnei (Austrália), 2006	O1 El tor sorotipo Ogawa	Forssman <i>et al.</i> , 2007

Legenda: (*) Dados não informados

Fonte: Traduzido de HALPERN; IZHAKI (2017).

Weynberg *et al.*, (2015) relacionam o “embranquecimento” dos corais devido à morte de algas simbióticas pelo *V. corallilyticus*, os quais, em cepas isoladas, foram detectados o gen *CTXθ*, específico da produção da toxina colérica. Outro reservatório importante do *V. cholerae* são os substratos quitinosos chamados de biofilmes bentônicos, que podem ser vistos como uma vantagem ecológica, uma vez que esse ambiente promove proteção e disponibiliza grande quantidade de nutrientes. Nessas condições as bactérias

associadas ao biofilme estão mais aptas à sobrevivência por longos períodos (NOGUEIRA *et al.*, 2002), favorecendo assim seu ciclo de vida, principalmente em ambientes estuarinos (SULTANA *et al.*, 2018).

2.5.3 Determinantes socioambientais

Os vibrios são responsáveis por infecções de ambientes aquáticos, favorecidos por condições socioambientais propícias a ambientes ao entorno (EILER *et al.*, 2007), destaque para processos migratórios ou de transferência de água de lastro, que facilita o aumento da área de contaminação e diminuição do tempo de dispersão, conectando veículos (humanos e não humanos) de forma rápida (FERDOUS *et al.*, 2018), que ocasionam registros de Cólera em países desenvolvidos nos últimos cinco anos (WHO, 2017).

Apesar de ser uma interação complexa de análise, as alterações do clima sentidas nas últimas décadas, atribuído em grande parte a modificações ocasionadas por ações antrópicas no ambiente, têm causado efeitos naturais desastrosos como perda de habitat, extinção de espécies, quebra de equilíbrios naturais e, no tocante a agravos à saúde humana, favorecido a morbidade de doenças infectocontagiosas, e a distribuição geográfica e a sazonalidade se apresentam como melhores indicadores para análise entre clima e doenças infectocontagiosas (LO IACONO *et al.*, 2017). Um dos pontos de interesse, sob este olhar, está na associação que os vibrios fazem com seres planctônicos, uma vez que estes são mais tolerantes a variações climáticas e se estabelecem em locais com grande porte de matéria orgânica, tornando-os assim mais resistentes a pressões ambientais (WORDEN *et al.*, 2006).

Com o aumento de temperatura, das incidências solares e nutrientes, ocorre um crescimento dos organismos fitoplanctônicos, principalmente algas verdes, que servem de hospedeiros do vibrio e são alimentos para o zooplâncton (CHOWDHURY *et al.*, 2017). Um exemplo disto é a ocorrência de Cólera em países como Finlândia e Suécia, ocasionada pela associação do vibrio com *Red Tides* (marés vermelhas, EILER *et al.*, 2007), mostrando assim uma relação positiva com a disponibilidade de matéria orgânica (WORDEN *et al.*, 2006).

Se, por um lado, a elevação da temperatura pode construir um cenário magnificador para a maioria das infecções, entre elas a Cólera, estes organismos são sensíveis à luz ultravioleta, sugerindo assim a exposição à incidência solar, de águas servidas, como forma de prevenção (SSEMAKALU *et al.*, 2013). Levantamento bibliográfico realizado por Lo Iacono

et al., (2017) mostrou que, entre todas as doenças infectocontagiosas que têm no clima um magnificante, a Cólera é que apresenta maiores estudos (30%) de todos os 102 trabalhos analisados.

Entre os fatores físico-químicos, a alta salinidade e a baixa temperatura são parâmetros inibidores para desenvolvimento do vibrio, podendo então se valer do processo de VNC como descrito anteriormente (CHOWDHURY *et al.*, 2017; KOKASHVILI *et al.*, 2015). Nesta perspectiva, o microrganismo pode ainda ser favorecido por: (i) associação com outros grupos bacterianos, (ii) se tornar predador de outras bactérias e (iii) causa desequilíbrio ecológico e eliminar possíveis espécies competidoras e predadoras (WORDEN *et al.*, 2006).

Toda esta análise indica a atenção, no caso da Cólera, na priorização de ações em áreas costeiras e estuarinas, onde organismos aquáticos já se apresentam como hospedeiros do organismo (FERDOUS *et al.*, 2018). Estas regiões concentram o maior contingente populacional, o que, conseqüentemente, acaba por acelerar o processo de degradação ambiental e a contaminação de ambientes aquáticos (SACHS, 2012).

Eventos climáticos, tais como o fenômeno *El Niño*, têm profunda interação nos padrões epidemiológicos de doenças infectocontagiosas, e a relação do aumento de incidências de Cólera com este fenômeno é altamente plausível, como demonstra estudo de Moore *et al.*, (2017). A epidemia de Cólera experimentada pelo Peru em 1991 teve sua porta de entrada à área portuária favorecida pelo fenômeno *El Niño*, que ocasionou um aumento da temperatura da superfície marinha, associado com um quadro de eutrofização e um trânsito constante de embarcações (COLWELL, 1996). Desta forma, assim como todas as doenças infecto-contagiosas, a Cólera tem nas questões socioambientais sua maior força motriz, gerando altos custos para seu controle (AWALIME *et al.*, 2017).

Há um processo constante de degradação ambiental e desigualdades sociais, em que processos antrópicos vêm modificando cada vez mais o ambiente, e assim alterando a dinâmica epidemiológica das doenças e acentuando o quadro de vulnerabilidade à exposição aos patógenos, entre eles o *Vibrio cholerae*.

2.6. Patogenia e quadro clínico da Cólera

O principal aspecto da patogenia da Cólera, como já descrito anteriormente, ocorre no ato da ingestão de água, ou eventualmente alimentos contendo a dose infectante do *V. cholerae*.

A bactéria, uma vez vencendo a barreira ácida do estômago, irá colonizar o epitélio do intestino delgado e produzirá a CT que determinará uma diarreia severa. Aliado à produção da toxina a aderência mucosa intestinal é um fator de sucesso para o estabelecimento da doença (KAPER *et al.*, 1995). Em estudo de Levine *et al.*, (1982), vinte voluntários ingeriram água contaminada com duas amostras não enterotoxigênicas de *V. cholerae* O1, biotipo *El Tor* e sorotipo *Ogawa* na ordem de 10^{6-8} , isoladas da água de esgoto no Brasil, e não foi observado nenhum processo diarreico. Uma das amostras estudadas foi encontrada nas fezes de oito de treze voluntários estudados, enquanto a outra amostra não foi encontrada nas fezes dos sete voluntários avaliados.

A ingestão, por voluntários, da CT administrada conjuntamente com cimetidina e NaHCO_3 (para diminuir a acidez gástrica) provocou, em outros voluntários de estudo de Levine *et al.*, (1983), diarreia semelhante à observada nos casos de Cólera, e a magnitude do processo diarreico se mostrou dose-dependente ($5\mu\text{g}$ de CT determinou a eliminação de 1 a 6 litros de fezes em 80% dos voluntários, enquanto a administração de $25\mu\text{g}$ da CT ocasionou a eliminação de aproximadamente 20 litros de fezes em 100% dos voluntários avaliados). Herrington *et al.*, (1988), entretanto, mostraram que a administração de 10^6 de amostra mutante isogênica de *V. cholerae* O1 sorotipo *Ogawa* que possuía uma deleção no gene *tcpA*, responsável pela produção da principal subunidade do TCP, não causou diarreia em 100% dos voluntários avaliados, o que indica que a produção isoladamente da CT não explica a patogenia da doença.

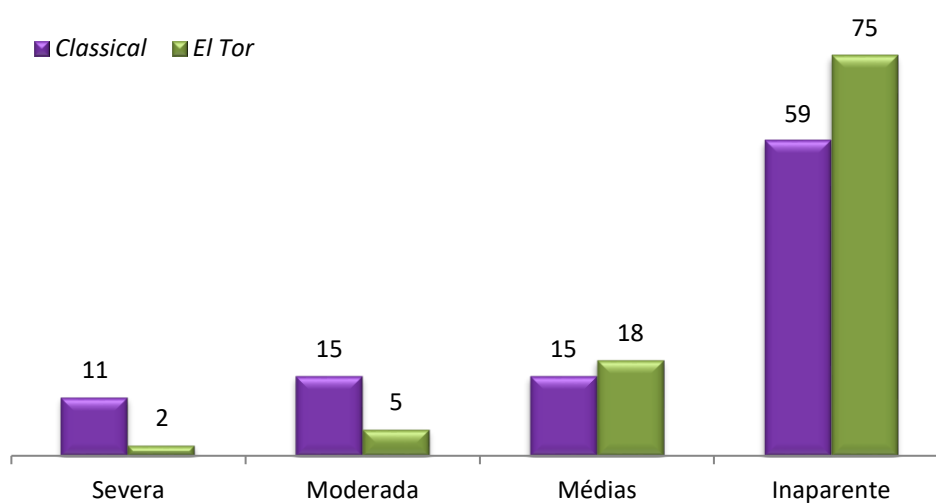
O período de incubação da doença pode variar de 18 horas a 5 dias, dependendo da dose infectante ingerida e da vulnerabilidade do hospedeiro, podendo desenvolver quadros que variam de leve a grave (CLEMENS *et al.*, 2017).

Cepas do sorotipo O1/biótipo *Clássico* causam quadros mais graves (11%) em relação as biótipo *El Tor* (2%), conforme a Figura 19 (KAPER *et al.*, 1995).

Os sinais clínicos, apesar de nos estados mais graves serem bastante específicos, podem se apresentar com sintomatologias bem semelhantes a muitos agravos gastroentéricos (SILVA, 2012).

Contribuindo, desta forma, para o confundimento dos sintomas, há uma diversificação de sinais clínicos, adotada por cada país, prescrevendo de Cólera (LUCIEN *et al.*, 2018). Desta forma, não são facilmente diferenciados quadros clínicos classificados como moderados de Cólera em comparação a outras infecções intestinais que podem ocorrer em áreas endêmicas (KAPER *et al.*, 1995).

Figura 19 - Porcentagem da distribuição de indivíduos infectados com o biótipo *Clássico* em comparação com o *El Tor*



Nota: A Severa inclui casos hospitalizados em estado grave; a moderada inclui casos detectados em ambulatórios e pequenas incluem confirmação por meio de pesquisa bacteriológica.

Fonte: Adaptado de GANGAROSA; MOSLEY, (1974) *In*: KAPER *et al.*, (1995).

Amostras do sorotipo O139 causam quadros clínicos semelhantes aos do sorotipo O1, devendo, por isso, ser reconhecido também como agente da Cólera epidêmica (BHATTACHARYA *et al.*, 1993). Dependendo da situação do hospedeiro, a infecção pode se manifestar e evoluir de formas diferenciadas, mostrando até uma diversificação de antígenos (LEVADE *et al.*, 2017).

Geralmente a doença começa de forma aguda com diarreia secretória com produção de fezes aquosas, que inicialmente são marrons com matéria fecal, mas logo adquirem uma cor cinza pálida. A presença de muco confere, às fezes, uma aparência de “água de arroz”, podendo apresentar “flocos” na sua superfície (CLEMENS *et al.*, 2017).

Após algumas horas do início do quadro clínico, surgem frequentemente vômitos e desconfortos intestinais. Apesar de o quadro de infecção intestinal não apresentar febre, ao menos existe uma co-infecção por outros agentes (KAPER *et al.*, 1995; SOMBOONWIT *et al.*, 2017).

A perda de líquidos nas fezes é expressiva, podendo atingir rapidamente de 500 a 1000 ml/hora, podendo ocorrer, em consequência dessa perda acentuada de fluidos, câibras musculares, letargia, pulsação radial rápida, estado de inquietação e muita sede (KAPER *et al.*, 1995). Esse quadro de desidratação ocasiona a elevação da dosagem da creatinina sérica e da ureia plasmáticas, além dos valores dos hematócitos.

Quando as perdas de bicarbonato nas fezes e a acidose láctica se instalam associadas à desidratação, podem ocorrer um quadro de acidose grave manifestada pela redução do pH do sangue e do bicarbonato plasmático, com um aumento do “gap” aniônico sérico, que se baseia na diferença entre os cátions-sódio presentes no sangue e os ânions - bicarbonato e cloro. Além disso, o acometido sofre com perda na firmeza cutânea, débito urinário, respiração ofegante, olhos e abdômenes invaginados e a fonação prejudicada (KAPER *et al.*, 1995).

Com todo este cenário, a ocorrência de desequilíbrio eletrolítico, ocasionando hipocalcemia (fadiga, fraqueza muscular e arritmias), hiponatremia (agrava a fadiga e fraqueza muscular, podendo causar câibras e confusão mental) e hipoglicemia (liconeogênese hepática insuficiente, e em crianças pode estar associada ao coma e convulsões) e a hipoperfusão sanguínea de órgãos terminais, que pode levar à insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral e, em pacientes grávidas, abortos espontâneos, partos prematuros e natimortos (CLEMENS *et al.*, 2017; KAPER *et al.*, 1995; SOMBOONWIT *et al.*, 2017).

A morte pode ocorrer dentro de poucas horas ou após o aparecimento dos primeiros sintomas (CHIANG; MEKALANOS, 1999), sendo que 50% dos pacientes não tratados morrem de diarreia grave devido à desidratação, podendo perder de 8 a 20 litros por dia (FASSANO *et al.*, 1991), e crianças de 0 a 5 anos são as mais afetadas (LEAROYD; GAUT, 2018; WHO, 2010).

O choque hipovolêmico é a ameaça imediata à sobrevivência de um paciente com Cólera grave; logo, a avaliação clínica inicial do paciente deve se concentrar na determinação do nível de desidratação e na estimativa do volume de fluido corporal que precisa de reposição e na compensação das contínuas perdas de fluido. A taxa de letalidade da doença

com aplicação das modernas abordagens e manejo clínico foi reduzida para menos de 1% (CLEMENS *et al.*, 2017).

2.7 Identificação de casos suspeitos e diagnóstico da Cólera

Segundo a OMS (WHO, 2006), é considerado como caso suspeito de Cólera o indivíduo (i) que esteja em área sem evidência de circulação dos sorogrupos toxigênicos, independentemente da faixa etária, porém habite em local onde esteja ocorrendo casos da doença e que apresente diarreia aquosa aguda por mais de 3 dias consecutivos; (ii) que esteja em área sem evidência de circulação dos sorogrupos toxigênicos, mas apresente diarreia, independentemente da faixa etária, que coabite com pessoas que retornaram de áreas endêmicas ou epidêmicas de Cólera há menos de 30 dias (tempo correspondente ao período de transmissibilidade do portador somado ao dobro do período de incubação); (iii) que esteja em área sem evidência de circulação dos sorogrupos toxigênicos, mas tenha mais de 10 anos de idade e apresente diarreia súbita, líquida e abundante, com presença de desidratação rápida, acidose e colapso circulatório, o que reforça a suspeita e (iv) que esteja em área com evidência de circulação dos sorogrupos toxigênicos e apresente quadro de diarreia aguda independentemente da faixa etária.

Koo *et al.*,(1996) recomendam que, nos países sul-americanos, a notificação de Cólera seja feita de acordo com as seguintes identificações: (i) caso confirmado de Cólera O1: através do isolamento da cepa em casos diarreicos; (ii) caso confirmado de Cólera O139: através do isolamento da cepa em casos diarreicos e (3) caso clínico de Cólera: pacientes com idade igual ou superior a cinco anos de idade com quadro de diarreia aguda.

Vugia *et al.*,(1992) sugerem duas vertentes para os casos diagnosticados de Cólera: (i) caso suspeito: casos de diarreia aguda incidindo em pessoas maiores de 65 anos e (ii) caso confirmado: isolamento do vibrio nos casos diarreicos agudos.

Para todos os casos suspeitos, serão coletadas amostras de fezes, que serão processadas para rotinas microbiológicas de isolamento, caracterização bioquímica e comprovação molecular por PCR. O *Bacteriological Analytical Manual* (BAM, 2004b) e o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2018b) descrevem toda a rotina - desde a coleta até a comprovação molecular.

2.8 Tratamento da doença

O principal componente do tratamento da Cólera é a reposição de água e eletrólitos por via intravenosa (casos graves) ou por via oral (RAMAMUTHY *et al.*, 2019; WHO, 2019).

Após a instalação do quadro de diarreia aguda, este procedimento deve ocorrer rapidamente. Caso contrário, a mesma pode evoluir para seu quadro severo, na qual a diarreia se magnifica, podendo a vítima vir a óbito em um curto período de tempo (WHO, 2006).

Quanto ao volume da terapia de hidratação oral, Bennish (1994) relata que, dependendo da quantidade administrada (maior que 100mL/kg), na primeira fase da doença, esta pode ser suficiente para um tratamento eficaz, concomitante com o monitoramento das fezes.

Os antimicrobianos desempenham um papel, embora importante, secundário no tratamento da Cólera, diminuindo a gravidade da doença, a duração da diarreia e a excreção da bactéria nas fezes, diminuindo assim a contaminação ambiental (RAMAMUTHY *et al.*, 2019; WHO, 2019). A antibioticoterapia deve ser iniciada precocemente, usualmente 3 a 4 horas após o início da reidratação e a redução da frequência dos vômitos. Isso porque os antimicrobianos empregados devem ser preferencialmente administrados por via oral, o que implica um menor custo e porque não existem vantagens na utilização de drogas injetáveis (RAMAMUTHY *et al.*, 2019; WHO, 2019).

Os primeiros antibióticos utilizados no tratamento da Cólera foram as tetraciclina, preferencialmente a doxiciclina (por ser utilizada em dose única) e outras drogas alternativas, tais como a furazolidina, cloranfenicol, fluoroquinolonas (ciprofloxacino), macrolídeos (eritromicina e azitromicina) e o sulfametoxazol-trimetoprima (HARRIS *et al.*, 2012; WHO, 2019).

2.8.1 Resistência antibiótica

Diferentemente de outros patógenos, que apresentaram resistência a antimicrobianos precocemente, *V. cholerae* manteve o padrão de sensibilidade por um longo período. Em uma pesquisa mundial, realizada em 1976, apenas 3% das amostras selecionadas aleatoriamente foram resistentes aos antimicrobianos comumente usados. Este cenário mudou rapidamente,

principalmente devido ao uso indiscriminado destes fármacos (GOSH; RAMAMURTHY, 2011).

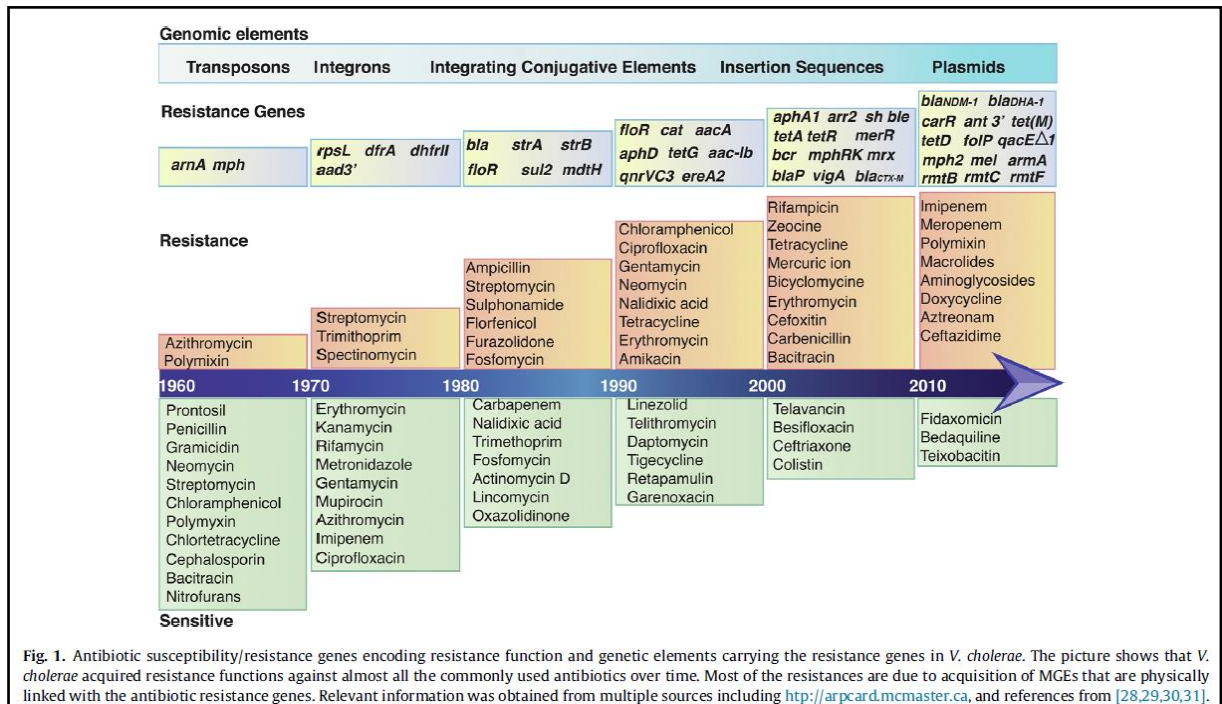
Em 1979, dados apresentados pelo *National Institute of Cholera and Enteric Diseases* (Kolkata, Índia), segundo uma pesquisa realizada em Bangladesh, mostrou que cerca de 18% das amostras estudadas apresentavam resistência a vários antimicrobianos. Este cenário vem se alterando progressivamente, tendência a qual também é observada em estudos em outras regiões onde a Cólera ocorre (GOSH; RAMAMURTHY, 2011).

O surgimento de amostras de *V.cholerae* Multidroga Resistentes - *MultiDrug Resistant* (MDR) e extensivamente resistentes - *Extensive Drug Resistant* (XDR) é um excelente exemplo de evolução bacteriana nos últimos tempos. Durante a década de 1960, a resistência a um ou alguns antibióticos relatados em *V. cholerae* ocorreu principalmente devido à aquisição de mutações espontâneas no alvo da droga, como DNA girase, Topoisomerase, subunidade b da RNA polimerase (RpoB) e Proteína Ribossômica de pequenas subunidades S12. Posteriormente, o surgimento de MDR e XDR de *V. cholerae* decorreu de outros mecanismos de aquisição de resistência como a transferência horizontal de genes (HGT) por meio de plasmídeos auto-transmissíveis e de replicação autônoma (IMGEs) integrativos, incluindo elementos conjugativos integrantes (ICE), sequências de inserção (IS) e elementos genéticos transponíveis, como sumarizado no Quadro 2 (DAS *et al.*, 2019).

O *SXT* é um *ICE* de *V.cholerae* O1, que carrega genes de resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, estreptomicina e cloranfenicol, sendo relatada sua presença também no sorogrupo O139. O *SXT*, ou *ICE* intimamente relacionados, foram relatados na maioria das cepas clínicas e ambientais de *V. cholerae* isoladas na Ásia e na África (BURRUS *et al.*, 2006; GOSH; RAMAMURTHY, 2011).

Amostras de *V. cholerae* O1 isoladas, antes da década de 1970, eram suscetíveis à tetraciclina. Em função do uso extensivo desse medicamento, contudo, em muitos países africanos, cepas resistentes foram relatadas, referindo-se ao mecanismo de transferência por conjugação de plasmídeos-R (plasmídeos de resistência) por amostras de *Escherichia coli*. A presença de plasmídios-R também foi relatada no sorotipo O139, onde um plasmídeo de 200 kb codifica a resistência à tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, canamicina, gentamicina, sulfametoxazol e trimetoprim (GOSH; RAMAMURTHY, 2011).

Quadro 2 - Genes de susceptibilidade/resistência a antibióticos que codificam a função de resistência e elementos genéticos portadores dos genes de resistência em *V. cholerae*



Nota: A imagem mostra que o *V. cholerae* adquiriu funções de resistência contra quase todos os antibióticos comumente usados ao longo do tempo.

Fonte: DAS *et al.*, (2019).

No início do século XXI, na Índia e em outros países, foi detectada a resistência à fluoroquinolona (ciprofloxacino), devido principalmente à mutação no gene *gyrA*, que codifica uma subunidade da DNA girase, seguida de mutações no gene *parC*, que codifica uma subunidade da DNA topoisomerase IV (GOSH; RAMAMURTHY, 2011). Outra forma de resistência aos antimicrobianos descrita são os “Integrons”, que são sistemas de aquisição de genes de ocorrência natural que possibilitam à bactéria capturar genes exógenos e os incorporar em seus genomas, e um importante papel desse dispositivo são a associação a elementos genéticos móveis e a genes de resistência a antimicrobianos (FONSECA *et al.*, 2008).

Uma classe diferenciada de “Integrons” descrita para *V. cholerae* é denominada de “Superintegron” (MAZEL *et al.*, 1998), e está localizada de forma sésil no cromossomo, contendo centenas de genes com funções pouco conhecidas, mas que possuem homologia outra que codificam resistência a antimicrobianos (SÁ *et al.*, 2010). Em 1991-2000, durante a

epidemia de Cólera no Brasil, foram isoladas na Amazônia amostras de *V. cholerae* O1 que possuíam no “*Superintegron*” (FONSECA *et al.*, 2008; GOSH; RAMAMURTHY, 2011).

Adicionalmente, as bombas de efluxo constituem um mecanismo de resistência a antimicrobianos, caracterizados pelo transporte do antimicrobiano do meio intracelular para o meio extracelular, impedindo que estes atinjam o seu sítio de ação, não produzindo seu efeito. Estudo realizado por SINGH *et al.*, (2006) demonstrou que deleções nessas regiões tornaram as amostras suscetíveis à norfloxacin e ciprofloxacina, que são antimicrobianos para os quais as amostras de *V.cholerae* se apresentava resistente originalmente.

2.9 Profilaxia da Cólera

Dentre as medidas profiláticas para o combate e controle da Cólera e muitas outras doenças infectocontagiosas, podemos destacar: (i) oferta de água em quantidade e qualidade suficiente; (ii) destino e tratamento adequado de dejetos; (3) destino adequado do lixo; (iv) educação em saúde; (v) controle de portos e água de lastro; (vi) higiene dos alimentos e (vii) disposição e manejo adequado de cadáveres (SILVA, 2012).

A vacinação se apresenta como uma medida complementar de prevenção e controle, que pode ser implementada a curto e médio prazos, enquanto investimento em saneamento, educação e comunicação se apresentam como medidas eficazes, não só para a Cólera como para outras doenças infectocontagiosas (DONADEU *et al.*, 2009).

A imunidade por via oral contra a Cólera foi desenvolvida na Suíça entre os anos de 1970 e 1980, e estabilizada somente em 2013, porém só recomendada, primariamente, pela Organização Mundial de Saúde, em resposta a emergências e em ocorrência de crises humanitárias (DONADEU *et al.*, 2009; SEIDLEIN; DEEN, 2018).

Dois tipos de vacinas orais são utilizados no tratamento preventivo da doença: Dukoral e a Shanchol ou Morcavax (01/RR/AP/97/V/R, *Shantha Biotechnics Private Limited, Sanofi Pauster® Made in China*) (WHO, 2010). Atualmente ocorre a produção de cerca de 25 milhões de doses anualmente (SEIDLEIN; DEEN, 2018).

A confecção da vacina para doenças causadas por vibrios, entre elas a Cólera, pauta-se na produção de anticorpos antivibráticos e específicos para toxinas. Nenhum desses anticorpos, no entanto, é um eficiente confiável da imunidade protetora. A imunoglobulina A

secretora (*sIgA*) é considerada um marcador importante da imunidade humoral da mucosa. Outro anticorpo importante refere-se aos da imunoglobulina G (*IgG*) aos antígenos específicos, que ocorrem após a infecção natural e a vacinação. Nos adultos, o aumento da *IgG* sérica para a toxina B da Cólera é detectável por pelo menos 270 dias após a infecção natural (DONADEU *et al.*, 2009).

As vacinas injetáveis têm sua produção mínima em poucos países e não são recomendadas pela Organização Mundial da Saúde, principalmente por causa da sua eficácia limitada e pouca duração de proteção (WHO, 2010).

Até 2017, 8 milhões de doses foram enviadas para mais de 40 campanhas de vacinação em massa implementadas em 14 países em vários cenários, entre eles surtos, áreas endêmicas ou em crises humanitárias (DONADEU *et al.*, 2009). Segundo a OMS (WHO, 2010), no período epidêmico de 1980, em Bangladesh, a vacina Shanchol apresentou um menor tempo de proteção contra o *El Tor* e o *Clássico*, se comparado com a eficácia da Dukoral, mas, após o período posterior (dois anos após), ela se mostrou equivalente ou até melhor que sua concorrente. Ainda não existem dados, variáveis temporais consistentes nem marcadores de subunidade B para avaliar o destaque das vacinas.

Modelagem realizado por KUNKEL *et al.*, (2016) concluiu que a quimioprofilaxia antimicrobiana de soldados de força de paz, que partem de países onde a Cólera é endêmica, seria mais eficaz que a vacinação na prevenção do surto no Haiti, reduzindo a probabilidade de epidemia em 91% se implementada sozinha e 98% se associada à imunização.

Os anticorpos são sintetizados no paciente, na relação antígeno *versus* anticorpos, e são facilmente detectados, pela metodologia específica, já que se apresentam circulantes por 6 a 12 meses e retornam a níveis pré-infecção após 13 a 19 meses (CLEMENTS *et al.*, 1982). Estudos em localidades incidentes de surtos apontam para altas concentrações de anticorpos circulantes na população local, sugerindo uma reposição, apontando problemas ambientais magnificadores (FILIZOLA *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

GERAL

Elaborar e analisar uma proposta metodológica inicial para prevenção de introdução do *Vibrio cholerae* toxigênico em águas nacionais por descarga de água de lastro, em consonância com o padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004), no tocante à especificidade das embarcações a serem amostradas, tendo como estudo de caso o Porto da Cidade do Rio de Janeiro.

ESPECÍFICOS

1. Analisar a vulnerabilidade da região de estudo para sobrevida do *V.cholerae*, e, para alcançar esse objetivo, teríamos duas frentes: (i) Reconhecer, através de levantamento bibliográfico, as condições físico-químicas ambientais (pH, temperatura e salinidade) para sobrevida do *V.cholerae* e a ocorrência do mesmo no local de estudo, detectando assim a vulnerabilidade da região e (ii) Diagnosticar o padrão dos parâmetros físico-químicos ambientais em pontos estratégicos da área de estudo, contribuindo assim com o objetivo específico 1.
2. Elaborar e propor um índice de risco para cada origem das embarcações, através de uma análise conjunta de indicadores construídos, direcionando assim as prioridades de amostragens.
3. Monitorar as embarcações visitantes ao local de estudo, aplicando o índice de risco proposto pelo objetivo específico 2, selecionando assim possíveis alvos de amostragem.
4. Elaborar um protocolo para análise microbiológica de águas salobras e marinhas (superficiais ou de lastro) para detecção das formas toxigênicas de *V. cholerae*.
5. Identificar a presença do *Vibrio cholerae*, na sua forma toxigênica, em águas superficiais e de tanques de lastros de navios visitantes, apontados pelo objetivo específico 3, testando as metodologias propostas.
6. Analisar todos procedimentos executados sugerindo ajustes detectados ao longo do processo, de forma a aperfeiçoar a metodologia e torná-la mais exequível para a aplicação em todos os portos nacionais brasileiros.

4 JUSTIFICATIVA

O foco da Convenção Internacional sobre administração da água de lastro BWM (IMO, 2004) está exatamente em atenuar o processo de bioinvasão ocasionado pelo transporte de água realizado pelo modal marítimo em todo o mundo pelo processo de lastreamento das embarcações. A regulamentação D-2, descreve bioindicadores que atestem a eficácia das metodologias utilizadas no contexto de combate à introdução de espécies em todo o mundo por água de lastro, entre eles, biomicroindicadores patogênicos. Desta forma, a verificação da eficácia de equipamentos e metodologias, instalados a bordo para o tratamento da água, deve ser uma constante para o efetivo cumprimento da norma.

Um dos problemas concernentes à verificação da efetividade dos sistemas de padrão D-2 presente nas embarcações está na verificação da conformidade destes a com legislação vigente BWM (IMO, 2004). Isto se mostra como um grande desafio seja pelo alto número de embarcações que visitam os portos no mundo diariamente, assim como a demora dos resultados das análises microbiológicas que possibilitam a identificação - ou não - dos organismos bioindicadores nas amostras investigadas.

A preocupação deste trabalho envolve exatamente a redução do esforço amostral a ser considerada para verificação da regra D-2, otimizando assim os esforços operacionais e especificando navios que possam realmente ter algum risco efetivo, aliado à construção de um protocolo de análise microbiológica para identificação do *V.cholerae* na sua forma toxigênica (sorogrupos O1 e O139).

5 METODOLOGIA

Tomando por base a justificativa, este trabalho apresenta uma proposta de abordagem metodológica inicial na prevenção de introdução do vibrião colérico toxigênico em águas nacionais por descarga de água de lastro, em consonância com o padrão D-2 da Convenção BWM (IMO, 2004), objetivando a identificação de “navios alvos”, diminuindo, assim, o esforço amostral e descrevendo uma rotina microbiológica para análise da amostra. Para tal, usamos como “área piloto” para este estudo a zona portuária da Cidade do Rio de Janeiro, mais especificadamente o Porto da Cidade.

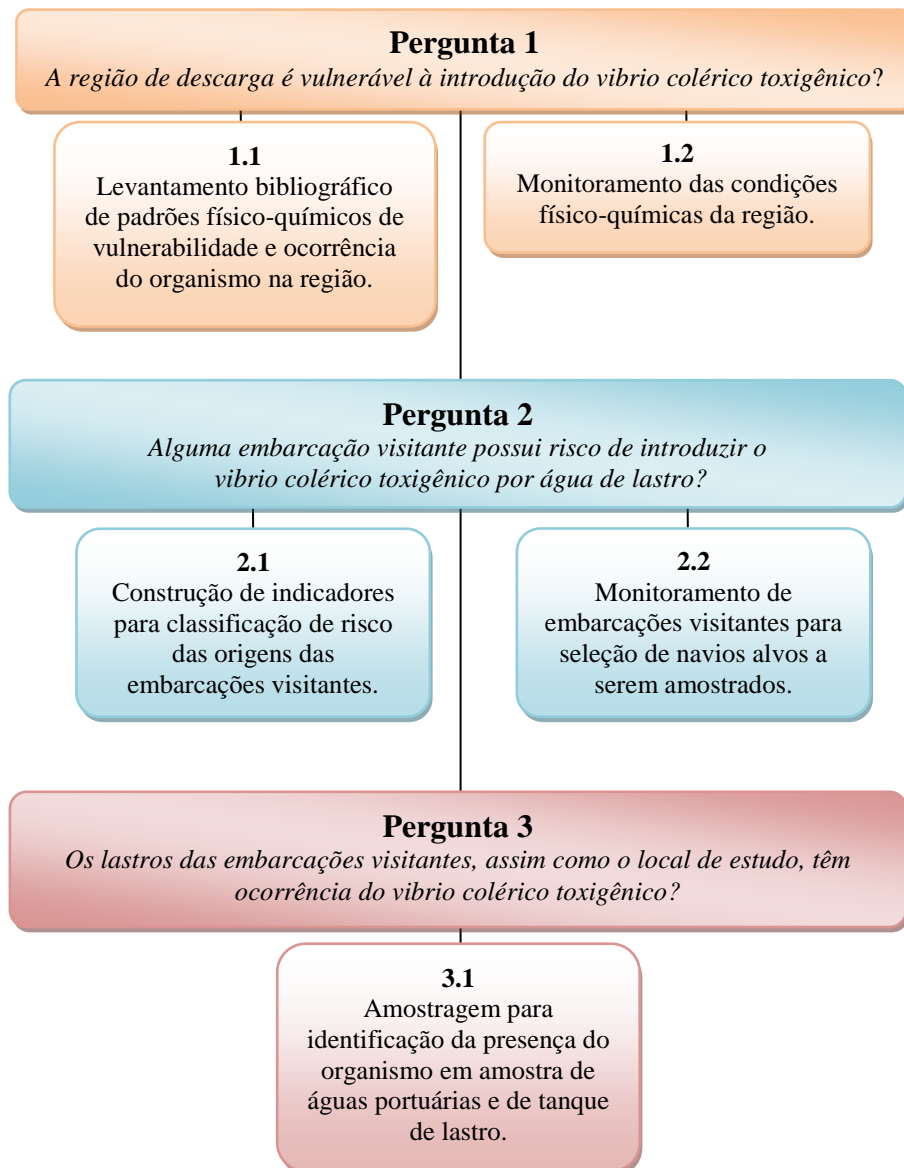
Esta proposta teve como pilar três indagações fomentadoras que norteiam toda construção metodológica. Estas exigem o desenvolvimento de estratégias para respondê-las e assim atingir o objetivo principal deste trabalho. Na Figura 20, apresenta-se o esquema metodológico, proposto neste trabalho, que é focado na construção de processos destinados a responder as três perguntas delineadoras do método proposto.

5.1 Pergunta 1: A região de descarga é vulnerável à introdução do vibrio colérico toxigênico?

Para agirmos efetivamente na promoção da saúde ambiental em uma perspectiva de saúde coletiva, faz-se necessária a compreensão dos riscos ambientais de uma determinada região de forma integrada, histórica, sistêmica e espacial. Desta forma, o primeiro passo desta proposta metodológica tem como pergunta motivadora saber se o local de estudo, ou seja, nesse estudo de caso piloto, as águas portuárias da cidade do Rio de Janeiro apresentam vulnerabilidade ao estabelecimento do vibrião colérico toxigênico e possíveis casos da patologia, caso seja introduzido por água de lastro. Assim, esta pergunta foi respondida com duas iniciativas: **1ª) Levantamento bibliográfico de padrões físico-químicos de vulnerabilidade que possibilitem a ocorrência do organismo na região** nos seguintes depósitos de artigos: PubMed, Scielo, Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), e as palavras chaves utilizadas foram: **Cólera, Vibrio colérico, Cholerae, Vibrio cholerae**. Essa iniciativa teve duas finalidades: (1.a) saber quais são as condições ambientais ideais de pH, salinidade e temperatura para sobrevivência do organismo e (1.b) averiguar se existem levantamentos de

ocorrência do organismo no local de estudo, com variações temporais para observar se houve flutuação do padrão e 2ª) **Monitoramento das condições físico-químicas da região** de pH, salinidade e temperatura.

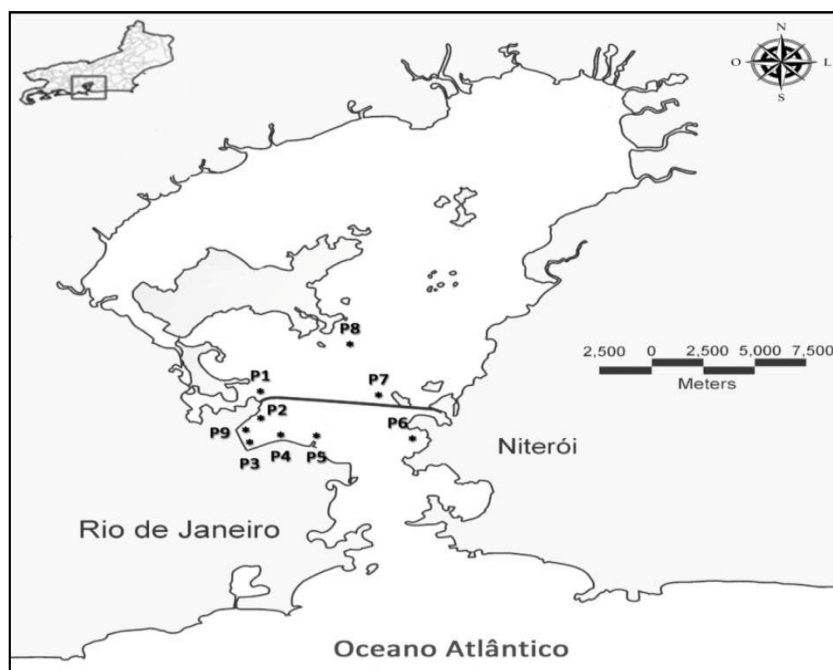
Figura 20 - Proposta metodológica do estudo



Fonte: O autor. 2020.

A Figura 21, assim como a Tabela 6, apresenta a localização dos pontos de coletas selecionados para amostragem.

Figura 21 - Pontos de monitoramento da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro)



Fonte: O autor, 2020.

Tabela 6 - Coordenadas dos pontos de monitoramento na Baía de Guanabara (RJ/Brasil)

Ponto	Referência	Latitude	Longitude
P1	Canal do Cunha	22°51'54.55''S	43°12'33.70''W
P2	Cais São Cristóvão	22°52'49.91''S	43°12'16.83''W
P3	Canal do Manguê	22°53'49.04''S	43°12'36.04''W
P4	Cais Gamboa	22°53'20.84''S	43°11'37.90''W
P5	Museu do Amanhã	22°53'26.05''S	43°10'40.90''W
P6	DHN	22°53'21.50''S	43°08'22.50''W
P7	Ancoragem Interna	22°52'6.61''S	43°09'20.69''W
P8	Ilhas Internas	22°49'52.41''S	43°09'5.95''W
P9	Cais Caju	22°53'14.53''S	43°12'44.80''W

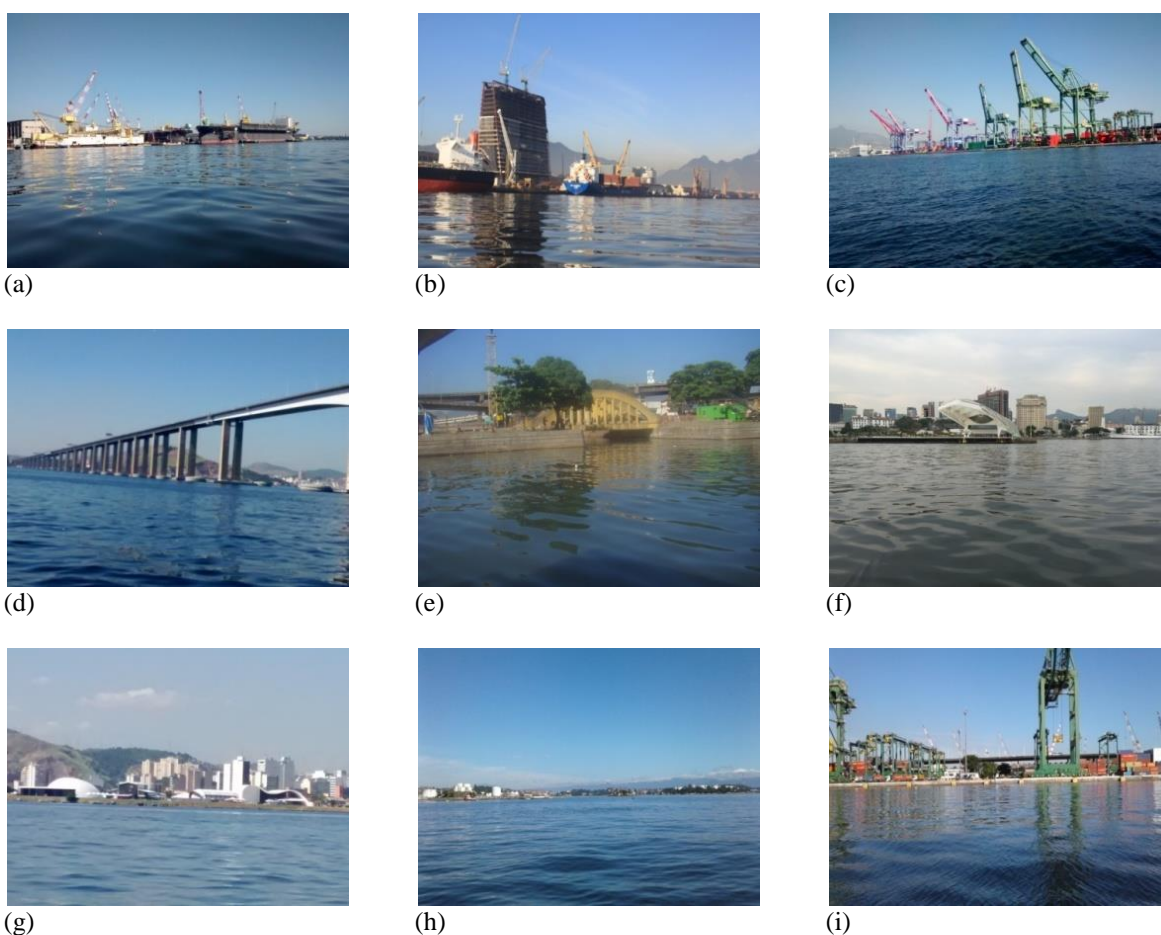
Fonte: O autor, 2018.

Os pontos para amostragem foram selecionados da seguinte forma: o ponto P1 (Canal do Cunha) e P9 (Canal do Manguê) foram selecionados por serem locais de desembocadura de efluentes urbanos; os pontos P2, P3, P4, P5, por cobrirem toda a área da zona portuária; o ponto P8 por ser uma área de ancoragem externa; o ponto P7 por ser área de rota de embarcações e o ponto P6 na tentativa de fechar um perímetro. A Figura 22 apresenta registros

fotográficos dos pontos de coletas, em uma das campanhas realizadas (dia 02 de maio de 2016).

Para verificação dos parâmetros, foram realizadas coletas das amostras utilizando garrafas de *Niskin* a profundidade de um metro da superfície e a um metro do sedimento, procedidas de determinação de pH e temperatura (phmetro multiprocessado AT-315 ALFAKIT® Brasil) e salinidade (Conduvímetero 8306 AZ® Brasil). Os dados foram tabulados, analisados estatisticamente e graficamente utilizando o *software* editor de planilhas (*Microsoft Excel 2007*®).

Figura 22 – Registro fotográfico dos pontos de monitoramento (tiradas em 29.09.2016)



Legenda: (a) P1, Canal do Cunha; (b) P2, Cais São Cristóvão; (c) P3, Canal do Manguê; (d) P4, Cais Gamboa; (e) P5, Museu do Amanhã; (f) P6, DNH; (g) P7, Ancoragem Interna; (h) P8, Interno Baía e (i) P9, Cais Caju.

Fonte: O autor, 2020.

5.2 Pergunta 2: Alguma embarcação visitante possui risco de introduzir o vibrio colérico toxigênico por água de lastro?

Para tal fim, propusemos a construção de um índice e análise de seus indicadores formadores para uma categorização dos riscos associados à origem de cada embarcação, quanto à possibilidade de descarga de água de lastro com a presença do vibrião colérico toxigênico na zona portuária. Estes indicadores foram analisados em conjunto, objetivando classificar o risco externalizado, contido em cada embarcação, da introdução do V.c toxigênico carregados por água de lastro. Pretende-se, assim, promover medidas de prevenção a possíveis acometimentos de agravos à saúde humana, ocasionados pelo vibrião colérico, que tem o transporte marítimo como um possível vetor.

5.2.1 Indicador de Incidência de Cólera (IIC)

Este indicador representa o risco da área fonte das águas de lastro, ou seja, dos países onde estão localizados os portos de origem das embarcações que se destinam à região em monitoramento. Embora não seja possível ter certeza sobre a ocorrência de manobra de lastro no porto de origem, a ideia é que um navio que recebeu lastro em uma região na qual não existem casos reportados da doença represente um “vetor de introdução” menos importante do que uma embarcação proveniente de um local onde incidência/surto/epidemia tenham sido reportados.

Os dados sobre incidências mundiais para elaboração desse indicador são obtidos através de acesso aos dados globais da Organização Mundial da Saúde (http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/cholera/atlas.html), e tabulados com o auxílio do editor de planilhas (*Microsoft Excel 2007*[®]).

Segundo Medronho *et al.*, (2009, p.83), não existe um critério rígido para determinação de um tempo mínimo de observação para detecção de alteração/análise do comportamento de uma doença, ficando a pesquisa interligada aos padrões epidemiológicos da patologia. Assim sendo, tomamos como base, para início da observação, o ano de 2013 devido a: (i) ser o ano do início de declínio do surto epidêmico mundial do século XXI (2010 a 2012) nas Américas e (ii) ser o ano que se observaram dados mais robustos quanto a outro

indicador utilizado, que é o Acesso Saneamento (ISB) descrito no item 3.2.3, mais adiante. O término do levantamento foi no ano de 2017.

A medida de frequência utilizada para a classificação deste indicador será o Total de Incidência (TI), que é a soma das incidências anuais entre os períodos monitorados. Para categorização de risco da IIC, foi adotado como referência o país com maior TI do período, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Cálculo do Indicador de Incidência de Cólera (IIC)

IIC	Intervalo da TI
1	Maior ou igual a 50%
2	Entre 10 e 49%
3	Entre 1 e 9%
4	Entre 1 caso e 0,9%

Fonte: O autor, 2020.

Alguns países, entretanto, podem apresentar um pico epidêmico, no período analisado, muito acima da taxa mundial, tornando sua IIC muito discordante da média. Caso isto ocorra (como por exemplo, no período de 2010 a 2012 no Haiti), tomamos por base o segundo país com este indicador maior (IIC), e assim por diante. Para tal, foi considerado um destoante, quando à diferença entre o IIC, entre os países nesta situação, que exceda em 50% em número de casos. Nessa situação, independentemente de qualquer outro índice, **qualquer navio oriundo dessa região deverá ser amostrado**. Por exemplo, esse seria o caso de embarcações provenientes do Haiti (epidemia de 2011).

5.2.2 Indicador de Saneamento Básico (ISB)

O Indicador de Saneamento Básico (ISB) tem o objetivo de determinar a porcentagem de acesso ao saneamento a que a população de cada país apresenta, sendo este um fator determinante para introdução do *V. cholerae* no ambiente marinho e, assim, por conseguinte, a possibilidade de carreamento da bactéria pela coleta de água de lastro por navios. Vale ressaltar que o indicador ISB não determina a qualidade do saneamento

aplicado em cada país. Como não foi obtido, entretanto, nenhum indicador de “Qualidade de Saneamento” nas pesquisas realizadas, utilizaremos o acesso ao saneamento como indicador de ISB.

Os dados sobre o percentual populacional com acesso ao saneamento por país foram obtidos através do site do Banco Mundial, disponível no sítio <https://databank.worldbank.org/data/home.aspx>.

O período monitorado foi o mesmo do IIC (2013 a 2017), por apresentar os dados mais concretos e confiáveis sobre este indicador, em relação aos anos anteriores, que apresentaram muitas lacunas. A medida utilizada foi a média aritmética das porcentagens da população com acesso ao saneamento.

Foram utilizados apenas os dados referentes aos países que tiveram incidência de Cólera (IIC maior ou igual a1) nos cinco anos de análise. Para a categorização, adotaremos quartis de 25% conforme a porcentagem da população com acesso ao saneamento, segundo representado na Tabela 8.

Tabela 8 – Cálculo do indicador de Saneamento Básico (ISB)

ISB	Intervalo da Média do Acesso ao Saneamento
1	Entre 0 e 25 ou País sem registro de dados disponível*
2	Entre 26 e 50
3	Entre 51 e 75
4	Entre 76 e 100

Legenda: (*) Sugerimos que país que não tem dados disponível podem apresentar situação de risco 1.

Fonte: O autor, 2020.

5.2.3 Indicador de Parte Contratante (IPC)


A construção do Indicador País Contratante (IPC) parte do ponto que os países contratantes da convenção BWM (IMO,2004) terão uma maior preocupação e assim construirão dispositivos legais e procedimentos operacionais, a fim de minimizar os riscos da introdução do organismo, e assim este indicador teve como finalidade saber quais países são contratantes ou não. Através de consulta ao site oficial da IMO, situado no sítio <http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-for->

[the-Control-and-Management-of-Ships'-Ballast-Water-and-Sediments-\(BWM\).aspx](#), e seus padrões D-1 e D-2, foram determinados quais países são participantes da referida Convenção. Para o cálculo do IPS, foi atribuída a pontuação 1 para países não contratantes e pontuação 2 para os países contratantes. Como nos outros indicadores, o menor valor desse indicador representa a situação mais crítica. Desta forma, foi atribuído IPC=2 aos países contratantes e IPC=1 aos não contratantes da Convenção.

5.2.4 Determinação do Risco Origem de cada embarcação (RO)

Para determinação do Risco Origem (RO), os indicadores IIC, ISB, e IPC foram analisados em conjunto. Assim, o cálculo do Risco Origem foi dado pela soma destes três indicadores. O RO de todas as embarcações/países foram analisadas conforme os critérios estabelecidos na Tabela 9. Embarcações provenientes de localidades situadas no próprio litoral brasileiro receberam risco 4 (alerta azul). Em princípio, elas estão em uma situação diferente, já que um eventual surto de cólera, em alguma região do país, é muito mais fácil de ser constatado do que em países localizados em outros continentes.

Tabela 9 - Graus de risco e alerta de acordo com o Risco da Origem de cada origem (RO)

Risco	Alerta	Risco Origem (RO)
1		Menor/igual a 6
2		7 a 9
3		Maior que 10
4		Origem no próprio Brasil

Fonte: O autor, 2020.

5.2.5 Monitoramento de embarcações visitantes para seleção de alvos

A fim de determinar quais as origens das embarcações visitantes que foram mais ocorrentes no local de estudo, utilizou-se a ferramenta virtual *Marine Traffic* (<https://www.marinetraffic.com/pt/>) para monitorar os navios atracados no porto do Rio de Janeiro. O monitoramento ocorreu a cada intervalo de 03 (três) dias entre janeiro de 2016 a

janeiro de 2018 (25 meses). Esse intervalo de tempo foi adotado por apresentar, dentro do cronograma de trabalho, um intervalo viável tanto para o monitoramento como para análise dos dados e construção do indicador. Os dados foram tabulados quanto: (i) País e Porto de origem; (ii) Nome, Bandeira, Tonelagem, Tipo, Velocidade e Dimensões da embarcação e (iii) Porto destino, com a data de chegada.

5.3 Pergunta 3: Os lastros das embarcações visitantes, assim como o local de estudo, têm ocorrência do vibrio colérico toxigênico?

Com a determinação do risco de cada origem pela construção do RO, que possibilitou a categorização das origens das embarcações e o monitoramento dos navios visitantes, a terceira parte da metodologia se pautou na amostragem (lastro de navios e em águas superficiais do local de estudo), com a finalidade de identificar a presença do vibrião colérico toxigênico e assim complementar e sustentar a proposta metodológica. Essas análises deverão fazer parte do protocolo de avaliação de risco para esse problema em qualquer área em que se decida aplicar essa metodologia.

5.3.1 Coleta de amostras de águas superficiais portuárias

Os pontos de coleta de amostras de águas superficiais (P1, P2, P3, P4, P5 e P9) foram selecionados por estarem situados na região costeira próxima da zona portuária da região de estudo, o porto do Rio de Janeiro.

Em cada ponto, foram coletadas 1000 mL de água superficial, sendo utilizados dois frascos de vidro borossilicato, com tampa de rosca e capacidade de 500 mL, devidamente identificados e previamente esterilizados por autoclavação (121°C/15 min). No momento da coleta, a superfície dos frascos e as luvas do operador foram desinfetadas com uma solução álcool etílico hidratado (70° INPM).

Após a retirada da tampa, os frascos foram colocados em um suporte, que possibilitava sua introdução na água, na posição invertida (de boca para baixo), na profundidade de 10 a 20 cm (MARKMAN, 2008). Na profundidade estabelecida, os frascos

foram desvirados para possibilitar a entrada da água. Esta operação foi realizada, desprezando o conteúdo colhido por duas vezes com objetivo de “rinsar” o seu interior. Na terceira vez foi realizada a coleta conforme sugerido por Hug *et al.*, (2012).

Imediatamente após a coleta, os frascos foram devidamente tampados e acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para conservação das amostras entre 4 e 10°C (CDC, 2018a; NIQ, 2012) e ao final, as caixas isotérmicas, contendo as amostras, foram imediatamente transportadas para o laboratório, de modo que o intervalo de tempo entre a coleta e o início do processamento de análise microbiológica da amostra fosse de no máximo 6 horas (CDC, 2018a; NIQ, 2012).

No mesmo momento em que as coletas foram realizadas, foram verificados também os parâmetros físico-químicos (pH, salinidade e temperatura) da água, na superfície (10/20 centímetros da superfície) e em profundidade (10/20 centímetros de distância do fundo). Para essa amostragem, foi utilizada uma garrafa de *Niskin* horizontal de acrílico, sendo os resultados obtidos registrados para serem posteriormente tabulados e analisados, estatisticamente e graficamente, com emprego do *software* editor de planilhas (*Microsoft Excel 2007*[®]). A Figura 23 mostra um registro fotográfico do processo de “rinsagem” de amostra superficial descrito acima.

5.3.2 Amostragem de tanques de lastro

Para o monitoramento das visitas marítimas ao porto, foram acompanhadas as embarcações de longo curso entre agosto de 2018 a dezembro de 2019 (18 meses), com finalidade de seleção de navios a serem amostrados, conforme descrito no item metodológico 5.2.5.

Quando da iminência de chegada de navios de risco 1 a 2, estes entraram em constante monitoramento com auxílio do site da praticagem (<http://www.praticagem-rj.com.br/>). O primeiro passo foi a visita a uma embarcação de abordagem preliminar (Navio Teste = NT), com objetivo de verificação da documentação de gestão de lastro, o acesso aos tanques e ao sistema de tratamento, construindo assim procedimentos e equipamentos de modo a otimizar as coletas e entender as dificuldades que poderão ser encontradas.

Figura 23 – “Rinsagem” da amostra para posterior coleta



Fonte: O autor, 2020.

A Figura 24 apresenta o registro fotográfico do interior de um dos tanques de lastro, com acesso a outro nível inferior, para atingir a superfície da água no tanque no momento, e uma simulação de amostragem no NT e a figura 25 mostra o registro fotográfico da bomba adaptada, graças ao visitação ao NT, e o agulheiro de acesso ao tanque de lastro no momento da coleta no Navio de amostragem 1 (N1).

Posteriormente, com a metodologia utilizada de categorização de RO, navios de risco alto e/ou moderado, assim como aqueles provenientes de portos localizados no próprio território brasileiro, serão selecionados para amostragens e posterior análise microbiológica descritas adiante.

Com acesso à embarcação e com posse do relatório de gerenciamento de lastro, a amostragem será feita de acordo com a condição operacional da embarcação. Se a

embarcação tiver o padrão D-2 instalado a bordo, a amostragem será feita na saída própria da instalação de tratamento na praça de máquinas. Alternativamente, em uma eventual impossibilidade de acesso, um tanque poderá ser selecionado, desde que já tenha passado pelo processo de tratamento a bordo. Caso a embarcação não apresente a metodologia de tratamento padrão D-2, será escolhido um tanque, dentro da logística e disponibilidade informada pelo comandante ou imediato, com mais risco de conter o organismo, levando em conta a origem e quantidade do lastro e tempo desde manobra de lastreamento, conforme disponível no livro de registro das manobras de águas de lastro.

Figura 24 - Vista interna de um tanque de lastro com abertura para outro nível do tanque do Navio teste



Fonte: O autor, 2020.

O número máximo e mínimo de embarcações a serem amostradas não foi estipulado, em função das dificuldades operacionais de abordagem, disponibilidade do Estado do Porto e veracidade das informações de atracagem. Nesse caso, o objetivo era analisar embarcações com e sem as instalações do sistema de lastro dentro do padrão D-2.

Como o presente trabalho não é uma amostragem oficial do Estado do porto, os nomes e indicativos dos navios não serão mencionados, mas os resultados serão disponibilizados aos oficiais das embarcações amostradas, assim como os oficiais do porto após a defesa da tese.

Para verificação dos parâmetros físico-químicos, foram coletadas amostras para determinação de pH e temperatura (phmetro multiprocessado AT-315 ALFAKIT® Brasil) e salinidade (Conduvímetro 8306 AZ® Brasil) no próprio navio.

Figura 25 - Bomba adaptada de captação de amostra de lastro

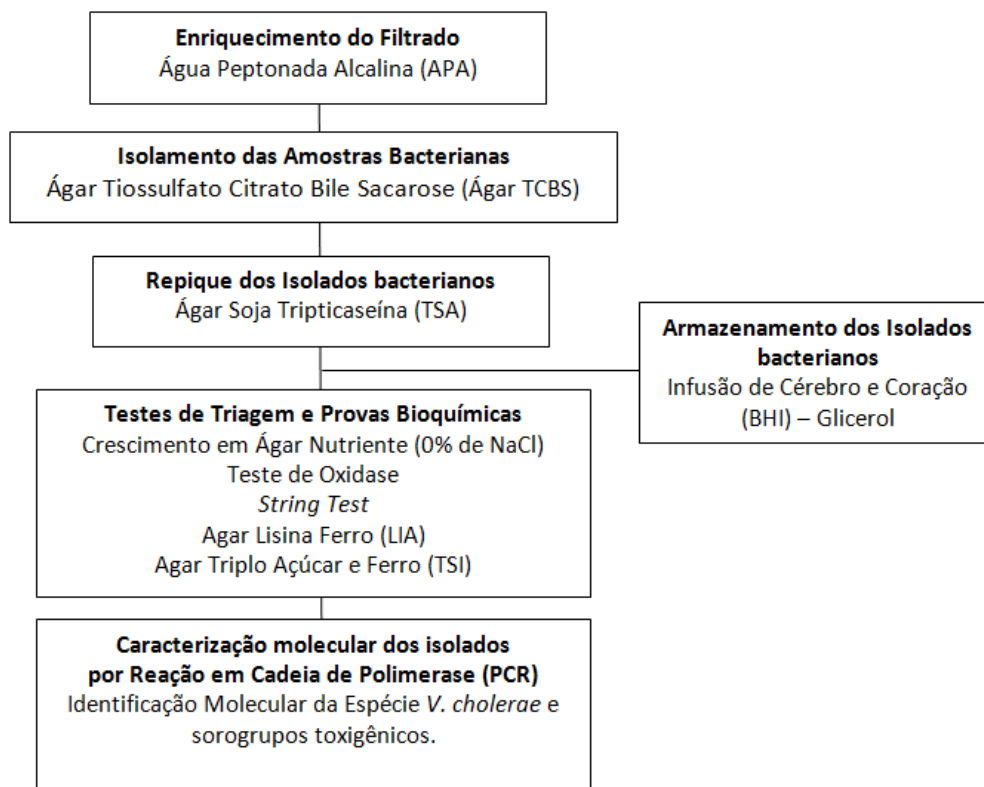


Fonte: O autor, 2020.

5.3.3 Processamento das amostras de água para análise microbiológica

As amostras de águas superficiais e de tanques de lastro foram processadas nas análises microbiológicas como apresentado no fluxograma da Figura 26.

Figura 26 - Processamento das amostras de água, superficiais e de tanques de lastro, nas análises microbiológicas



Fonte: O autor, 2020.

5.3.3.1 Filtração das amostras

Quando do recebimento das caixas isotérmicas no laboratório, a temperatura da superfície dos frascos contendo as amostras foi determinada com emprego de um termômetro digital infravermelho para confirmação da sua manutenção na faixa de temperatura (4 a 10°C) especificada durante o transporte (CDC, 2018a; NIQ, 2013).

As amostras foram homogêneas por inversão dos frascos, por, no mínimo, 10 vezes, e filtradas com emprego de copos de policarbonato com capacidade de 500 mL e membranas filtrantes de mistura de ésteres de celulose, com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm (HAWG03700, Milipore, MF Merck®), previamente esterilizados por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Os copos de filtração foram colocados em um suporte de filtração conectado a um sistema de vácuo e, dependendo da quantidade de material particulado da amostra, foram filtrados volumes de 100 a 150 mL, por cada membrana filtrante. Quando da

sua saturação, esta foi substituída assepticamente por uma nova membrana, sendo este processo repetido até que um volume total de 1000 mL de cada amostra fosse filtrado. O processo de filtração das amostras em sistema *Manifold* está demonstrado em registro fotográfico da Figura 27.

Figura 27 - Processo de filtração de amostras



Fonte: O autor, 2020.

5.3.3.2 Enriquecimento do filtrado

As membranas utilizadas na filtração de cada amostra foram imediatamente colocadas em frascos contendo 500 mL de Água Peptonada Alcalina (APA) para enriquecimento da presença de *V. cholerae* (HUQ, 2012). No preparo da APA, foram seguidas as recomendações do *Bacteriological Analytical Manual* - M10 (BAM, 2018a).

Após a mistura da peptona (RM007, *HiMedia Laboratories*, Índia), em água destilada, e sua dissolução por aquecimento, o pH foi ajustado em $8,5 \pm 0,2$ com uma solução de hidróxido de sódio (106462, Merck Millipore™, Brasil), sendo então volumes de 500 mL distribuídos em frascos de vidro borosilicato com tampa rosca e esterilizados por autoclavação (121°C por 15min).

Após a colocação nos frascos de APA das membranas utilizadas na filtração das amostras de água, os frascos foram agitados vigorosamente para desprendimento do material

filtrado retido nas membranas, sendo então incubados a 35°C a 37°C por 8 horas em estufa estacionária (CDC, 2018a; HUQ, 2012).

5.3.3.3 Amostras controles

Conforme as normas de rotinas em microbiologia, em todos os procedimentos a seguir foram utilizados controles negativos e positivos, para verificação da funcionalidade os meios e teste. Os controles negativos foram selecionados de amostras bacterianas isoladas, a partir das amostras de água superficial, que apresentavam resultado negativo para utilização da sacarose em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose - Ágar TCBS (265020, Difco™, USA) diferente do microrganismo alvo.

O controle positivo para a espécie *V. cholerae* do sorogrupo O1 (INCQS: 00156; Lote 0709156; Origem: ATCC 9458; Biotipo El Tor; Sorotipo: Ogawa) foi obtido junto à Coleção de Microorganismos de Referência em Vigilância em Saúde (CMRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), enquanto o controle positivo para a espécie *V. cholerae* do sorogrupo O139 (IAL: 2013, M-045) foi obtido no Núcleo de Coleção de Microorganismos do Instituto Adolfo Lutz.

5.3.3.4 Isolamento das amostras bacterianas

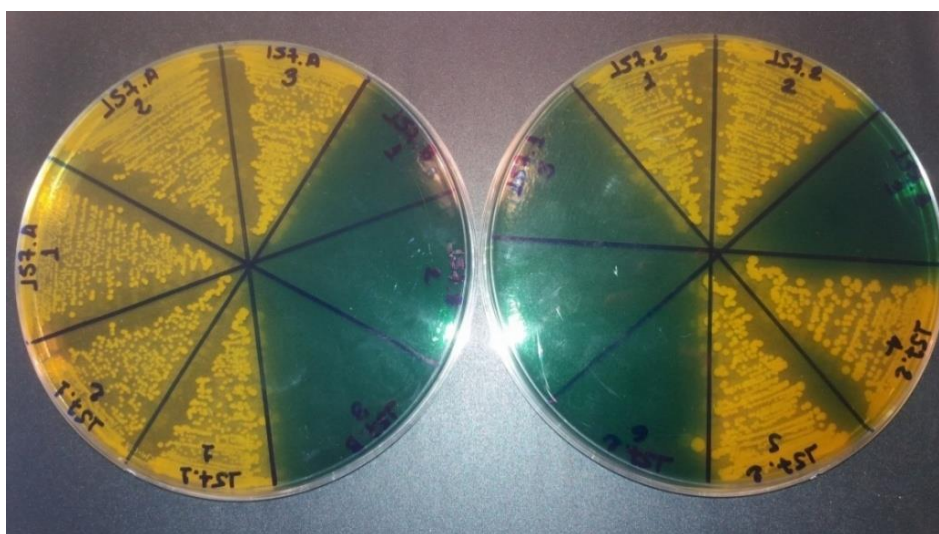
Após o período de incubação, sem agitar o frasco, um volume de 100µL da porção superficial do meio de enriquecimento foi transferida para uma placa Ágar TCBS (265020, Difco™, USA) e semeada pela técnica de semeadura de esgotamento com auxílio de uma alça de níquel-cromo (CDC, 2018a).

O Ágar TCBS foi preparado segundo as recomendações do fabricante e, após a completa dissolução dos seus componentes por aquecimento, o meio foi resfriado e distribuído em placas de Petri descartáveis de 150 x 20 mm. Foram empregadas placas de Petri destas dimensões, por terem uma maior área para semeadura e conseqüentemente possibilitar um melhor esgotamento das amostras.

Após a semeadura, as placas de Ágar TCBS foram incubadas na posição invertida a 35°C por 18 a 24 horas, sendo então examinadas quanto à presença de colônias com características presuntivas de serem de *V. cholerae*. Tipicamente, colônias com 2-4 mm de diâmetro, circulares, lisas, ligeiramente achatadas e uma coloração tipicamente amarela que se estende ao meio de cultura seu redor (CDC, 2018a; 2018b). A coloração amarelada decorre da metabolização da sacarose presente no meio, que leva à formação de ácidos com consequente mudança da cor verde original do meio para amarelo, em função da presença do indicador de pH como constituinte do meio de cultura de azul de bromotimol (CDC, 2018a).

A Figura 28 mostra duas placas em meio Ágar TCBS divididas em setores, e em vários deles podem ser observadas colônias amarelas (sacarose +), que são as presuntivas de *V. cholerae*.

Figura 28 - Colônias presuntivas (amarelas) de *V. cholerae* em Ágar TCBS



Fonte: O autor, 2020.

5.3.3.5 Repique das colônias suspeitas isoladas em Ágar TCBS

A partir de cada placa de Ágar TCBS, foram selecionadas 5 colônias com morfologia presuntiva de *V. cholerae* e repicadas para placas de Ágar Soja Trypticaseína (TSA) (M1968, Himedia®, Índia), preparadas conforme as especificações do fabricante, sendo incubadas a 35°C por 16 a 18 h (MENEZES *et al.*, 2014).

5.3.3.6 Armazenamento dos isolados bacterianos

Para preparo do “estoque de trabalho”, o crescimento das amostras nas placas de TSA foi semeado em Ágar Mueller Hinton (70191, Sigma-Aldrich™, USA), preparados conforme as instruções do fabricante e distribuído em tubos, sendo após a esterilização solidificados na posição inclinada.

Para preparo do “estoque permanente”, suspensões em Infusão de Cérebro e Coração Bovino (BHI), adicionado de glicerol (BHI-Glicerol), dos isolados bacterianos foram preparadas a partir do crescimento em TSA e conservadas durante todo o período do estudo sob congelamento em freezer a -20°C. O BHI-Glicerol foi preparado pela adição de 20% de glicerol (G5516, Sigma-Aldrich™) ao BHI (70138, Sigma-Aldrich™, USA). Volumes de 1,0 mL desse meio foram distribuídos em microtubos graduados de 1,5 mL e esterilizados por autoclavação a 121°C por 15 minutos para serem utilizados no preparo do “estoque permanente” (SAEKI *et al.*, 2015).

As amostras bacterianas congeladas BHI-glicerol, quando necessário, foram “ativadas” pela semeadura de uma “alçada” da suspensão de BHI-glicerol em tubos de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) (22092, Sigma-Aldrich™, USA). Os tubos foram incubados a 35°C por 16 a 18 horas, sendo então repicadas por esgotamento em uma placa de TSA, para verificação da viabilidade e pureza.

5.3.3.7 Rotinas de identificação dos isolados bacterianos

Com base na proposta metodológica desse estudo, foram estabelecidas rotinas de identificação dos isolados bacterianos com base no número de isolados que foram estudados e/ou valor do RO das embarcações, objetivando resultados rápidos e de menor custo.

Foi estabelecido que, em um cenário com um número de isolados bacterianos elevado e em que não exista um com prazo reduzido para liberação dos resultados (como por exemplo um navio de risco 1 que precise desatracar do berço rapidamente), a adoção de testes de triagem e provas bioquímicas pode ser necessária, a fim de minimizar os custos com as rotinas moleculares de PCR. Quando em situações de risco iminente, entretanto, como amostras de lastro de navios com risco 1 ou em países que estejam experimentando um

período de surto epidêmico, a metodologia, a partir das amostras dos tanques, pode ser abreviada com a realização da PCR diretamente dos isolados crescidos em TSA.

5.3.3.8 Testes de triagem e provas bioquímicas

Esta etapa estava prevista no planejamento do estudo para coletas de amostras de água de lastro de embarcações com risco 2 a 4 com testes de triagem e provas bioquímicas empregados são os mais utilizados por sua capacidade de diferenciação de *V. cholerae* de outras bactérias do mesmo gênero ou passíveis de serem em água do mar.

Após o crescimento das colônias suspeitas obtidas em Ágar TCBS, foram realizados o Testes de Crescimento em Ágar Nutriente 0% de NaCl (AN0), Teste da oxidase, *String Test* e as provas bioquímicas em Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (CDC, 2018.a; 2018.b), como descrito no fluxograma de decisão apresentado a seguir e representado na Figura 29.

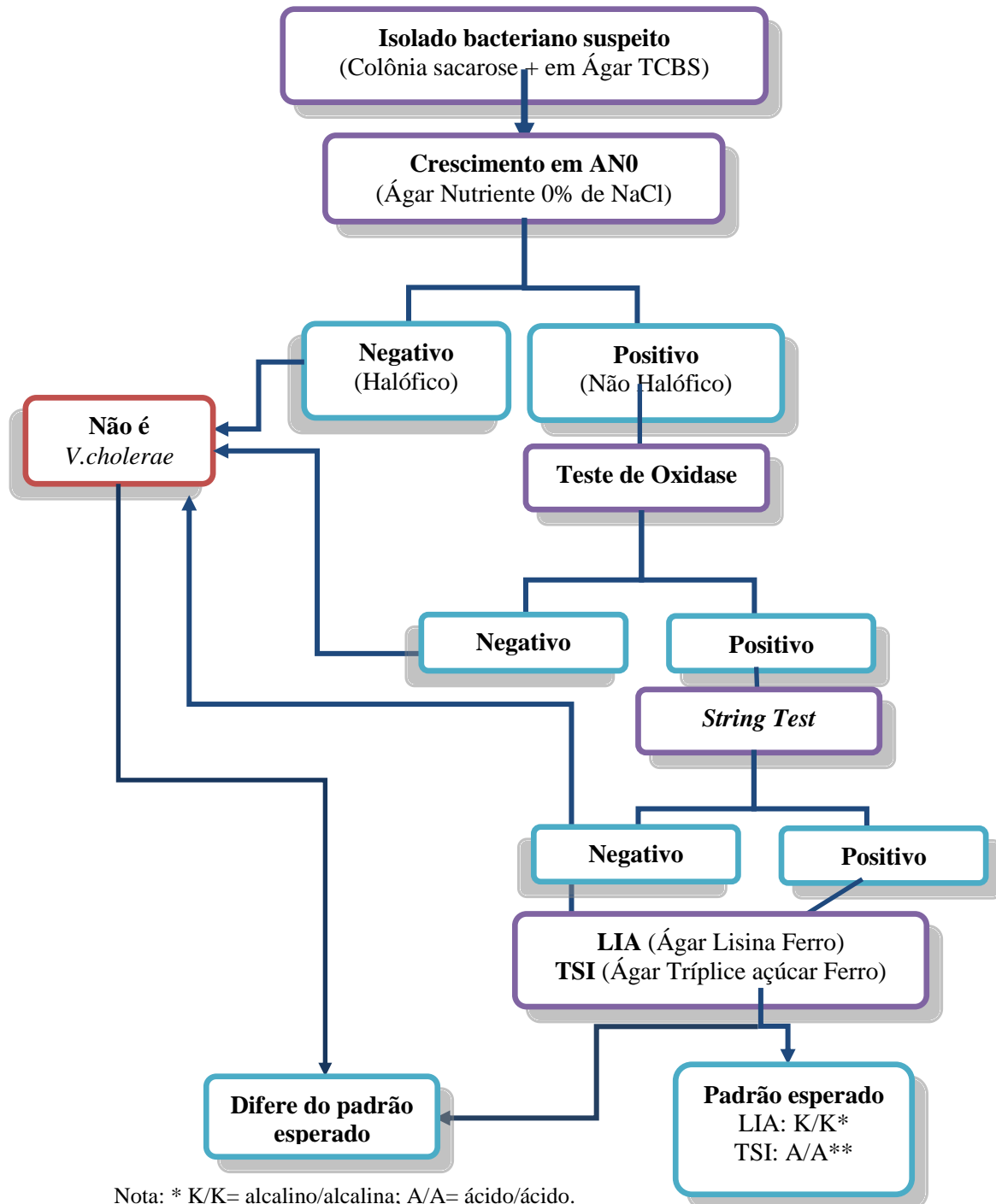
Uma visão da diferenciação de *V. cholerae* e outras bactérias relacionadas à água do mar, nos testes de triagem e provas bioquímicas empregados, é apresentada no Quadro 3.

O teste de crescimento em Ágar Nutriente com “0%” de NaCl tem como objetivo diferenciar *V. cholerae*, que tipicamente não é halófilo, de bactérias halofílicas. Para isso foi empregado o meio AN0, tendo como base a formulação do Caldo Nutriente (9 g /1 L de Peptona - RM0007, Himedia®, Índia; 1g /1 L de extrato de carne - RM0033, Himedia®, Índia; 2 g / 1 L de extrato de levedura - RM0027, Himedia®, Índia, adicionado de 15g/1000 mL de Agar Bacteriológico RM0026, Himedia®, Índia).

O Teste de Oxidase é um procedimento para determinar a presença de citocromo C no final da cadeia respiratória, catalisando o transporte de elétrons do NADH para o oxigênio. O reagente do teste atua comoceptor final de elétrons, no lugar do oxigênio, e sua oxidação determina o desenvolvimento de uma cor roxo-azulada (MAC FADDIN, 1993). Duas a três gotas do Reagente de Oxidase, uma solução aquosa a 1% tetrametil-p-fenilenodiamina (87890, Sigma-Aldrich™, USA) foram colocadas em uma tira de papel de filtro. Com uma alça plástica descartável estéril, uma colônia da bactéria foi transferida e espalhada no papel umedecido com o Reagente de Oxidase. O desenvolvimento de uma coloração azul-escuro foi considerado como reação positiva, ou seja, ocorre a presença da proteína (o organismo

investigado se apresenta dentro deste resultado). Quando a cor do papel de filtro permaneceu inalterada, a reação foi considerada negativa (CDC, 2018b).

Figura 29 - Fluxograma de decisão dos Testes de triagem e Provas bioquímicas de identificação dos isolados bacterianos



Quadro 3 - Características diferenciais de *V. cholerae* e outras bactérias do ambiente marinho nos testes de crescimento em Ágar Nutriente 0% de NaCl, Teste da Oxidase, *String Test*, Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)

Teste de Triagem e Provas Bioquímicas	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Enterobacteriaceae	Vibrios halofílicos
Crescimento em Ágar Nutriente 0% de NaCl	+	+	+	+	+	+	-
Teste da Oxidase	+	+	+	+	+	-	-
<i>String Test</i>	+	+	-	-	-	-	-
Ágar Lisina Ferro (LIA)	K/K	K/A	V	V	K/AG	K/A	V
Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)	A/A	K/A	V	A/AG	K/A	V	V

Legenda: (+) = Reação positiva; (-) = Reação Negativa
 (K/K) = Alcalino/Alcalino; (A/A) = Ácido/Ácido; (K/A) = Alcalino/Ácido; (V) = Variável
 (A/AG) = Ácido/Ácido com gás; (K/AG) = Alcalino/Ácido com gás.

Fonte: Adaptado de CDC, 2008b.

O *String Test* possibilita diferenciar *V. cholerae* e *V. mimicus* dos outros vibrios e demais organismos entéricos. O desoxicolato de sódio, em função da sua ação detergente, desorganiza a membrana externa e demais envoltórios celulares, ocasionando a liberação do DNA da bactéria. Neste teste, uma suspensão “pesada” bastante turva (CDC, 2018b) da amostras foi feita em uma gota de solução aquosa a 0,5% de desoxicolato de sódio (D6750, Sigma-Aldrich™, USA) com auxílio de uma alça de níquel-cromo. O aumento da viscosidade da suspensão e a formação de “fios” quando a alça é retirada da suspensão caracterizam um resultado positivo no teste (CDC, 2018b).

O Ágar Tríplice Açúcar Ferro (Ágar TSI) (K25-6200055, Kasvi®, Brasil) foi utilizado com o objetivo de verificar a capacidade dos isolados de utilizarem e produzirem gases a partir da glicose, lactose e sacarose, além de detectar a produção de H₂S pelos isolados (CDC, 2018b; MAC FADDIN, 1993). O Ágar Lisina Ferro (Ágar LIA) (M377, Himedia®, Índia) foi empregado para observação da capacidade dos isolados de descarboxilar a lisina, além de detectar a produção de H₂S pelos isolados (CDC, 2018b; MAC FADDIN, 1993).

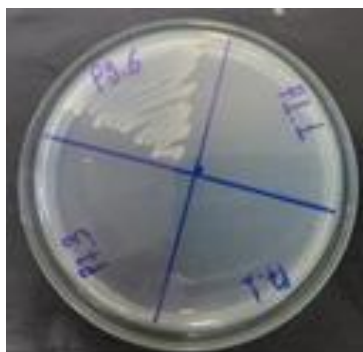
O TSI e o LIA foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante, sendo volumes de 4 mL do meio distribuídos em tubos 13 x 100 mm. Após a esterilização dos

tubos (121°C por 10 minutos), os meios foram solidificados na posição inclinada, de modo que a base do meio tivesse, no mínimo, 2,5 centímetros de altura. Esses meios foram semeados com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, a partir de colônias dos isolados em TSA, por picada na base e estrias no ápice.

Depois da sementeira, os meios foram incubados a 35°C por 18 a 24 horas. No caso dos tubos de TSI, deve ser observado que a tampa deve estar ligeiramente folgada, pois, se condições de anaerobiose forem geradas nos tubos, as reações características de *V. cholerae* podem não se desenvolver (CDC, 2018b; MAC FADDIN, 1993).

Após a incubação, as reações dos meios de cultura consideradas como presuntivas de *V. cholerae* foram: no Ágar TSI ápice ácido e base ácida, ausência de produção gases e H₂S negativo (reação A/A), indicando a fermentação dos carboidratos do meio, sem a produção de gases, e a incapacidade de produção de H₂S. No LIA ápice alcalino e base alcalina, H₂S negativo (reação K/K), indicando a descarboxilação da lisina e a incapacidade de produção de H₂S (CDC, 2018b; BAM, 2018b). Desse modo, os isolados desse estudo que apresentaram crescimento em meio AN0 0%, Oxidase e String positivos e reação A/A em Ágar TSI e K/K em LIA foram considerados como presuntivamente pertencentes à espécie *V. cholerae* (CDC, 2018b), sendo então submetidos à Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para sua caracterização molecular. Na Figura 30, são apresentados registros fotográficos dos resultados esperados para presuntivos de *V. cholerae* nos testes de triagem e provas bioquímicas utilizadas.

Figura 30 - Reações típicas de *V. cholerae* nos testes de triagem e provas bioquímicas



(a)



(b)

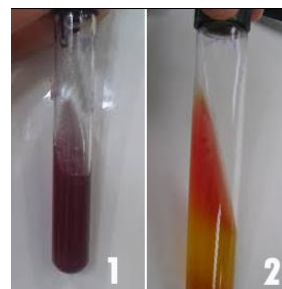
Figura 30 - Reações típicas de *V. cholerae* nos testes de triagem e provas bioquímicas (continuação)



(c)



(e)



(d)

Legenda: (a) Placa do Ágar Nutriente 0% de NaCl, apresentado crescimento de *V. cholerae* em um dos setores. (b) Teste da oxidase apresentando reação positiva (coloração roxa). (c) Formação de “colar” no *String Test*; (d) Teste LIA. No tubo da esquerda (d.1), coloração púrpura normal do meio e no tubo da direita (d.2) com coloração amarela, na base e no ápice, caracterizando a acidez do teste; (e) Teste TSI. No tubo da esquerda (e.1), coloração avermelhada típica do meio e no tubo da direita (e.2) com coloração amarela, na base e no ápice, caracterizando a acidez do teste.

Fonte: O Autor, 2020.

5.3.3.9 Caracterização molecular por PCR simples dos isolados bacterianos

A partir de colônias desenvolvidas no TSA, com auxílio de uma alça plástica descartável estéril, foi preparada em 1.000 μL de água ultrapura estéril uma suspensão com turvação visualmente semelhante ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL) em um microtubo com capacidade de 1,5 mL. Essa suspensão foi agitada vigorosamente em agitador mecânico tipo vortex, centrifugada (7.000 rpm por 10 min) e o “pellet” obtido ressuspenso em 300 μL de água ultrapura estéril.

Os microtubos foram colocados por 10 minutos em água em ebulição para lise das bactérias, possibilitando a extração do seu DNA. Os debris celulares foram removidos por centrifugação (7.000 rpm por 10 min) e duas alíquotas de 100 μL do sobrenadante contendo o

DNA extraído foram transferidas para novos microtubos com capacidade de 500µL. Esses tubos, contendo o DNA extraído dos isolados, foram mantidos congelados em freezer a -20°C até o momento de uso (NANDI *et al.* 2000).

Para as reações de amplificação dos fragmentos gênicos dos isolados pela técnica de PCR, foi utilizado o reagente *Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED* (Ampliqon A/S, Denmark). Este reagente é composto por Tris-HCl (pH 8,5), (NH₄)₂SO₄, 0,2% de Tween® 20, 2 U/µL de Taq DNA polimerase, 0,4 mM de cada dNTP, 4,0 mM de MgCl₂, estabilizador e corante inerte vermelho de corrida.

As misturas de reação foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL do reagente *Taq DNA polimerase 2x Master Mix RED*, 2µL da mistura dos oligonucleotídeos iniciadores (1 µM), 1 µL de DNA bacteriano e 9,5 µL de água ultrapura estéril, de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as reações realizadas, foram incluídos um controle negativo, em que o DNA bacteriano foi substituído por água ultrapura estéril e controles positivos selecionados a partir do DNA extraído das amostras de referência: *V. cholerae* O1 (INCQS: 00156), *V. cholerae* O1 (IAL 1965) e *V. cholerae* 0139 (IAL 2013). Além desses controles, todos os extratos de DNA e os isolados bacterianos foram testados quanto à presença de DNA sendo utilizado um primer (0,5 µM) para a região conservada do gene 16S rRNA, para evitar a ocorrência de falsos negativos (WEI *et al.*, 2014).

As misturas de reação foram submetidas à amplificação em um termociclador *LifePro* (Hangzhou Bioer Technology Co., China). O equipamento foi programado para um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento por 1 minuto nas temperaturas de cada oligonucleotídeo iniciador especificadas na Tabela 10, extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. A análise dos produtos amplificados obtidos nas reações de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose padrão de baixa eletroendosse (*Agargen, Hispanagar S.A., España*) a 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X (TBE 1 X = 0,089 M Tris, 0,089 M ácido bórico, 0,002 M EDTA, pH 8,0) (*Tris base, boric acid, EDTA - Hexapur® Amsterdam, Netherlands*).

As misturas termocicladas foram misturadas com “Corante *Safer*” (Kasvi, EUA), na proporção de 1µL do “Corante *Safer*” para 5 µL do termociclado, e aplicadas nos poços de gel de agarose e submetidas a uma corrente elétrica de 100 V por 30 a 45 minutos, dependendo do tamanho do produto amplificado. Após a eletroforese, a visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de um transiluminador de luz azul de LED,

sendo o tamanho dos produtos amplificados estimados por comparação com marcador de tamanho de DNA de 100 a 1500 pb (*00 bp DNA Ladder, Invitrogen™ - Life Technologies, Canadá*).

Tabela 10 - Oligonucleotídeos iniciadores, temperaturas de anelamento e produtos amplificados nas reações de PCR simples

Gene Alvo	Oligonucleotídeo iniciador (5'→3')	TA*	PA**	Referência
<i>ompW</i>	F= CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG R= GAACTTATAACCACCCGCG	64°C	588 pb	Nandi <i>et al.</i> (2000)
O1- <i>rfb</i>	F= GTTTCACCTGAACAGATGGG R= GGTCATCTGTAAGTACAAC	55°C	192 pb	Hoshino <i>et al.</i> (1998)
O139- <i>rfb</i>	F= AGCCTCTTTATTACGGGTGG R= GTCAAACCCGATCGTAAAGG	55°C	449 pb	Hoshino <i>et al.</i> (1998)
<i>16S rRNA</i>	F= CCTGGTAGTCCACGCCGTAA R= CGAATTAAACCACATGCTCCA	60°C	168 pb	Wei <i>et al.</i> (2014)

Legenda: *TA: Temperatura de anelamento (pode existir variação nos valores da temperatura de anelamento em relação às citadas nas referências, pois estas empregavam a técnica de PCR multiplex).

** PA: Produto Amplificado em pares de bases (pb).

Fonte: O Autor, 2020.

5.3.3.10 Identificação molecular da espécie *Vibrio cholerae*

A identificação dos isolados como pertencentes à espécie *V. cholerae* foi realizada com o emprego da técnica da PCR simples, com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos descritos por NANDI *et al.*, (2000), para a detecção de sequências do gene *ompW*. Este gene codifica uma proteína da membrana externa de 22 kDa relacionado com a resistência a concentrações salinas elevadas dessa espécie (FU *et al.*, 2018).

Os isolados cujo DNA extraído apresentaram na reação de PCR produtos amplificados como tamanho esperado - 588pb - foram identificados como pertencentes à espécie *V. cholerae*, sendo então realizada a determinação do seu sorogrupo e a pesquisa de genes relacionados com a virulência à caracterização molecular.

5.3.3.11 Determinação do sorogrupo O1 e O139 das amostras de *V. cholerae*

Nas reações de PCR simples para determinação dos sorogrupos O1 e O139, foram empregados oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem sequências específicas dos grupos de genes *rfb* desses sorogrupos (HOSHINO *et al.*, 1998).

Esses genes codificam enzimas necessárias para síntese do antígeno O, um componente do lipopolissacarídeo (LPS) dos envoltórios da bactéria que reage com os antissoros específicos empregados nas reações de aglutinação de caracterização dos sorogrupos de *V. cholerae* (STROEHER *et al.*, 1998).

Os oligonucleotídeos iniciadores empregados *O1-rfb* e *O139-rfb* determinam a formação de produtos amplificados de 192 pb e 449 pb, possibilitando a caracterização dos isolados da espécie *V. cholerae* como pertencentes aos sorogrupos O1 e O139. Quando não existiu reação de amplificação com o DNA dos isolados, esses foram classificados como “não O1/não O139” (“não O1/O139”).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todo o processo metodológico deste projeto foi alicerçado na resposta às três perguntas que balizaram todo o desenho experimental. Desta forma, a metodologia partiu do levantamento da vulnerabilidade do local de estudo e na construção de indicadores classificadores de risco das origens das embarcações. Para completar foi definida uma metodologia de análise microbiológica de amostras de água, tanto de água superficial na região de estudo quanto de água proveniente de tanque de lastro de embarcações selecionadas. Serão descritos abaixo os resultados obtidos para cada pergunta, atingindo, desta maneira, o principal objetivo proposto pelo projeto.

6.1 Pergunta 1: A região de descarga é vulnerável à introdução do vibrio colérico toxigênico?

Quanto ao levantamento bibliográfico citado no item 5.1 da proposta metodológica (item 2.1 da figura 20), foram encontrados dois artigos que relataram a presença do *V. cholerae*, não-O1 na Baía de Guanabara (RJ/Brasil): (i) Pereira *et al.* (2007), que detectou o organismo em amostra de mexilhões (*in natura* e pré-cozidos) comercializados na estação experimental de cultivo de mexilhões, situada em Jurujuba, Niterói, Rio de Janeiro e (ii) Silva *et al.* (2015), que isolou o vibrio de amostras superficiais da zona portuária da cidade do Rio de Janeiro.

No que se refere ao levantamento dos padrões de pH, salinidade e temperatura para sobrevivência do vibrio, a busca bibliográfica se baseou em 15 artigos, que julgamos mais relevantes pela metodologia e origem das cepas, os quais utilizaram amostras diversificadas no período: os anos de 1982 a 2018.

Os padrões de pH, salinidade e temperatura encontrados, em cada trabalho, assim como uma breve descrição dos trabalhos selecionados estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Natureza da amostra, sorogrupos, faixa de pH, salinidade, temperatura e descrição dos artigos selecionados

Referência	Natureza da amostra	Soro	pH	Salin.	Temp. (°C)	Descrição do artigo
(01) SINGLETON <i>et al.</i> , (1982)	Ambiental e Clínica	Não O1 e O1	NA	5 a 25	10 a 25	Preparou microcosmos com diversas faixas de salinidade (5, 15, 20 e 25) e diversas temperaturas (10, 15, 20 e 25°C), observando a taxa de crescimento no decorrer dos dias (até 8 dias). Ocorrência de crescimento em todas as faixas.
(02) TAMPLIN <i>et al.</i> , (1986)	Banco de amostras	O1	7,4 a 8,4 ⁽¹⁾	5 a 30 ⁽¹⁾	37 ⁽²⁾	Determinou o efeito da salinidade e matéria orgânica na produção da toxina colérica.
(03) MCCARTHY <i>et al.</i> , (1996)	Lastro	O1	NA	8 a 32	6 a 30	Comparou a sobrevivência do organismo em diversas faixas de salinidade em tanque de lastro e água do mar.
(04) MONTILLA <i>et al.</i> , (1996)	Ambiental	Não O1	7,1 a 7,6	<0,5 a 10	4 a 35	Investigação dos melhores valores de salinidade e temperatura na taxa de crescimento.
(05) PATEL <i>et al.</i> , (1999)	Banco de amostras	Não O1 e O1	7 a 11	NA	NA	Analisou a produção da toxina colérica, aumentando as concentrações de ferro em um ambiente aquático (relação positiva).
(06) LOUIS <i>et al.</i> , (2003)	Ambiental	O1 e O139	NA	2 a 14 ⁽³⁾	19 ⁽³⁾	Verificou a influência de salinidade na ocorrência de <i>Vibrio cholerae</i> .
(07) CHÁVEZ <i>et al.</i> , (2005)	Ambiental	O1	8,74 a 9,15	6,3 a 24,2	31,2 a 31,4	Verificou a influência da temperatura e da salinidade na ocorrência de <i>V. cholerae</i> , <i>E. coli</i> e <i>Salmonella spp.</i>
(08) THOMAS <i>et al.</i> , (2006)	Ambiental	Não O1 e O1	NA	15 a 35,5 ⁽⁴⁾	NA	Avaliou a ocorrência do <i>Vibrio cholerae</i> em água, sedimento e copépodos em uma ampla faixa de salinidade.

Tabela 11 - Natureza da amostra, sorogrupos, faixa de pH, salinidade, temperatura e descrição dos artigos selecionados (continuação)

Referência	Natureza da amostra	Soro	pH	Salin.	Temp. (°C)	Descrição do artigo
(09) RIVERA <i>et al.</i> , (2012)	Ambiental e Lastro	Não O1 e O1	NA	4,8 a 36,9	19 a 32	Analisou presuntivos isolados de amostras ambientais e de lastro.
(10) LUTZ <i>et al.</i> , (2013)	Ambiental	NA	NA	< 25 ⁽⁵⁾	>15 ⁽⁵⁾	Investigou bibliografia com o objetivo de verificar como o <i>V. cholerae</i> pode sobreviver a estressores (flutuações de falta de nutrientes, temperatura, salinidade e resistência à predação por protistas heterotróficos). (*) Valores médios ideais apontados em diferentes referências no artigo.
(11) ESTEVES <i>et al.</i> , (2015)	Ambiental	Não O1	NA	< 20	ND	Avaliou a taxa de recombinação gênica de cepas ambientais em baixa (<20) e altas (>20) taxas de salinidade.
(12) KOKASHVILI <i>et al.</i> , (2015)	Ambiental	O1 e O139	NA	3 a 20	7 a 28	Analisou presuntivos isolados de amostras ambientais com relação à salinidade e temperatura.
(13) SILVA <i>et al.</i> , (2015)	Ambiental	Não O1	7,7 a 8	0,6 a 31,2	25,4 a 27,9	Investigou a ocorrência do organismo e identificação de sorogrupo.
(14) CHOWDHURY <i>et al.</i> , (2017)	NA	NA	8,5 ⁽⁶⁾	15 ⁽⁶⁾	30	Afirmou as condições ótimas citando Montilla <i>et al.</i> , (1996).
(15) RYAN <i>et al.</i> , (2018)	Ambiental	O1 e O139	7 a 8	15 a 33	27 a 28	Investigação de ocorrência do organismo e identificação de sorogrupo com relação à salinidade, temperatura e sazonalidade em 5 ambientes estuarinos.

Legenda: Soro = Sorogrupo; Salin. = Salinidade; Temp. = Temperatura

ND = Não analisado

⁽¹⁾ Maior produção; ⁽²⁾ Medidas adotadas *in situ* no microcosmo.

⁽³⁾ Valores ideais

⁽⁴⁾ Em valores altos *Vibrio* foi encontrado parasitando copépodos na forma não cultivável.

⁽⁵⁾ Valores médios ideais apontados em várias referências no artigo.

⁽⁶⁾ Valores em desacordo com a referência citada.

Fonte: O autor, 2020.

De acordo com as referências selecionadas (Tabela 11), os limites para de tolerância para temperatura para sobrevida de *V. cholerae* foram entre 0 a 40°C com faixa ideal entre 15,0 a 29,0°C. Quando a análise se deteve apenas em amostras ambientais, a faixa ótima ficou entre 25,0 a 29,0°C (Tabela 12).

Quanto ao pH, os limites de tolerância para sobrevida do organismo, em relação aos valores de pH se situaram na faixa de 7,0 a 11,0 e a faixa ideal entre 7,0 a 8,5. Quando a análise de deteve apenas em amostras ambientais, a faixa ótima se situou entre 7,6 a 8,0, conforme a Tabela 13.

Tabela 12 - Faixas de variação de temperatura (°C) citadas nas referências selecionadas

Artigo	0 a 4	5 a 9	10 a 14	15 a 19	20 a 24	25 a 29	30 a 34	35 a 40
01			X	X	X	X		
02								X
03		X	X	X	X	X	X	X
04	X	X	X	X	X	X	X	X
06				X				
07							X	
09				X	X	X	X	
12		X	X	X	X	X		
13					X	X		
14							X	
15						X		

Nota: Dados não apresentados nos artigos 05, 08, 10 e 11.

(X) faixa encontrada por artigo.

A faixa ideal citada no artigo foi realçada em azul.

Faixa ótima para amostras ambientais foi realçada em vermelho.

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 13 - Faixas de variação do pH citadas nas referências selecionadas

Artigo	7,0 - 7,5	7,6 - 8,0	8,1 - 8,5	8,6 - 9,0	9,1 - 9,5	9,6 - 10,0	10,1 - 10,5	10,5 - 11,0
01								
02	X	X	X					
04	X	X						
05	X	X	X	X	X	X	X	X
07				X				
13		X						
15			X					

Nota: Dados não apresentados nos artigos 03, 06, 08, 09, 10, 11, 12 e 14.

(X) faixa citada no artigo.

A faixa ideal citada no artigo foi realçada em azul.

Faixa ótima para amostras ambientais foi realçada em vermelho.

Fonte: O autor, 2020.

Em relação à salinidade, os limites de tolerância para sobrevivência de *V. cholerae* detectado foram de 0,5 a 40 e a faixa ideal entre 5 e 24. Quando a análise se limitou apenas a amostras ambientais, a faixa ótima ficou entre 15,0 e 24,0 conforme descrito na Tabela 14.

Tabela 14 - Faixas de variações de salinidade citadas nas referências selecionadas

Artigo	0,5 a 4,0	5,0 a 9,0	10,0 a 14,0	15,0 a 19,0	20,0 a 24,0	25,0 a 29,0	30,0 a 34,0	35,0 a 40,0
01		X	X	X	X	X		
02		X	X	X	X	X	X	
03		X	X	X	X	X		
04	X	X	X					
06	X	X	X					
07		X	X	X	X			
08				X	X			
09		X	X	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X			
11	X	X	X	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X			
13		X	X	X	X	X	X	
14				X				
15				X	X	X	X	

Nota: Dados não apresentados no artigo 05.

(X) faixa encontrada por artigo.

A faixa ideal citada no artigo foi realçada **em azul**.

Faixa ótima para amostras ambientais foi realçada **em vermelho**.

Fonte: O autor, 2020.

Em acordo com todos os dados apresentados na Tabela 12, 13 e 14, no que se refere aos intervalos ótimos de temperatura, pH e salinidade para a sobrevivência do vibrião no ambiente, Silva *et al.* (2015) e Silva *et al.*, (2019b) detectaram condições favoráveis para o organismo nas águas portuárias da cidade do Rio de Janeiro.

A análise destes três parâmetros, nos artigos selecionados neste estudo, indica que o vibrião colérico vem apresentando características euribionticas em relação a estes indicadores.

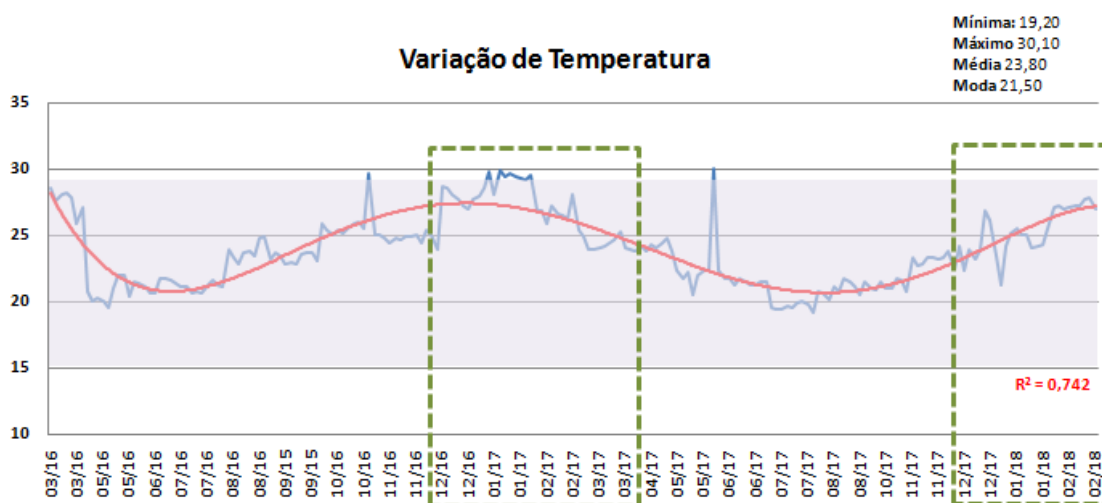
Apesar de os dados apresentados acima demonstrarem a susceptibilidade do local, não foi possível detectar nenhum relato de ocorrência do organismo, em sua forma toxigênica, no sítio de estudo. Por se tratar de um organismo autóctone de ambiente marinho, entretanto, toda área de água salgada ou salobra se apresenta como um local de potencial sobrevivência do *V. cholerae*.

No que se refere ao “Monitoramento das condições físico-químicas” item 5.1 da proposta metodológica (item 1.2 da figura 20), foi realizado o acompanhamento dos

parâmetros ambientais com intuito de reafirmar/confirmar a vulnerabilidade da área, assim como verificar possível mudança de valores dos parâmetros. Ocorreram, desta forma, 22 campanhas de monitoramento dos padrões físico-químicos (pH, salinidade e temperatura). Os valores dos parâmetros amostrados, assim como as condições ambientais, são apresentados no Apêndice 1.

Se compararmos os valores de temperatura detectados no monitoramento com os citados nas referências selecionadas descritas na Tabela 12, assim como nos outros trabalhos citados nesta sessão (Silva *et. al.*, 2015; Silva *et. al.*, 2019b), nota-se que, em todas as campanhas, a temperatura se encontrou dentro da faixa de sobrevivência do vibrio. Percebeu-se que, no período de verão, as temperaturas se apresentaram com valores mais propícios à sobrevivência do vibrio colérico conforme a Figura 31.

Figura 31 - Comparação da variação de temperatura (°C) detectada no sítio de estudo pelas campanhas de monitoramento com as citadas nas referências selecionadas



Nota: A faixa em realce **roxo** indica as condições ótimas detectadas nas literaturas selecionadas nas amostras ambientais.

A linha pontilhada **verde** mostra o período do verão que apresentou as temperaturas mais propícias ao organismo.

A linha **vermelha** mostra a curva de tendência do período.

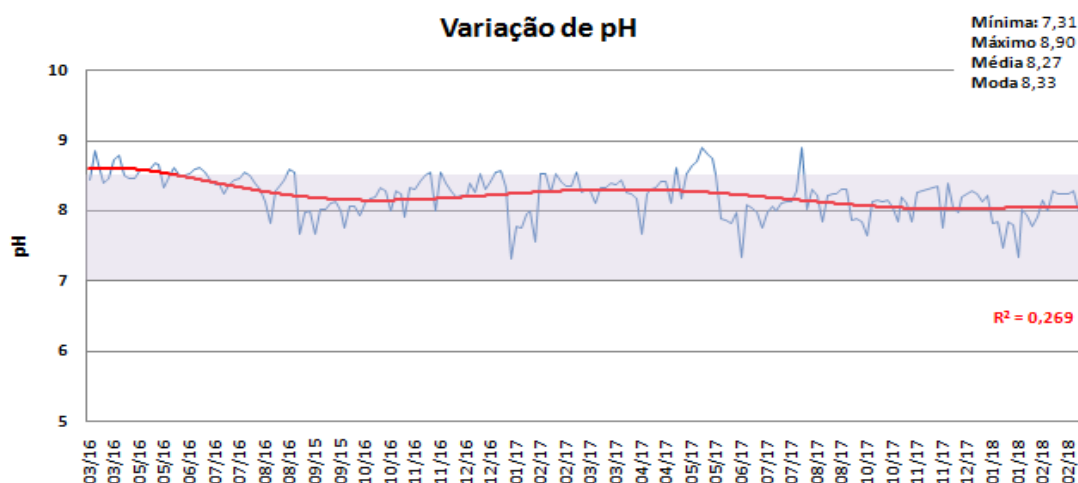
Fonte: O autor, 2020.

Os resultados de pH apresentados na Figura 32 mostram que, na maioria das vezes, a água se apresentou com valores adequados à existência do vibrio colérico segundo os dados obtidos nas referências descritas na Tabela 11. O pH tem relação direta com as condições

ambientais, principalmente no tocante à pluviosidade, podendo ocorrer oscilações nos valores entre as estações do ano, conforme aponta estudo de Braga *et al.*, (2017).

Outra análise importante na variação do pH dos corpos d'água está no processo de lixiviação que frequentemente incorpora, nos ambientes aquáticos, produtos complexos que acabam interferindo neste parâmetro, conforme exemplificado por Monqueiro *et al.*, (2020) que se refere aos herbicidas.

Figura 32 - Comparação da variação de pH detectada no sítio de estudo pelas campanhas de monitoramento com as citadas nas referências selecionadas



Nota: A faixa em realce **roxo** indica as condições ótimas detectadas nas literaturas selecionadas nas amostras ambientais.

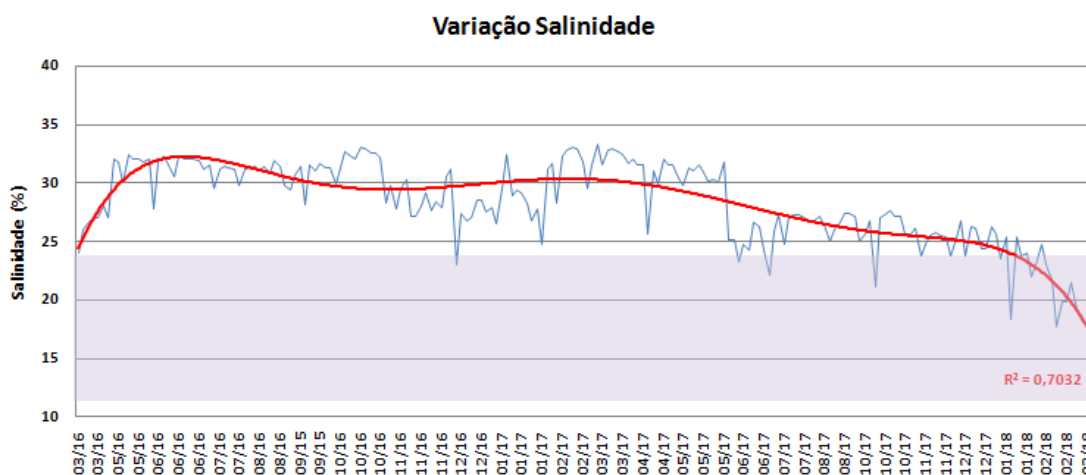
A linha **vermelha** mostra a curva de tendência do período.

Fonte: O autor, 2020.

Os valores de salinidade detectados nas campanhas comparados com os valores limítrofes detectados nos artigos (Tabela 11) mostraram que entre os três parâmetros monitorados (ph, salinidade e temperatura), a salinidade seria possivelmente o parâmetro de maior limitação à sobrevivência do organismo (Figura 33).

A quantidade de sais dissolvidos, entretanto, assim como outros parâmetros físico-químicos e bióticos presentes na água, pode variar de acordo com o tipo de ambiente, podendo estar em diferentes concentrações, mesmo dentro de um único corpo hídrico (NASSER, 2001). Pode variar espacial e sazonalmente, principalmente de acordo com o aporte de substâncias orgânicas e inorgânicas e com as taxas de evaporação e pluviosidade de uma região (STEWART, 2004).

Figura 33 - Comparação da variação de salinidade detectada no sítio de estudo pelas campanhas de monitoramento com as citadas nas referências seleccionadas



Nota: A faixa em realce **roxo** indica as condições ótimas detectadas nas literaturas seleccionadas nas amostras ambientais.

A linha **vermelha** mostra a curva de tendência do período.

Fonte: O autor, 2020.

Huq *et al.* (1984) demonstra que a temperatura tem influência direta na salinidade e assim na sobrevivência do *V. cholerae* e Nogueira *et al.*, (2002) detectou a presença do organismo em amostras de águas ambientais com salinidades variantes 0 a 22,5.

Toda esta caracterização de vulnerabilidade deve ser feita em cada região onde o método for aplicado, para verificar se a região efetivamente pode receber o organismo com condições de viabilidade, e para verificar se existe uma sazonalidade da variação dessas condições ambientais, o que pode implicar épocas de maior risco.

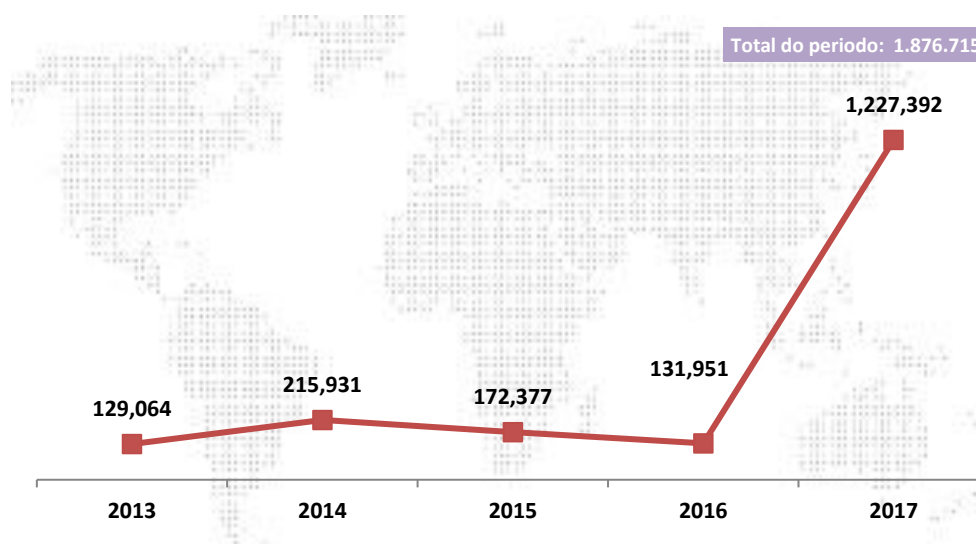
6.2 Pergunta 2: Alguma embarcação visitante pode introduzir o vibrio colérico toxigênico por água de lastro?

Com base na análise de um índice (Risco Origem - RO) adquirido pela soma de três indicadores (Incidência de Cólera - IIC, Acesso ao saneamento - ISB e País Contratante - IPC), podemos sugerir embarcações com maior risco de transportar o vibrio colérico do que outras.

No que se refere ao indicador incidência de Cólera (IIC), foram registrados 1.876,715 casos de Cólera em 69 países durante o período de 2013 a 2017. A doença apresentou um aumento (cerca de 68%) de casos entre o primeiro ano e segundo do monitoramento, decaindo cerca de 39% nos dois anos seguintes. Ocorreu, entretanto, um grande surto no Iêmen (1.049,232 casos), o que fez com que a Cólera registrasse em 2017 um número de casos maior que a soma dos casos de todos os anos anteriores (Figura 34).

Os valores das incidências detectadas, por país, entre 2013 e 2017, estão descritos no Apêndice 2.

Figura 34 - Incidência Mundial acumulada de Cólera entre os anos 2013 a 2017

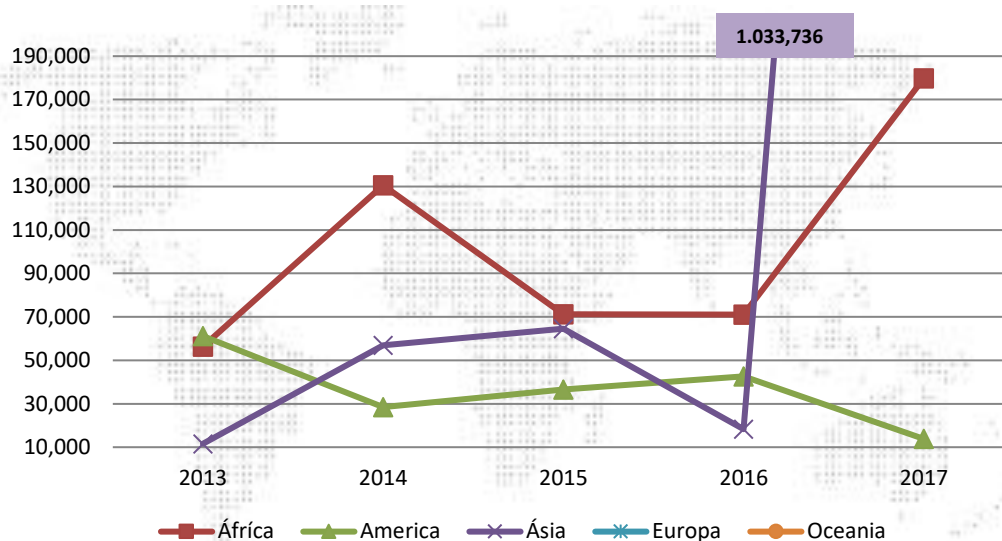


Fonte: Adaptado de WHO (2017).

No quinquênio analisado, mesmo com altas incidências registradas na Ásia em 2017 (devido ao Iêmen) e nas Américas (devido ao Haiti com 177.709 entre 2013 e 2017), o continente Africano foi o que apresentou maior incidência e prevalência, conforme mostra a Figura 35.

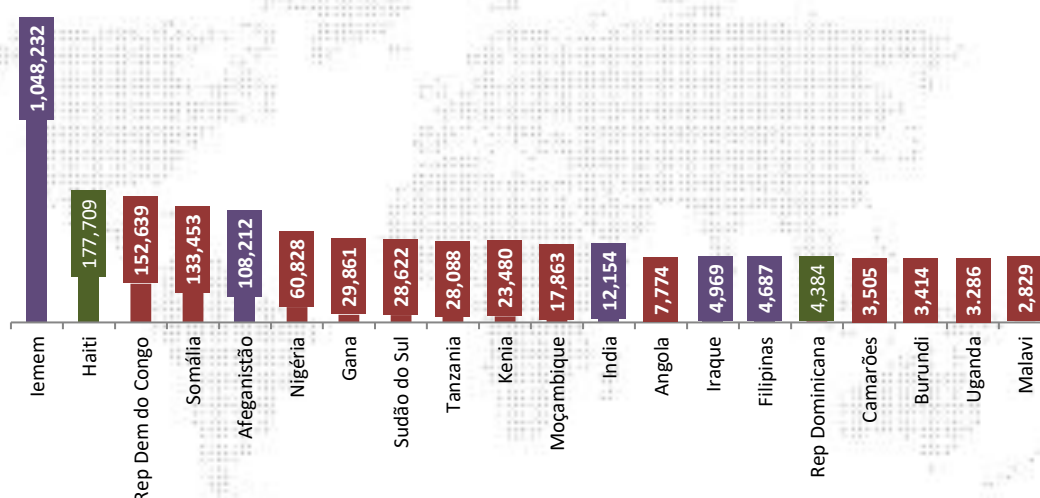
No tocante à análise por país, dos 20 países que apresentaram as maiores incidências acumuladas, cinco são asiáticos, dois americanos e treze africanos, conforme mostrado na Figura 36.

Figura 35 – Total de Incidência de Cólera (por Continente): 2013 a 2017



Fonte: Adaptado de WHO (2017).

Figura 36 - Vinte países com maiores incidências acumuladas: 2013 a 2017



Legenda: ▲ África ▲ América ▲ Ásia

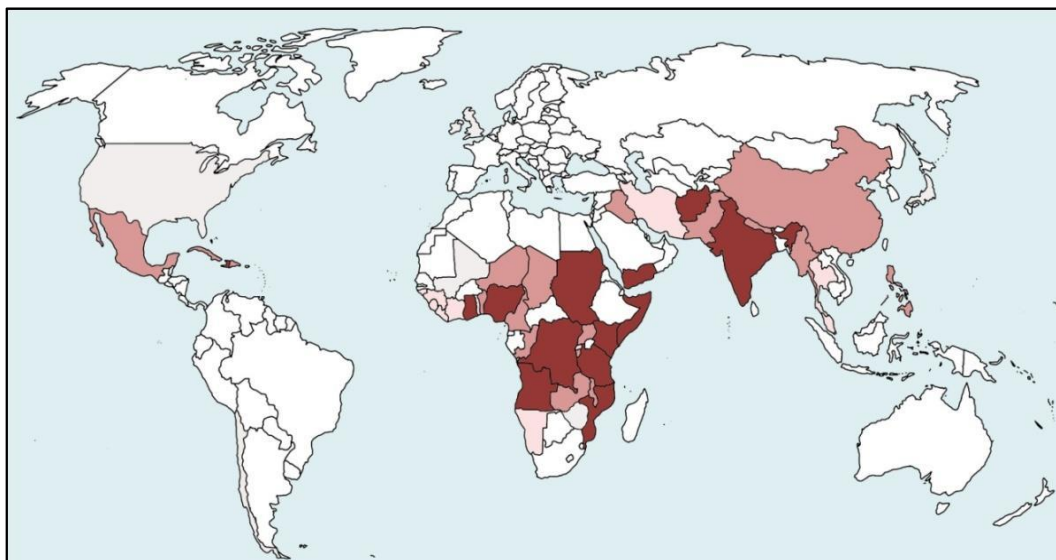
Fonte: Adaptado de WHO (2017).

Um importante ponto a ser levado em conta, no que se refere ao quantitativo de casos da doença em todo o mundo, está no problema das subnotificações (Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012), principalmente no caso das doenças relacionadas a populações negligenciadas como aponta Araújo *et al.*, (2013).

Outra exploração importante neste contexto paira sobre a atenção primária dada aos atendimentos em saúde, que passa pela análise individual do profissional de saúde que atende e, às vezes, acaba por não efetuar um diagnóstico eficiente, causando assim um caso de falso negativo e/ou positivo conforme apontado por Silva *et al.*, (2009) e investigado por Varallo *et al.*, (2018). Toda esta análise vem indicar que possivelmente o montante de incidência de Cólera deve ser maior do que o exposto pela OMS, principalmente nos países que apresentam problemas graves de desigualdade social, diagnóstico e comunicação da doença.

O mapa de incidência da Cólera, entre os anos de 2013 a 2017, está representado na Figura 37.

Figura 37 - Mapa de incidência de Cólera entre os anos de 2013 a 2017

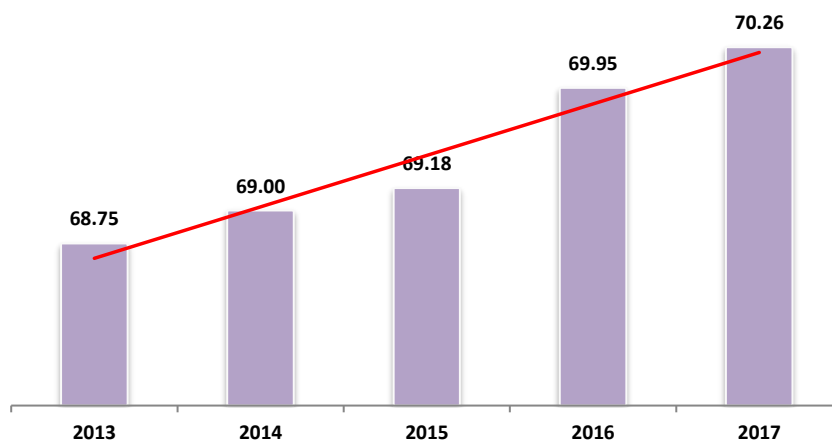


Legenda: ▲ até 100 casos registrados ▲ de 101 a 1000 casos registrados
 ▲ de 1001 a 5000 casos registrados ▲ Mais de 5.000 casos registrados

Fonte: Adaptado de WHO (2017).

Quanto ao Indicador de Acesso ao Saneamento (ISB), foi verificado que os percentuais das diversas populações com acesso ao saneamento, apesar de serem ainda baixos, apresentaram uma ligeira evolução durante todo o período conforme a Figura 38. Os dados obtidos sobre acesso ao saneamento estão descritos no Apêndice 2.

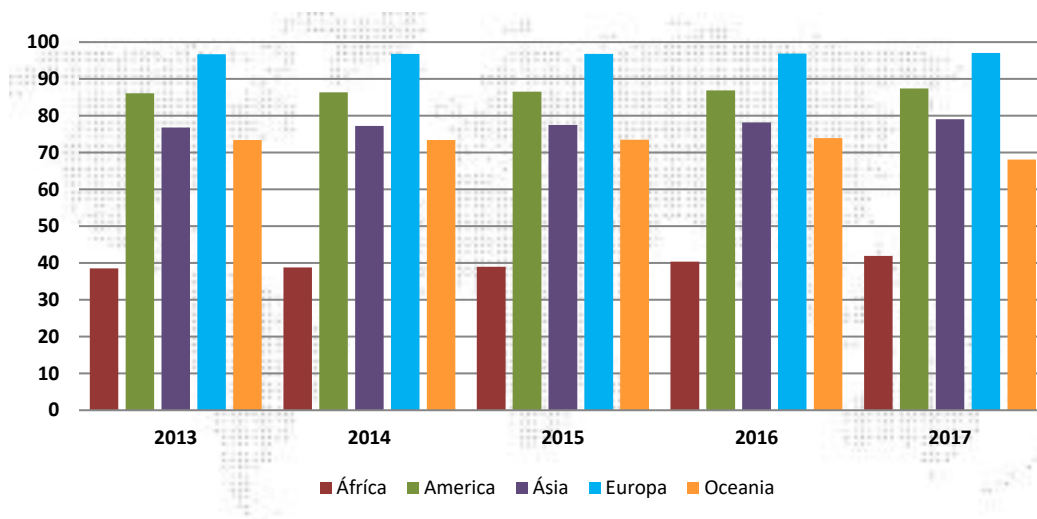
Figura 38 - Evolução de acesso ao saneamento entre os anos de 2013 a 2017 (Global)



Fonte: Adaptado de *World Bank* (2017).

Em relação à análise por continente, ocorreu uma pequena variação sem maior significância durante os anos de análise, em que o continente africano apresentou os piores índices durante todo período (Figura 39).

Figura 39 - Evolução de acesso ao saneamento por continente (2013 a 2017)



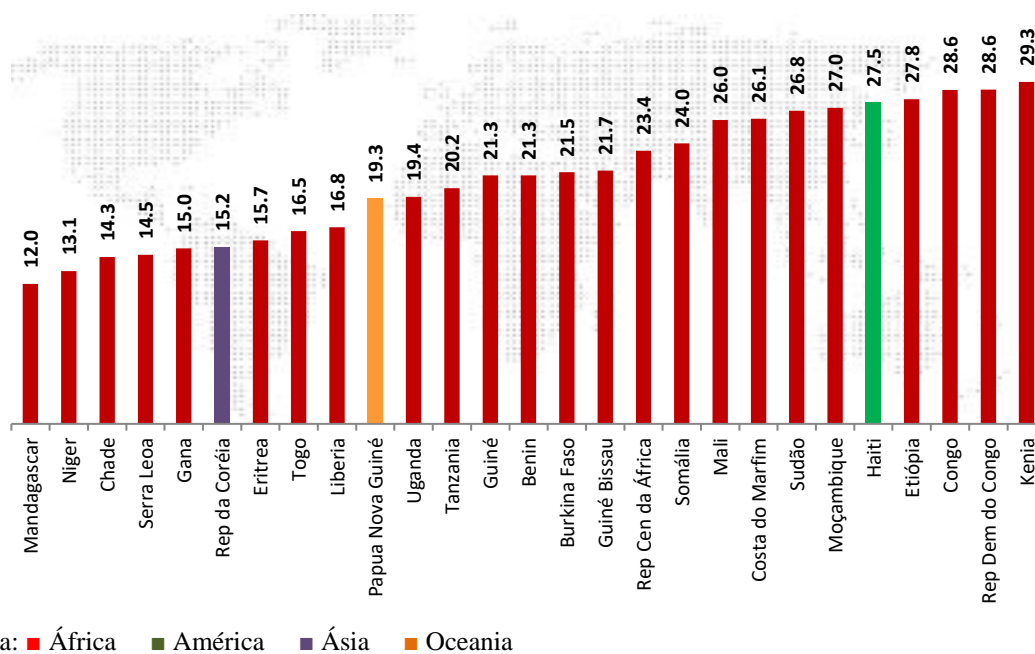
Fonte: Adaptado de *World Bank* (2017).

Esta situação de déficit de saneamento exemplificada pelos países africanos é muito preocupante, pois o indicador se baseia apenas no quantitativo de acesso ao saneamento e não

na qualidade do mesmo. Logo, a situação do saneamento básico se apresenta como extremamente grave e de ação primária em medidas de prevenção e controle de doenças infectocontagiosas em todo o mundo, principalmente em regiões negligenciadas.

Dos vinte e sete países que apresentaram o ISB abaixo dos 30%, em todos os anos, entre 2013 a 2017, apenas três não se situam na África: Haiti, Papua Nova Guiné e República Democrática da Coreia conforme mostra a Figura 40.

Figura 40 - Países com acesso ao saneamento inferior a 30% (2013 a 2017)



Fonte: Adaptado de *World Bank* (2017).

Em uma análise conjunta entre os indicadores ISB e IIC, fica clara a íntima relação entre eles, evidenciando que as questões socioambientais são de suma importância para análise de risco da Cólera conforme apontado por Silva *et al.*, (2019a).

O cenário de países que experimentam problemas graves no que se refere ao saneamento básico, e que acabam por ocasionar uma maior vulnerabilidade a vários agravos em saúde humana, entre elas a Cólera, pode ser agravada, e muito, por desastres naturais ou convulsões sociais (como, por exemplo, o Haiti e o Iêmen), conforme observado pelo levantamento de incidência da doença, nos países, durante todo este estudo.

No que se refere ao indicador País Contratante (IPC) dos 174 países registrados na IMO, em que 174 são Estados Membros, 81 países são signatários da Convenção *Ballast Water* 2004, conforme o Apêndice B. Apesar de um número baixo de signatários, os 81 países são detentores de cerca de 80% de toda frota mundial em operação.

O simples fato de ser parte contratante do protocolo não indica que o país membro fará todo o possível na elaboração de medidas quanto ao gerenciamento da água de lastro, mas que o país está de acordo com as normas e regras instituídas e que tem uma maior responsabilidade quanto ao problema (IMO, 2004).

Entretanto, este indicador merece uma reflexão sobre melhorias em sua importância e pontuação. Exemplo disto é o caso dos Estados Unidos, que não é parte contratante, mas possui uma política de gestão de lastro muito mais rígida que muitos países contratantes à convenção.

Com todos os indicadores propostos determinados, o Risco Origem (RO) de cada país foi calculado e estão representados na Tabela 15, assim como no Apêndice B e como a Tabela 16 mostra o percentual de cada risco calculado por continente.

Tabela 15 - Relação de Países por risco detectado

Risco	Alerta	País	Continente
1 - Alto	Vermelho	Afeganistão	Asiático
		Benin	Africano
		Burundi	Africano
		Camarões	Africano
		Chade	Africano
		Gana	Africano
		Guiné	Africano
		Guiné Bissau	Africano
		Haiti	Americano
		Iêmen	Asiático
		Índia	Asiático
		Kenia	Africano
		Malavi	Africano
		Moçambique	Africano
		Níger	Africano
		Nigéria	Africano
		República Democrática do Congo	Africano
		Serra Leoa	Africano
		Somália	Africano

Tabela 15 - Relação de Países por risco detectado (continuação)

Risco	Alerta	País	Continente
24 Países		Sudão do Sul	Africano
		Tanzânia	Africano
		Togo	Africano
		Uganda	Africano
2 - Moderado	Laranja	Africano do Sul	Africano
		Angola	Africano
		Bangladesh	Asiático
		Botsuana	Africano
		Burkina Faso	Africano
		Cabo Verde	Africano
		Camboja	Asiático
		Chile	Americano
		China	Asiático
		Comoros	Africano
		Congo	Africano
		Costa do Marfim	Africano
		Cuba	Americano
		Djibouti	Africano
		Eritréia	Africano
		EUA	Americano
		Etiópia	Africano
		Filipinas	Asiático
		Gabão	Africano
		Gâmbia	Africano
		Guatemala	Americano
		Holanda	Europeu
		Iraque	Asiático
		Israel	Asiático
		Itália	Europeu
		Kiribati	Oceania
		Libéria	Africano
		Mali	Africano
		Madagáscar	Africano
		Mauritânia	Africano
		Mianmar	Asiático
		Micronésia	Oceania
		Namíbia	Africano
		Nepal	Asiático
		Nicarágua	Americano
		Oman	Africano
		Papua Nova Guiné	Oceania
		Paquistão	Asiático
		República Central da África	Africano
		República da Coreia	Asiático
		República Dominicana	Americano
		Ruanda	Africano
		Rússia	Europeu

Tabela 15 - Relação de Países por risco detectado (continuação)

Risco	Alerta	País	Continente
51 Países		Saara Ocidental	Africano
		São Tomé e Príncipe	Africano
		Senegal	Africano
		Suazilândia	Africano
		Sudão	Africano
		Suécia	Europeu
		Tailândia	Asiático
		Venezuela	Americano
	Zimbábue	Africano	
3 – Baixo	Verde	Albânia	Europeu
		Alemanha	Europeu
		Antigua e Barbuda	Americano
		Arábia Saúdita	Asiático
		Argélia	Africano
		Argentina	Americano
		Arruba	Americano
		Austrália	Oceania
		Áustria	Europeu
		Bahamas	Americano
		Bélgica	Europeu
		Brunei Darassalam	Asiático
		Canadá	Americano
		Cazaquistão	Asiático
		Catar	Asiático
		Colômbia	Americano
		Croácia	Europeu
		Curaçao	Americano
		Dinamarca	Europeu
		Egito	Africano
		El Salvador	Americano
		Emirados Árabes	Asiático
		Equador	Americano
		Espanha	Europeu
		Fiji	Oceania
		Finlândia	Europeu
		França	Europeu
		Geórgia	Asiático
		Gibraltar	Europeu
		Grécia	Europeu
		Guiana Francesa	Americano
		Honduras	Americano
		Ilhas Cook	Oceania
		Ilhas Fiji	Oceania
		Ilhas Malvinas	Americano
		Ilhas Marshalls	Oceania
		Ilhas virgens	Americano
		Indonésia	Asiático
		Inglaterra	Europeu
		Irã	Asiático
		Irlanda	Europeu
		Jamaica	Americano
		Japão	Asiático
		Jordânia	Asiático
		Kuait	Asiático

Tabela 15 - Relação de Países por risco detectado (continuação)

Risco	Alerta	País	Continente
		Líbano	Asiático
		Lituânia	Europeu
		Malásia	Asiático
		Maldivas	Asiático
		Malta	Europeu
		Marrocos	Africano
		Martinica	Americano
		México	Americano
		Mongólia	Asiático
		Montenegro	Europeu
		Niue	Oceania
		Noruega	Europeu
		Nova Zelândia	Oceania
		Palau	Oceania
		Panamá	Americano
		Paraguai	Americano
		Peru	Americano
		Porto Rico	Americano
		Portugal	Europeu
		República Democrática do Laos	Asiático
		República Thecka	Europeu
		Santa Lúcia	Americano
		Seychelles	Africano
		Singapura	Asiático
		Síria	Asiático
		Sri Lanka	Asiático
		Suíça	Europeu
		Suriname	Americano
		Tonga	Oceania
		Trinidad e Tobago	Americano
		Tunísia	Africano
		Turquemenistão	Asiático
		Turquia	Asiático
		Tuvalu	Oceania
		Ucrânia	Europeu
81 Países		Uruguai	Americano
		Vietnã	Asiático

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 16 - Percentuais de risco/países por continente

Continente	Risco 1 (%)	Risco 2 (%)	Risco 3 (%)
América	3,13	21,9	75,0
África	38,5	51,9	9,6
Ásia	8,3	30,6	61,1
Europa	16,0	84,0	0,0
Oceania	23,1	76,9	0,0

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados obtidos pelo cálculo do risco das origens (RO) reafirmam a íntima relação das doenças infectocontagiosas (no caso deste estudo da Cólera) com os contextos socioambientais, muitas vezes prejudicadas por causas econômicas, reforçando, mais uma vez, que medidas preventivas de cunho socioambientais são ações eficazes no controle de doenças.

Nesta conjectura, Barata (2006) enaltece a influência direta entre a debilitação das estruturas econômicas mundiais com a causalidade das doenças transmissíveis, ocorrendo uma relação diretamente proporcional entre problemas sociais com a degradação ambiental e, conseqüentemente, com o aumento do risco do surgimento de doenças infectocontagiosas. Grande parte da alocação de recursos e fomento a ações mitigadoras às doenças infectocongiósas acaba dependendo de qual fração da população é atingida em um olhar quantitativo e qualitativo.

Toda esta situação descrita acima elucidada a antagonia de fragmentos populacionais, coexistindo em um espaço geográfico (seja ele mundial, continental, nacional, regional ou local), e com isso a discussão sobre conceito de vulnerabilidade, desigualdade e justiça ambiental (GRISSOTI, 2004). A Figura 41 proposta por Morse (1995) ilustra bem esta relação entre agravos à saúde humana e a relação desses com algumas causalidades antrópicas contribuintes para sua emergência.

Conforme citado no item 2.2 da figura 20 da proposta metodológica, foi realizado o monitoramento das embarcações visitantes ao porto da cidade do Rio de Janeiro entre o dia 02 de janeiro de 2016 e 29 de janeiro de 2018, totalizando 253 dias com 3350 atracações registradas. Foram perdidos, entretanto, 23 dias (9,1%) por motivos diversos motivos operacionais de acessibilidade a plataforma, totalizando 3350 visitas observadas conforme descrito no Apêndice 2.

Na análise por origens continentais, 70,03% das embarcações foram de procedência americana (incluindo aqui as originárias de portos brasileiros), 7,91% europeia, 5,25% asiática, 4,36% africana, 0,69% da Oceania e, em 11,76% dos casos, não foi possível detectar essa informação por falta de dados na plataforma.

Quanto à movimentação por período, notou-se uma maior visita nos segundos semestres anuais, com destaque para o período de maio a agosto de 2016 (Figura 42). Em relação ao tipo de navegação, um total de 1.687 visitas (50,36%) foram de embarcações provenientes de portos brasileiros. É importante ressaltar que a maior parte do tráfego marítimo ao longo do litoral brasileiro é feito por embarcações registradas em outros países, conforme verificado pelo nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA *et al.*, 2019), o que dificulta a

questão da amostragem, já que essas embarcações tecnicamente constituem território estrangeiro. Essa intensa movimentação ao longo do nosso litoral implica a possibilidade concreta de transferência do vibrio entre os portos nacionais, caso ele seja introduzido em algum porto situado em nossas águas territoriais.

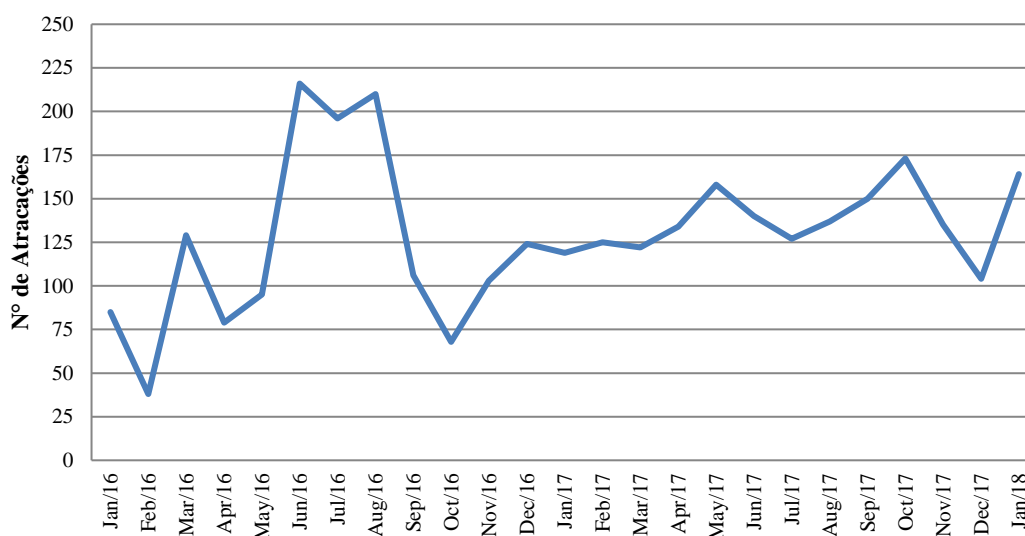
Figura 41 - Exemplos de agravos à saúde humana e alguns fatores de contribuição antrópicas de emergência

Agravos à saúde humana	Fatores contribuintes para sua emergência
Argentine, Bolivian hemorrhagic fever	Changes in agriculture favoring rodent host
Bovine spongiform encephalopathy (cattle)	Changes in rendering processes
Dengue, dengue hemorrhagic fever	Transportation, travel, and migration; urbanization
Ebola, Marburg	Unknown (in Europe and the United States, importation of monkeys)
Hantaviruses	Ecological or environmental changes increasing contact with rodent hosts
Hepatitis B, C	Transfusions, organ transplants, contaminated hypodermic apparatus, sexual transmission, vertical spread from infected mother to child
HIV	Migration to cities and travel; after introduction, sexual transmission, vertical spread from infected mother to child, contaminated hypodermic apparatus (including during intravenous drug use), transfusions, organ transplants
HTLV	Contaminated hypodermic apparatus, other
Influenza (pandemic)	Possibly pig-duck agriculture, facilitating reassortment of avian and mammalian influenza viruses*
Lassa fever	Urbanization favoring rodent host, increasing exposure (usually in homes)
Rift Valley fever	Dam building, agriculture, irrigation; possibly change in virulence or pathogenicity of virus
Yellow fever (in "new" areas)	Conditions favoring mosquito vector
Bacterial	
Brazilian purpuric fever (<i>Haemophilus influenzae</i> , biotype <i>aegyptius</i>)	Probably new strain
Cholera	In recent epidemic in South America, probably introduced from Asia by ship, with spread facilitated by reduced water chlorination; a new strain (type O139) from Asia recently disseminated by travel (similarly to past introductions of classic cholera)
<i>Helicobacter pylori</i>	Probably long widespread, now recognized (associated with gastric ulcers, possibly other gastrointestinal disease)
Hemolytic uremic syndrome (<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	Mass food processing technology allowing contamination of meat
<i>Legionella</i> (Legionnaires' disease)	Cooling and plumbing systems (organism grows in biofilms that form on water storage tanks and in stagnant plumbing)
Lyme borreliosis (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	Reforestation around homes and other conditions favoring tick vector and deer (a secondary reservoir host)
<i>Streptococcus</i> , group A (invasive; necrotizing)	Uncertain
Toxic shock syndrome (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Ultra-absorbency tampons
Parasitic	
<i>Cryptosporidium</i> , other waterborne pathogens	Contaminated surface water, faulty water purification
Malaria (in "new" areas)	Travel or migration
Schistosomiasis	Dam building

Nota: (*) O reaparecimento da gripe deve-se a dois mecanismos distintos: epidemias anuais ou bienais que envolvem novas variantes, devido à deriva antigênica (mutações pontuais, principalmente no gene da proteína de superfície, hemaglutinina) e cepas pandêmicas, do deslocamento antigênico (rearranjo genético, geralmente entre cepas de influenza aviária e de mamífero).

Fonte: Morse (1995).

Figura 42 - Movimentação mensal de embarcações no porto da cidade do Rio de Janeiro no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2018



Fonte: Adaptado de *Marine Traffic*®

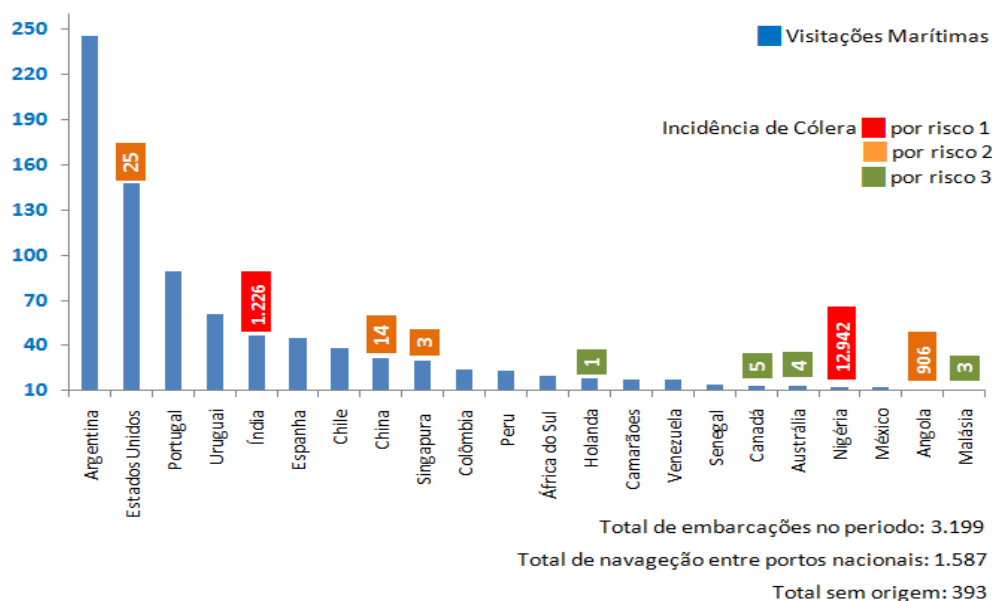
Exemplificando a correlação entre as atracações no porto da cidade do Rio de Janeiro e as incidências de Cólera mundiais, foi construída uma relação entre estes dois parâmetros no período de 2016 a 2017 (período no qual ocorrem dados para ambas variáveis), apontando as origens principais de amostragem neste período (Figura 43).

No intervalo, foram monitoradas 3.199 atracações, e em 393 delas não foi possível detectar a origem e 1587 foram provenientes do próprio território nacional, restando 1219 de longo curso (que são o objeto da Convenção BWM, IMO 2004). Detectamos, entretanto, no monitoramento deste trabalho, muitas embarcações de longo curso que estavam realizando transporte entre portos situados no nosso território.

Segundo a NORMAM-20 (BRASIL, 2019), cabe aos agentes da autoridade marítima verificar, por meio de inspeções, o cumprimento da presente norma, especificadamente do padrão D-2, embarcações brasileiras e estrangeiras. Contribuindo, então, neste íterim, a metodologia proposta conseguiu apontar, como prioridade para amostragem, de todas as 3.350 atracações monitoradas, 76 atracações de risco 1 e 310 de risco 2, representando uma diminuição de 97,7% e 90,7%, respectivamente.

Desta forma, o processo de classificação de navios alvos, assim como a priorização destes para amostragem no que se refere à verificação do cumprimento do padrão D-2 na questão do *V. cholerae* toxigênico se mostrou promissora para aplicação em outros portos nacionais.

Figura 43 - Movimentação, por origem, do porto do Rio de Janeiro e Incidência de Cólera (2016-2017)



Fonte: Adaptado WHO, 2017; *Marine Traffic*®, 2017.

6.3 Pergunta 3: Os lastros das embarcações visitantes, assim como o local de estudo, têm ocorrência do vibrio colérico toxigênico?

Foi realizada a criação de um protocolo de análise microbiológica para identificação do *V.cholerae*, e, se necessário, a verificação da existência da forma toxigênica, proveniente de amostragens em águas superficiais do sítio de estudo de dos tanques de lastro.

6.3.1 Amostragem do sítio de estudo (Baía de Guanabara/RJ)

A amostragem superficial do sítio de estudo ocorreu no dia 21 de janeiro de 2019, com as seguintes condições ambientais: temperatura (mínima 27°C / máxima 32°C), umidade relativa do ar de 86%, tempo ensolarado, oscilação de maré de 1.0 a 0.5 durante a coleta e vento noroeste com velocidade de 5 km/h. A partir de todas as amostras de água do mar coletadas, foram isolados e identificados presuntivamente como pertencentes à espécie *V. cholerae*, no Ágar TCBS, assim como nos testes de triagem e provas bioquímicas realizadas.

A identificação desses isolados foi confirmada molecularmente pela técnica de PCR, e nenhum pertencia aos sorogrupos toxigênicos O1 e O139. Os resultados das análises físico-químicas realizadas no momento da coleta das amostras para as análises microbiológicas e os resultados dessas são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Padrões físico-químicos e resultados da análise microbiológica detectada a partir da coleta do local de estudo (Baía de Guanabara/RJ)

Amostra	Local	Padrões Físico-químicos			Testes de Triagem					PCR		
		Ph	Temperatura (°C)	Salinidade	NaCl 0%	Oxidase	String Test	LIA	TSI	V.C	O1	O139
1.6	Canal do Cunha	8,25	27,80	25,40	+	+	+	+	+	+	-	-
1.8	Canal do Cunha	8,25	27,80	25,40	+	+	+	+	+	+	-	-
1.9	Canal do Cunha	8,25	27,80	25,40	+	+	+	+	+	+	-	-
1.10	Canal do Cunha	8,25	27,80	25,40	+	+	+	+	+	+	-	-
1.11	Canal do Cunha	8,25	27,80	25,40	+	+	+	+	+	+	-	-
1.13	Canal do Cunha	8,25	27,80	25,40	+	+	+	+	+	+	-	-
1.14	Canal do Cunha	8,25	27,80	25,40	+	+	+	+	+	+	-	-
2.2	Cais São Cristóvão	8,15	27,00	25,90	+	+	+	+	+	+	-	-
2.4	Cais São Cristóvão	8,15	27,00	25,90	+	+	+	+	+	+	-	-
2.10	Cais São Cristóvão	8,15	27,00	25,90	+	+	+	+	+	+	-	-
3.6	Canal do Mangue	8,39	27,20	21,60	+	+	+	+	+	+	-	-
3.7	Canal do Mangue	8,39	27,20	21,60	+	+	+	+	+	+	-	-
4.19	Cais Gamboa	8,25	27,30	25,30	+	+	+	+	+	+	-	-
5.6	Museu do Amanhã	8,28	27,20	25,90	+	+	+	+	+	+	-	-
6.8	Cais Caju	8,32	27,20	21,60	+	+	+	+	+	+	-	-
6.12	Cais Caju	8,32	27,20	21,60	+	+	+	+	+	+	-	-

Fonte: O autor, 2020.

6.3.2 Amostragem de tanques de lastro

Todo acompanhamento das embarcações, conforme descrito na metodologia, foi realizado com o auxílio da plataforma virtual de AIS (*Automatic Identification System*) *Marine Traffic*. Entretanto, nos ensaios de amostragem, percebeu-se que essa ferramenta não atendia, com exatidão, aos horários de chegada da embarcação no porto de estudo, sendo observado que muitos navios não haviam chegado à data indicada pela plataforma, assim

como outros já até haviam partido antes do previsto. Silva *et. al.*, (2015) e Silva *et. al.*, (2016) se depararam com problemas similares na utilização desta ferramenta.

Desta forma, a plataforma foi utilizada inicialmente para o alerta da chegada de navios “alvos” e, a partir daí, foi realizada uma verificação diária no *site* da praticagem do porto do Rio de Janeiro (<http://www.praticagem-rj.com.br/>), para identificar com exatidão a data e hora de atracação das embarcações alvos. Outra constatação importante é que o período de monitoramento adotado (a cada 3 dias) no sistema AIS é ineficiente para embarcações que circulam entre portos próximos, sugerindo-se que o mesmo seja realizado com intervalos máximos de 24 horas. Como foi utilizada a versão gratuita do *Marine Traffic*, só foi possível colher informações do último porto visitado, e é exatamente neste ponto que observamos outro problema no monitoramento: a embarcação, quando entra em águas portuárias, mas não realiza a atracação por motivos de praticagem ou disponibilidade de berço, ainda assim recebe o *status* de chegada no *Marine Traffic*. Esse pequeno detalhe cria um problema para a equipe de abordagem, porque, em princípio, só podem ser abordadas as embarcações efetivamente atracadas.

Na tentativa de solucionar esse problema, foi utilizada outra ferramenta de AIS, o *Vessel Finder*, que se mostrou muito mais eficiente neste ponto: a mesma apresenta os cinco últimos portos visitados. Assim sendo, quando o porto de origem e de destino eram o mesmo, confirmava-se a situação anteriormente descrita e então era possível verificar que a sua verdadeira origem era a anterior ao porto de destino inicialmente descrito (Figura 44).

Figura 44 - Exemplo de erro detectado na ferramenta de AIS utilizada como apoio ao monitoramento



Nota: Quadrado **vermelho** mostrando que o porto de origem e destino são os mesmos. Neste caso, o verdadeiro porto de origem é o segundo na lista de *Recent Port Calls*. No exemplo acima, o porto de Sines, em Portugal, é o verdadeiro porto de origem.

Fonte: *Vessel Finder*®, (2020).

Outro problema diagnosticado *in loco*, nas visitas realizadas ao porto, foi a observação de embarcações atracadas em algum berço do porto (em consonância com o *Marine Traffic* e *Vessel Finder*), mas não que não constavam no *site* da praticagem.

Entrando em contato com a superintendência dos práticos do porto (contato pessoal), foram detectados alguns entraves ao monitoramento dos navios atracados que explicaram a observação do parágrafo anterior: (i) Nem todas as embarcações precisam de práticos e, assim sendo, não são controladas pelo *site* dos práticos para a manobra de atracação e, (ii) Qualquer embarcação que requer um práctico só entra no *site* quando é solicitada alguma manobra (entrada ou saída), ou seja, estando o navio atracado - ou efetivamente já em curso - ele deixa o registro da praticagem.

A detecção de todos estes entraves só foi possível na execução da metodologia e sugere a necessidade de aperfeiçoamento do método de rastreamento de navios estabelecido nesse estudo. Essa etapa é fundamental para uma adequada seleção de “alvos” para o monitoramento microbiológico das águas de lastro. A seleção de navios alvos teve como foco a origem da embarcação, uma vez que a origem do lastro só é possível de ser verificada com acesso ao Formulário de Lastro presente nas embarcações. Logo, partimos do ponto que, sendo a embarcação de longo curso, a mesma, poderia ter realizado manobras com lastro no último porto visitado.

O formulário de lastro é preenchido manualmente pela equipe a bordo, e segundo o item 2.2, da NORMAM 20 (BRASIL, 2019), deveria ser enviado ao Estado do porto até 4 horas após a sua atracação ou fundeio. Entretanto verificamos, durante todo o projeto que o acesso aos formulários ainda é muito complicado, ou pelo não cumprimento do prazo de envio estabelecido pela legislação ou pela falta estruturação das autoridades competentes em organizar os mesmos.

A amostragem de lastro foi realizada em duas embarcações: navio de amostragem 1 (N1), embarcação *Roll On - Roll Off* (transportadora de veículos), carga esta coletada na China e distribuída por vários países da Costa Ocidental do Continente americano, tendo passado antes de chegar ao porto do Rio por diversos portos brasileiros também, de forma que foi classificada como de risco 4, que foi realizada no dia 18 de novembro de 2019. O navio, registrado com a bandeira do Panamá, batimento de quilha em 2006, com dimensões de 179,99m x 32,2m com 14 tanques de lastro (volume total de 75.843m³) e sem tratamento a bordo, estava atracado em um berço do Cais São Cristóvão e no navio de amostragem 2 (N2) embarcação contêiner, proveniente de Singapura (risco 2), registrado na bandeira de Malta,

batimento de quilha em 2017, com dimensões de 299,92m x 48,33 com 26 tanques de lastro (volume total de 31.746 m³), equipado com sistema de tratamento por filtração e radiação ultravioleta, em consonância com o padrão D-2. Esta ocorreu amostragem ocorreu no dia 04 de dezembro de 2019, e o navio estava atracado em um berço do Cais São Cristóvão.

Em ambos os casos (e mais o NT), tivemos amplo acesso aos navios e seus sistemas, aos dados referentes ao sistema de lastro e aos tripulantes (comandante ou imediato geral responsável) responsáveis por essa operação.

O NT e N2 tinham a bordo todos os equipamentos e documentos referentes à gestão de lastro disponíveis, enquanto o N1, apesar de ter toda documentação referida, não apresentava o padrão D-2, utilizando somente o padrão D-1 (troca oceânica). Na embarcação N1, que não era equipada com sistema de tratamento, a amostragem foi feita diretamente no tanque anterior a boreste. Ao chegar ao acesso do tanque, com o agulheiro aberto, foi utilizada uma bomba manual (Figura 25) com mangueira previamente assepsiada por álcool 70%, com a qual foi recolhido 1 litro de amostra, dividido em dois frascos de 500 mL, previamente autoclavados. No N2, a amostragem foi feita diretamente na saída do sistema, localizada na praça de máquinas. A Figura 45 é um registro fotográfico do local de coleta da água de lastro no suspiro durante a amostragem.

Os resultados da análise microbiológica das amostras dos tanques de lastro dos dois navios amostrados (N1 e N2) estão descritos na Tabela 18.

A constatação da presença do vibrio colérico, na sua forma não toxigênica, nas águas portuárias do local de estudo confirma o estabelecimento do organismo na Baía de Guanabara (RJ/Brasil) de acordo com trabalhos anteriores citados nesta sessão.

A presença do *V.c* não toxigênico no lastro de N1 (tabela 18) sugere duas linhas causais: (i) que a bactéria se encontra presente não só próximo ao litoral, mas distante da mesma, ao longo da costa brasileira, já que a lastragem ocorreu a aproximadamente 200 milhas náuticas da costa ou (ii) que o organismo tenha se estabelecido no microcosmo do tanque advindo de coletas anteriores. Em conformidade com este fato, vários estudos citados ao longo deste trabalho mostram a presença do organismo (nas suas formas toxigênicas ou não) em tanques de lastro de navios ao redor do mundo.

Em N2 (longo curso e com tratamento), o *Vibrio cholerae* não foi detectado, validando assim a eficiência do tratamento de água de lastro utilizado em concordância com o padrão D-2.

Tabela 18 - Parâmetros Físico-químicos e resultados da análise microbiológica a partir da coleta de lastro diretamente nas embarcações (continuação)

Embarcação		Padrão Físico Químicos			Amostra	Testes de Triagem					PCR		
Navio	Origem do Lastro	Ph	Temperatura (°C)	Salinidade		NaCl 0%	Oxidase	<i>String Test</i>	LIA	TSI	V.C	O1	O139
N2	Porto de Singapura	7,70	28,10	27,90	N2.1	-	+	+	+	+	-	-	-
					N2.2	-	+	+	+	+	-	-	-
					N2.3	-	+	+	+	+	-	-	-
					N2.4	-	+	-	+	+	-	-	-
					N2.5	-	+	+	+	+	-	-	-
					N2.6	-	+	-	+	+	-	-	-
					N2.7	-	+	-	+	+	-	-	-
					N2.8	-	+	+	+	+	-	-	-

Fonte: O autor, 2020.

CONSIDERAÇÕES E RECOMENDAÇÕES FINAIS

Uma proposta metodológica permite a verificação de todo seu escopo, passando por vários levantamentos de hipóteses, experimentações, teste, ajustes e retestes até sua validação e aceitação pelos órgãos reguladores ou contratantes. Entretanto, nota-se a necessidade de rotineiras atualizações em qualquer metodologia utilizada para quaisquer fins, uma vez que padrões, cenários, realidades, agentes e determinantes são mutáveis, pressionado assim o novo método para um molde flexível e fluido, de fácil replicação em variantes temporais e espaciais. Outro fator importante, com que a ferramenta deve se preocupar, é com a redução de custo e qualificação do pessoal responsável.

Em saúde pública, o termo meio ambiente toma uma dimensão mais ampla do que apenas fatores ecossistêmicos naturais e características bióticas e abióticas de um determinado meio natural. O termo envolve uma complexidade de variáveis interligadas, agindo mutuamente para a construção de um determinado cenário. O que irá determinar uma patologia não é apenas a exposição ao seu agente causador, mas também toda a carga histórica, social, econômica da região afetada, agregando variáveis aos estudos epidemiológicos em gestão ambiental.

No caso da área de estudo deste trabalho, o sítio de estudo se mostrou suscetível ao estabelecimento da forma toxigênica da bactéria no tocante aos intervalos de pH e temperatura levantados nas campanhas de monitoramento (comparado com valores destes nas literaturas selecionadas), em que a salinidade se apresentou como um possível fator de pressão a sobrevida do organismo. Entretanto, condições ambientais tais como descarga pluviométrica, amplitude de maré e aporte fluvial têm influência direta, não só na porção de sais dissolvidos, mas também no pH e temperatura, propiciando um ambiente magnificador ou mitigador ao vibrio. Todas estas circunstâncias direcionam a zona portuária do Rio de Janeiro como vulnerável a sobrevida do *V.c.* toxigênico. Além desse cenário, a presença do *V. cholerae* na sua forma não toxigênica, já havia sido descrito no sítio de estudo.

Magnificando ainda mais a vulnerabilidade da região, os valores dos parâmetros físico-químicos supracitados - quando comparados com os valores limítrofes de tolerância apresentados nos estudos das literaturas analisadas - sugere que o *Vibrio cholerae* se apresente resiliente a uma ampla faixa a esses parâmetros, indicando uma adaptação aos valores de temperatura, pH e salinidade.

Desta forma, o levantamento da ocorrência do vibrio colérico e o monitoramento de pH, temperatura e salinidade no local devem ser ações básicas em qualquer metodologia de prevenção e controle de vibrio colérico em águas portuárias em todo mundo, na busca de uma possível sazonalidade de maior vulnerabilidade, assim como fornecer substrato para futuros estudos de possível evidência de comportamento euribiótico por parte organismo.

A Cólera se apresenta, globalmente, como uma doença preocupante por causa da sua rápida disseminação. Ela se mostrou, no período analisado, como uma enfermidade de alta incidência em todo mundo, especialmente em regiões com populações negligenciadas que apresentam problemas claros de saneamento básico, que deve ser o fator de maior investimento no que diz respeito a ações de prevenção da doença.

Muitas regiões do planeta, em pleno século XXI, ainda experimentam grandes e duradouros problemas em questões de acessibilidade a serviços básicos de saúde, como por exemplo, o saneamento básico. Estas regiões estão localizadas, na sua grande maioria, nos continentes africano e asiático. Este cenário deixa clara a íntima relação entre dois dos indicadores propostos na metodologia: IIC e ISB, e desta forma sugere processos cada vez mais eficazes e ágeis no registro de casos da doença e do quantitativo de saneamento.

Além de todos os fatores socioambientais magnificantes, fatores naturais (terremotos), sociopolíticos (conflitos armados e desigualdades sociais), altas densidades populacionais e falta de acesso a serviços sociais e de saúde são elementos consideráveis no processo de incremento de casos ao redor do mundo e devem ser considerados em análise mais complexa na proposta de melhoramento dos indicadores assim como na formulação de novos indicadores.

Outro problema que merece atenção paira sobre a regionalização proposta pela Organização Mundial de Saúde. No caso específico da Cólera, não reflete a situação real para possíveis direcionamentos de ações de prevenção e monitoramento. Assim como toda doença infectocontagiosa, a cada período (este intervalo é subjetivo) deve ser avaliada a possibilidade de uma nova organização espacial que leve em conta a proximidade dos países em regiões menores que continentais ou subcontinentais propostas pela Organização Mundial da Saúde.

Apesar da Convenção BWM (IMO, 2004) ter caráter normativo e a adesão ser relativamente baixa pelos Estados contratantes da Organização Marítima Internacional, este pequeno número de Países detêm mais de 80% de toda frota mercante em operação.

O Brasil, apesar de ser pioneiro na preocupação com a problemática (como por exemplo, a Resolução ANVISA RDC 72/2009 e a NORMAM 20), apresenta uma enorme

lacuna entre a teoria e a prática e pouca efetividade por parte das autoridades competentes. Exemplo disso se apresenta nas amostragens realizadas com o foco no padrão D1 (salinidade) e não percebemos uma preocupação essencial com rotinas de fiscalização do cumprimento do padrão D-2, fato este podendo ser explicado por ainda estarmos no prazo de adequação da norma, estipulado até 2024 para todas as embarcações em operação.

Percebemos, entretanto, *in loco*, que as embarcações visitadas neste trabalho, que apresentaram tratamento a bordo, enviam regularmente amostras para laboratórios particulares para aferição da conformidade do padrão D-2.

Um importante ponto de reflexão, neste íterim, está nos parâmetros através dos quais a IMO oficializa os equipamentos, metodologia e laboratórios parceiros. São exigidos certificados de qualidade (ISO) assim como validação das metodologias microbiológicas utilizadas no processo de análise. O problema é o quanto esse padrão será rotineiramente mantido quando todas as embarcações estiverem cumprindo o padrão D-2.

Outra questão importante está na criação de normativas que tratem especificamente da navegação de cabotagem quanto ao gerenciamento de água de lastro, uma vez que a legislação vigente não se aplica a esse tipo de operação. Esses navios podem ser importantes veículos de transporte do vibrio colérico, principalmente se ocorrer deslastro em um porto com condições ambientais mais propícias ao sucesso de sobrevivência do organismo, uma vez que: (i) Não temos uma legislação específica para este tipo de operação: a própria NORMAM-20 os exclui de suas prerrogativas, (ii) por ser uma possível fonte de contaminação cruzada entre portos de um mesmo País e (iii) pela grande similaridade ambiental entre diversos portos próximos. Por isto, o acompanhamento destes indicadores nos parece de máxima importância na determinação de locais de risco de existência do organismo, na sua forma toxigênica, em suas águas portuárias.

Por outro lado, nosso estudo revelou que boa parte das embarcações cumprindo rotas nacionais (entre portos do mesmo Estado) são navios de longo curso, provenientes de outros países, em rotas distributivas.

Corroborando com a trivialidade da regionalização da maioria das doenças infectocontagiosas, as áreas dos continentes africano e asiático se mostraram, conforme a metodologia, como os de maior potencialidade de ocorrência do organismo toxigênico em suas águas portuárias. Consequentemente a isso, as embarcações que advirem dessas localidades se apresentam como os maiores alvos de eventuais amostragens. Vale lembrar que

picos de surtos epidêmicos ocorreram na região do Caribe no período monitorado, o que também colocou essa área como alerta vermelho.

O Porto do Rio de Janeiro apresenta intensa movimentação de embarcações, na sua grande maioria de cabotagem. No tocante ao longo curso, contudo, ocorre destaque para embarcações advindas de países da América do Sul (principalmente da Argentina), da Ásia (na maioria da China) e dos Estados Unidos. Durante o estudo, o porto apresentou poucas atracções de origens de alerta vermelho, com atenção primária para embarcações advindas da Nigéria e Índia e secundária para Angola, China, Estados Unidos e Singapura.

É evidente que o Indicador “Risco Origem” deve ser melhor analisado e discutido, por mais campos do conhecimento, com o objetivo de desenvolvê-lo e torná-lo um parâmetro cada vez mais realista, confiável e complexo, que venha a contemplar, gradativamente, outros relevantes indicadores constituintes para atender o propósito a que se destina.

Uma discussão mais aprofundada sobre qual a periodicidade em que deverão ocorrer as amostragens superficiais para análise microbiológica e possível identificação do *V.c* sorogrupo O1 ou O139 deve ser elaborada com base em uma análise quali-quantitativa dos padrões ambientais monitorados nas águas da região associados ao diagnóstico das atracções mercantes ao porto.

Apesar de se presumir uma diminuição do volume de transporte de cargas pelo modal marítimo em 2020 e uma diminuição no processo de aquisição e instalação de sistemas de tratamento devido ao cenário causado pela pandemia de COVID, vislumbra-se, posteriormente ao término do processo epidêmico, uma retomada da normalidade e assim um fluxo crescente de embarcações em operação e conseqüentemente o incremento do volume de cargas. Por isso, este trabalho conclui que as amostragens de lastro devem, sempre que possível, e em consonância com todas as regras e procedimentos legais, obedecer à classificação de risco proposta, que se mostrou bastante vantajosa.

A metodologia microbiológica tem seu foco principal no padrão D-2 que se preocupa com a identificação dos sorogrupos toxigênicos. Assim, em casos emergenciais (navios de risco 1, advindos de locais de surtos e/ou suspeito) sugerimos que as rotinas propostas de isolamento e imediato processo de PCR sejam empregadas com intuito de otimização do tempo de resposta, e em outro momento a realização da caracterização bioquímica. Quando não se suspeita, contudo, de situações de urgência e/ou se tenha um número razoável de isolados, o uso das provas de triagem bioquímica descritas neste trabalho se mostram eficientes para a diminuição de amostras a serem analisadas por PCR. A realização das provas

de triagem, em ambos os casos, apresenta uma importante ferramenta de caracterização dos presuntivos.

Existem vários estudos descritos neste trabalho sobre o *V.c.* não O1 e não O139 que apresentam uma série de genes de susceptibilidade de capacidade de toxigenia por meio do processo de conjugação.

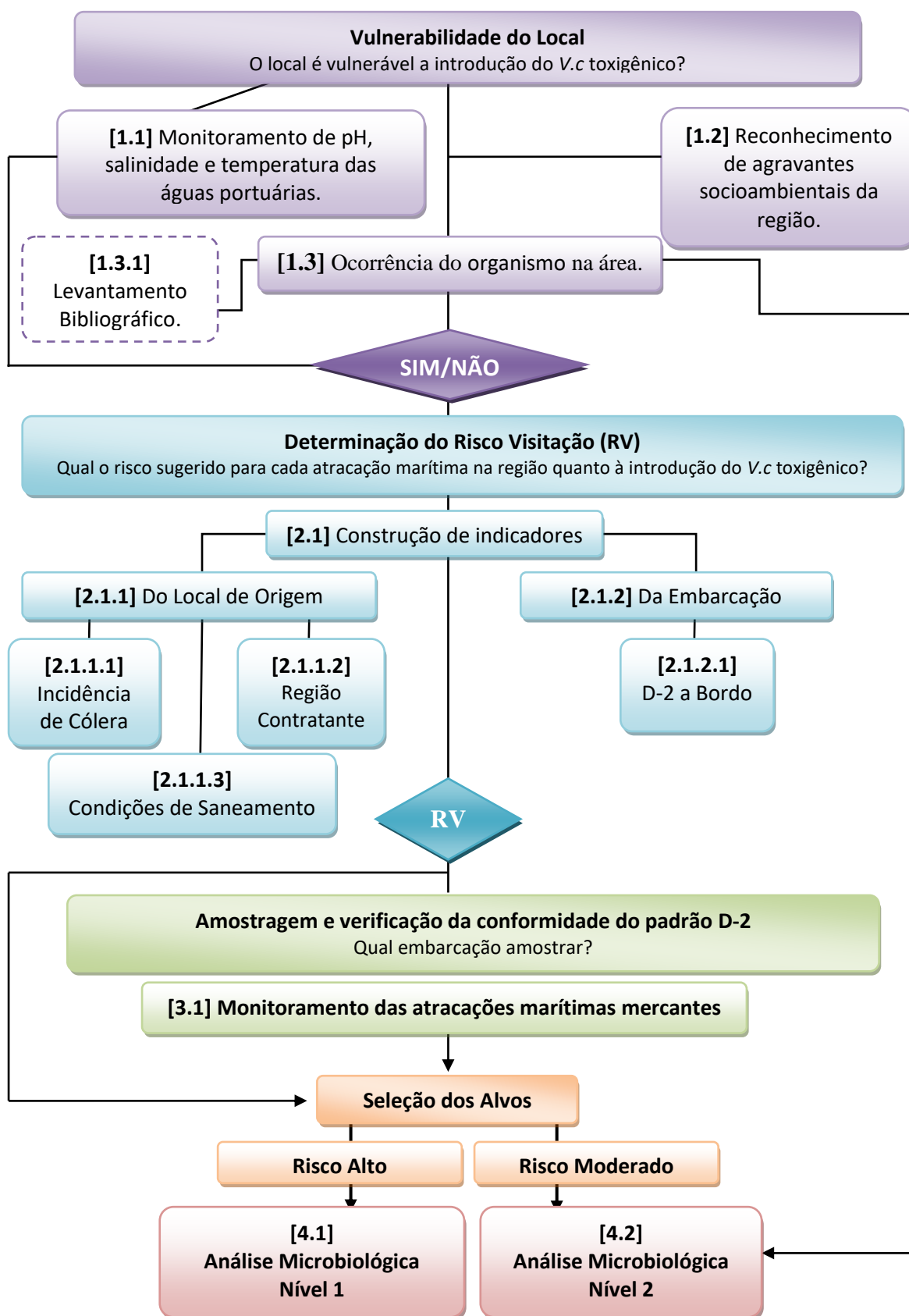
Portanto, sugerimos um novo olhar nas legislações correlatas quanto ao alvo a ser investigado, porque, em um processo de análise de risco à saúde humana, o foco deve continuar sendo nos organismos toxigênicos, mas com atenção especial aos não toxigênicos, que representam um silencioso e possível problema de acometimento de casos da doença em todo o mundo, uma vez que estes podem ser susceptíveis a aquisição de material gênico toxigênico por processo de transferência horizontal.

O resultado das análises microbiológicas evidenciou a presença do organismo na sua forma não toxigênica, em consonância com o levantamento bibliográfico, nas águas da Baía de Guanabara e na amostra de lastro de um navio de cabotagem sem padrão D-2. No navio que apresentou o sistema de tratamento de água de lastro, entretanto, não foi identificado nenhum espécime.

Assim como qualquer desenho metodológico inicial, este foi pensado, experimentado e ajustado à medida que o projeto foi sendo realizado e novas estratégias foram idealizadas para atender aos desafios que foram aparecendo.

No final desta etapa, temos uma visão mais ampla do “novo desenho metodológico” com sugestões de aprimoramento conforme representado na Figura 46.

Figura 46 – Novo desenho metodológico sugerido para o desenvolvimento do estudo



Durante toda a execução das metodologias deste projeto, os processos foram sendo melhorados e adaptados paralelamente a sua execução. Entretanto, alguns pontos só foram observados e analisados em momentos muito avançados e/ou quando do término do projeto, o que nos fez propor melhorias aos processos realizados. Isto só foi possível pelo processo experimental que norteou o projeto desde o início. Existem vários entraves de logística, legais e principalmente financeiros para que o melhor cenário metodológico seja alcançado, entretanto serão descritas algumas sugestões para tornar todo mecanismo mais ágil e eficiente no seu objetivo principal: especificidade de navios para amostragem de lastro e procedimentos microbiológicos mais eficientes e rápidos no que tange à verificação do padrão D-2 quanto ao *Vibrio cholerae* sorogrupos O1 e O139. A seguir descrevemos algumas sugestões referentes aos itens metodológicos propostos na Figura 44.

Quanto ao Monitoramento de pH, salinidade e temperatura das águas portuárias (item 1.1 da Figura 44), as campanhas de amostragem se realizaram em ritmo mensal, dentro de uma limitação de logística e recursos financeiros, uma vez que a fonte consultada do Instituto Estadual do Ambiente (INEA) apresentava séries de dados muito inconsistentes. O que sugerimos para esta etapa é que as campanhas de monitoramento sejam mais constantes e que ocorram pelo menos quinzenalmente, buscando sempre uma variação entre condições climáticas e de maré. Esta adoção iria proporcionar uma visão geral do local quanto a esses parâmetros, uma possível sazonalidade ideal para sobrevivência do organismo e uma reflexão sobre a influência das condicionantes de maré e de índice pluviométrico nos fatores monitorados.

No reconhecimento de agravantes socioambientais da região (item 1.2 da Figura 46), apesar de ser notória a relação entre os fatores socioambientais e agravos à saúde ambiental e humana, um levantamento, principalmente de dados sobre saneamento e a existência de um plano de contingência de Cólera na área de estudo, faz-se uma ação necessária para incentivos de melhorias de prevenção e comparação com regiões acometidas pela doença. Dados relativos à saúde, tanto no que diz respeito ao sistema e acesso a serviços de saúde da população ao entorno, traz a luz uma importante vertente sobre a vulnerabilidade populacional tanto em um processo de acometimento quanto a resiliência dos indivíduos em um possível processo infeccioso pelo vibrião colérico. Sugerimos um aprofundamento da discussão à luz da interdisciplinaridade sobre quais indicadores devem ser utilizados nesta análise.

A ocorrência do organismo na área (item 1.3 da Figura 46), no que se refere ao 1.3.1 “Levantamento bibliográfico”, não temos sugestões, uma vez que a prática utilizada atendeu -

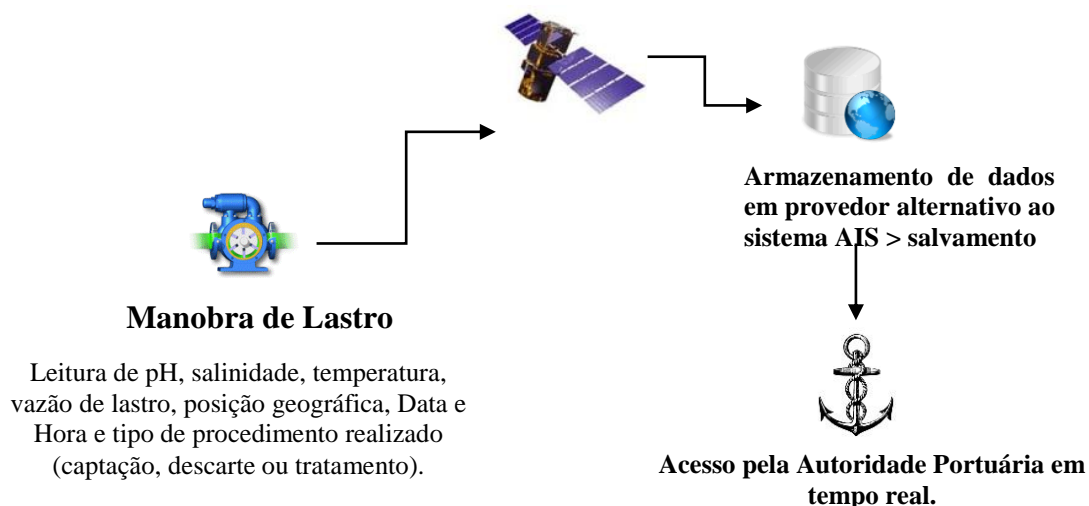
de forma total - o objetivo. Entretanto, a investigação exaustiva de referência é algo de suma importância. No item 1.3.2 “*Análise microbiológica - nível 2*”, iremos apresentar maiores detalhes das sugestões no item pertinente (4.1). Apontamos, contudo, que estas se façam de forma mais rotineira (ao menos uma vez por trimestre – uma a cada estação sazonal), acompanhando os recursos disponíveis em amostragens do item 1.1.

A seção da construção de indicadores (item 2.1 da Figura 46), fica a sugestão de uma reflexão interdisciplinar sobre possíveis graus de importância para cada um deles ou mesmo a definição de outros que possam compor este cenário. As sugestões destes indicadores serão descritos a seguir: (i) No que se refere ao indicador de incidência de Cólera, no item “Do local de Origem” (item 2.1.1.1 da Figura 46) uma das maiores dúvidas que permeou este indicador foi a determinação da linha de corte, ou seja, qual período deve ser analisado para tal indicador: Um ano? Dois anos? Cinco? Dez? Sugerimos como melhoria, neste íterim, a inclusão de um debate epidemiológico na determinação de uma variável temporal fixa ou fluida conforme a necessidade; (ii) No indicador País Contratante da Convenção BWM, também no item “Do local de Origem” (item 2.1.1.2 da Figura 46), este nos levou a uma reflexão profunda que ser contratante não garante que o país realmente adote medidas de gerenciamento de água de lastro. Uma vertente mais eficaz seria o levantamento da existência de ações e legislações neste contexto, mesmo que seja uma tarefa trabalhosa; (iii) No indicador Condições de saneamento, do item “Do local de origem” (item 2.1.1.3 da Figura 44), primeiramente se faz necessária a obtenção de uma fonte de dados que forneça informações mais próximas da realidade das “condições de saneamento” de cada região. Uma mesma reflexão sobre o item 2.1.1.1 sobre a linha de corte deste indicador é outro ponto sugerido como melhoria e do indicador D-2 a bordo, do item “Embarcação” (item 2.1.2.1 da Figura 46), apesar de este trabalho ter utilizado um “n” amostral bem pequeno, notamos pelos resultados das análises microbiológicas realizadas neste trabalho, assim como das realizadas pelas embarcações visitadas, que o risco de eliminação do *V. cholerae* toxigênico é mitigado quando a embarcação possui o padrão D-2.

Quanto ao monitoramento das atracções marítimas mercantes (item 3.1 da Figura 46), muitos obstáculos foram encontrados no desenvolver da metodologia de monitoramento das embarcações (sessão 3.2.5 da Figura 46) e descritos nos resultados (sessão 4.3.2 da Figura 46). Sugerimos a Organização Marítima Internacional, na tentativa de amenizar todas estas dificuldades, o fomento da utilização de um sistema de banco de dados mundial, disponível em tempo real, que seja alimentada diretamente pela embarcação em todas as viagens, assim

como a instalação de sondas multiparamétricas nos tanques de captação de lastro que alimentem, por satélite, em um banco de dados único, todas as manobras dos tanques. A sugestão de solução mais eficaz, a nosso ver, que se caracteriza como muito onerosa, é um modelo inicial, já que, até o presente momento, segundo nosso levantamento, não existem iniciativas neste sentido, descritas no esquema da Figura 47.

Figura 47 - Esquema de interação e controle de manobras de lastro sugerido via *Automatic Identification System*



Fonte: O autor, 2020.

No que refere a análise Microbiológica, tanto no nível 1 (item 4.1 da Figura 46) e 2 (item 4.2 da Figura 46), um dos grandes problemas da metodológica microbiológica adotada pauta-se exatamente no tempo de obtenção do resultado, entre o momento da amostragem até a identificação do vibrio. Nossa metodologia se baseou em métodos convencionais de análise microbiológica e sobre esses aprontamos dois pontos interessantes sugestionados nesta etapa são: (a) Na rotina de PCR, para determinação dos sorogrupos, incluem a análise dos genes responsáveis pela susceptibilidade de aquisição de ferramentas gênicas de toxidade, caracterizando assim os presuntivos como: toxigênicos, potenciais e não toxigênicos; teríamos, assim, uma visão mais realista do perigo e/ou risco de acometimentos da Cólera, e (b) o aproveitamento da alíquota de água coletada para análise dos outros bioindicadores

descritos na convenção BWM (IMO, 2004) no padrão D-2 (*E.coli e Enterococcus* de origem intestinal).

Tecnologias mais rápidas de diagnóstico tais como a eletroquímica, citotoxicidade dinâmica em tempo real e nanopartículas em ensaios colorimétricos já são utilizadas em trabalhos de reconhecimento de moléculas específicas em todo mundo (JIN *et al.*, 2013; ARCHIBALD *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2015), mas se apresentam como metodologias, ainda, muito caras e com exigência de material especializado (FROHNMEYER, *et al.*, 2018). Um promissor recurso, na tentativa de resultados mais rápidos, está no uso de oligonucleotídeos ou peptídeos ligantes a moléculas alvos (aptâmeros) já veem sendo utilizado para aplicações em biotecnologia, pois fornecem propriedades de reconhecimento molecular (FROHNMEYER, *et al.*, 2018). Eles vêm surgindo como elementos alternativos de reconhecimento, de alvos específicos similares a anticorpos, capazes de interações altamente intrínsecas com suas respectivas moléculas alvo (CHEN; YANG, 2015).

Atualmente existem aptâmeros para uma variedade de toxinas bacterianas, tais como a do *Clostridioides difficile*, toxina A e toxina B, antígeno protetor do antraz, neurotoxina botulínica cadeia leve tipo A e enterotoxina estafilocócica B (CHOI *et al.*, 2011; DEGRASSE, 2012; OCHSNER *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2016), inclusive para a toxina colérica (BRUNO; KEIL, 2002).

Toda esta ideia se mostra viável segundo trabalho de Frohmyer *et al.*, (2018) que identificou aptâmeros ligantes a CT com alta afinidade e especificidade, fomentando assim uma alternativa de resultado mais rápido no diagnóstico das amostras de lastro para identificação da presença da toxina colérica na amostra. Claro que, neste ínterim, a identificação do uso do aptâmero está na identificação da toxina colérica, o que nem sempre é consequência para a presença de exemplares do vibrio colérico pertencente ao sorogrupo O1 ou O139.

Um processo essencial que ainda deve ser pensado (e com a sugestão do esquema proposto na Figura 46 seria resolvido) está na aplicação do Risco Origem para o lastro do navio (e não na origem da embarcação como este trabalho se utilizou).

Sugerimos ainda com foco na análise do padrão D-2, uma reflexão sobre quais organismos e padrões dos mesmos devem ser analisados como parâmetros em um futuro aperfeiçoamento da convenção e suas regulamentações.

REFERÊNCIAS

- ACQUARONE, F. **História da navegação**: a conquista do mar. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Irmãos Pongetti. 269p., 1955.
- AKSELMAN, R; JURQUIZA, V; COSTAGLIOLA, MC; FRAGA, SG; PICHEL, M; HOZBOR, C. *Vibrio cholerae* O1 found attached to the dinoflagellate *Noctiluca scintillans* in Argentine shelf waters. **Mar. Biodivers. Rec.** (3). 120, 2010.
- ALBERT, M; ANSARUZZAMAN, M; BARDHAN, P; FARUQUE, A; FARUQUE, S; ISLAM, M. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* 0139 synonym Bengal. **Lancet**, 342, 387–390. (93). 92811-92817, 1993.
- ALI, M; LOPEZ, AA; YOU, YA; KIM, YE; SAH, B; MASKERY, B; CLEMENS, J. The global burden of cholera. **Bull World Health Organ.** (90). 209-218, 2012.
- ALMAGRO-MORENO, S; PRUSS, K; TAYLOR, RK. Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. **PLOS Pathogens.** 1-11, 2015.
- ALTUG, G; GURUN, S; CARDAK, M; CIFTCI, PS; KALKAN, S. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey. **Mar Environ. Res.** (81). 35-42, 2012.
- ANTAQ. Agência Nacional de Transportes Aquaviários. **Estatístico Aquaviário 2018**. Disponível em: <http://web.antaq.gov.br/Anuario/>. Acesso em: 05 mar. 2018, 2018a.
- ANTAQ. Agência Nacional de Transportes Aquaviários. **Estatístico Aquaviário: 3º Trimestre 2017**. Disponível em: <http://portal.antaq.gov.br/wp-content/uploads/2017/03/Boletim-Informativo-3%C2%BA2017-VFinal.pdf>. Acesso em: 28 abril 2018, 2018b.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Portos. **Estudo Exploratório para Identificação e Caracterização de Espécies Patogênicas em Água de Lastro em Portos Selecionados no Brasil**: Relatório Técnico GGPAF, 2002.
- ANVISA. Ministério da Saúde (MS) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC)**. N. 72, 29 de dezembro de 2009. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_72_2009_COMP.pdf. Acesso em: 22 abr. 2020.
- ARAGÓN, M; BARRETO, A; TABBARD, P; CHAMBULE, J; SANTOS, C; NOYA, A. Epidemiologia da cólera em Moçambique no período de 1973-1992. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo. 28(5) 332-336, 1994.
- ARAÚJO, DB; MARTINS, SCS; ALBUQUERQUE, LMB; HOFER, E. Influence of the copepod *Mesocyclops longisetus* (Crustacea: Cyclopidae) on the survival of *Vibrio cholerae* O1 in fresh water. **Cadernos de Saúde Pública**, v.12, n.4, p. 551-554, 1996.

ARAÚJO, IS; MOREIRA AV; AGUIAR R. Doenças negligenciadas, comunicação negligenciada. Apontamentos para uma pauta política e de pesquisa. Ensaio metodológico. **R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde**. v. 6, n. 4. Suplemento, 2013.

ARCHIBALD, MM; RIZAL, B; CONNOLLY, T; BURNS, MJ; NAUGHTON, MJ; CHILES, TC. *A nanocoaxial-based electrochemical sensor for the detection of cholera toxin*. **Biosens. Bioelectron.** (74). 406–410, 2015.

ÁRIAS-LAFARGUE, T. *Alternativa de solución a la contaminación marina por agua de lastre*. 34 (2). 170:177. 2014. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=103624613&lang=es&site=ehost-live>. Acesso em: 10 out. 2018.

AWALIME, DK; DAVIES-TEYE, BBK; VANOTOO, LA; OWOO, NS; NKETIAH-AMPONSAH, E. Economic evaluation of 2014 cholera outbreak in Ghana: a household cost analysis. **Health Economics Review**, 7 (1), 2017.

BACTERIA IN PHOTO. **Photo Gallery of Bacteria. Table of Characteristics. Medically Important Bacteria**. 2019. Disponível em: <http://www.bacteriainphotos.com/>. Acesso em: 27 nov. 2019.

BACTERIO.NET. **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em: 27 nov. 2019.

BAHAMONDE, C; STUARDO V. La epidemia de cólera en América Latina: reemergencia y morbimortalidad. **Rev Panam. Salud Pública**. 33(1). 40-46, 2013.

BAM. Bacteriological Analytical Manual. US Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. United States Government. **BAM Media M8: Alkaline Peptone Agar**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam#intro>. Acesso em: 28 nov. 2019, 2008a.

BAM. Bacteriological Analytical Manual. US Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. United States Government. Bacteriological. Kaysner, CA; Jr, AP. **Vibrio**. Chapter 9. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>, Acesso em: 21 mar. 2018, 2008b.

BARATA, RCB. **Desigualdades Sociais e Saúde**. Tratado de Saúde Coletiva. São Paulo. Parte (3). 457-486, 2006.

BARROS, GLM. *Navegar é fácil*. 11. ed. Editora Catau, 2001. 159p.

BELTRÃO, JF. Memórias da cólera no Pará (1855 e 1991): tragédias se repetem? **História, Ciência e Saúde Manguinhos**. Rio de Janeiro. (14). Suplemento. 145-167, 2007.

BENNISH, ML. Cholerae: Pathophysiology, clinical features and treatment, 1994. *In*: WASCHSMUTH, I.K; BLAKE, P.A; OLSVIK, Ø. **Vibrio cholerae and cholerae: molecular to global perspectives**. Washington DC: American Society for Microbiology. 1994. (15). 229-256, 1994.

BHATTACHARYA, SK; BHATTACHARYA, MK; NAIR, GB; DUTTA, D; DEB, A; RAMAMURTHY, T; GARG, S; SAHA, PK; DUTTA, P; MOITRA, A; MANDAL, BK; SHIMADA, T; TAKEDA, Y; DEB, BC. Clinical profile of acute diarrhoea cases infected with the new epidemic strain of *Vibrio cholerae* O139: designation of the disease as cholera. **Journal of Infection**. (27). 11-15, 1993.

BIK, EM; BUNSCHOTEN AE; GOUW, RD; MOOI, FR. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharides synthesis. **EM. Bol. Journal**. (14). 209-216, 1995.

BOYD, EF; HEILPERN, AJ; WALDOR, MK. Molecular analyses of a putative CTX₂ precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX₂s by toxigenic *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol**. (182). 5530-5538, 2000.

BRAGA, ES; CHIOZZINI, VG; VIEIRA, CM. Seasonal variation of nutrients and hydrological conditions in the State Marine Park of Laje de Santos (SMPLS) and adjacent continental shelf areas (South Atlantic Ocean - Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo. 65(4). 628-643, 2017.

BRAGA, JU; WERNECK, GL. Vigilância Epidemiológica. *In*: BLOCH, KV; LUIZ, RR; WERNECK, GL. **Epidemiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 103-123.

BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Básica. **A importância do mar na história do Brasil**. 217p., 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Brasil. Fundação Nacional de Saúde. **Informe Sobre as Espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil**. Brasília (DF), 2009a. 439p.

BRASIL. **Água de lastro e seus riscos ambientais**. Disponível em: <http://aguadelastrobrasil.org.br>. Acesso em: 16 mar. 2018. 2009b.

BRASIL. Marinha do Brasil. Diretoria de Portos e Costas. **Norma de Autoridade Marítima para o Gerenciamento de Água de Lastro de Navios (NORMAM/20)**. Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/dpc/sites/www.marinha.mil.br/dpc/files/normam20.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2019. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente: Fundação Nacional de Saúde. **Manual integrado de prevenção da cólera**. Brasília (DF), 2010. 172 p.

BRATLET, DH; AZAM, F. **Chitin cholerae and competence**. *Sci. New York*. (310). 1775-1777, 2005.

BRISKI, E; ALLINGER, LE; BALCER, M; CANGELOSI, A; FANBERG, L; MARKEE, TP; MAYS, N; POLKINGHORNE, CN; PRIHODA, KR; REAVIE, ED; REGAN, DH; REID, DM; SAILLARD, HJ; SCHWERDT, T; SCHAEFER, H; TENEYCK, M; WILEY, CJ;

BAILEY, SA. Multidimensional approach to invasive species prevention. **Environ Sci Technol.** 47. (3). 1216-1221, 2013.

BRISKI, E; GOLLASCH, S; DAVID, M; DALLAS, P; LINLEY R; CASAS-MONROY, O; RAJAKARUNA, H; BAILEY, SA. Combining Ballast Water Exchange and Treatment To Maximize Prevention of Species Introductions to Freshwater Ecosystems. **Environ. Sci. Technol.** 49. (16). 9566-9573, 2015.

BROWN, RC; TAYLOR, RK. Organization of tcp, acf and toxT genes within a ToxT-dependent operon. **Mol. Microbiology.** (16) 425-439. 1995 *In: Microbial Ecology and Infectious.* Editora Eugene Rosenberg. American Society for Microbiology. Washington DC, 1999.

BROZA, M; HALPERN, M. Pathogen reservoirs: Chironomid egg masses and *Vibrio cholerae*. **Nature**, 412-440, 2001.

BURKS, DJ; NORRIS, S; KAUFFMAN, KM; JOY, A; AREVALO, P; AZAD, RK; WILDSCHUTTE, H. Environmental vibrios represent a source of antagonistic compounds that inhibit pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains. **Microbiology Open.** 6 (5). 1-11, 2017.

BURRUS, V; QUEZADA-CALVILLO, R; MARRERO, J; WALDOR, MK. SXT-Related Integrating Conjugative Element in New World *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 72, n. 4, p. 3054-3057, 2006.

BWIRE, G; MUNIER, A; OUEDRAOGO, I; HEYERDAHL, L; KOMAKECH, H; KAGIRITA, A; MENGEL, MA. Epidemiology of cholera outbreaks and socio-economic characteristics of the communities in the fishing villages of Uganda: 2011-2015. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 11(3). 2011-2015, 2017.

CALLABA, CAF; MARQUETTI, MC. Descripción de las experiencias de las brigadas de control de vectores durante la epidemia de cólera em Haití. **Revista Cubana de Medicina Tropical,** 65 (1). 99-106, 2013.

CAMACHO, WN. Legal aspects of the pollution caused by water ballast. **Journal of Environmental Law.** v. 46, p.191–222, 2007.

CANDEIAS, JAN. O cólera ou a cólera. **Revista de Saúde Pública.** 25(4), 1991.

CARNEY, KJ; MINTON, MS; HOLZER, KK; MILLER, AW; MCCANN, LD; RUIZ, GM. Evaluating the combined effects of ballast water management and trade dynamics on transfers of marine organisms by ships. **PLoS One.**12(3). 1-20, 2017.

CASTRO, MCT; HALL-SPENCER, JM; POGGIAN, CF; FILEMAN, TW. Ten years of Brazilian ballast water management. **Journal of Sea Research,** DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2017.02.003>, 2017.

CASTRO, MCT; ROSSO, TCA; FERNANDES, FC. Characterization of Rio de Janeiro port in terms of ballast water. **Nav. Eng. J.** (122). 61–72, 2010.

CASTRO, S; ALMEIDA, J. Dragagem e conflitos ambientais em portos clássicos e modernos: uma revisão. **Sociedade & Natureza**, 24(3). 519-533, 2012.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Cholerae: *Vibrio* infection. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. **Examination of food and environmental samples**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/cholera/pdf/laboratory-methods-for-the-diagnosis-of-vibrio-cholerae-chapter-5.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2018, 2018a.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. Cholerae: *Vibrio* infection. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*. **Laboratory of identification *Vibrio cholerae***. Disponível em: <https://www.cdc.gov/cholera/pdf/laboratory-methods-for-the-diagnosis-of-vibrio-cholerae-chapter-6.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2018, 2018b.

CHANG, TW; JANARDHANAN, P; MELLO, CM; SINGH, BR; CAI, S. Selection of RNA aptamers against botulinum neurotoxin type A light chain through a non-radioactive approach. **Appl. Biochem. Biotechnol.** (180). 10–25, 2016.

CHATTERJEE, T; MUKHERJEE, D; DEY, S; PAL, A; HOQUE, KM; CHAKRABARTI, P. Accessory Cholera Enterotoxin, Ace, from *Vibrio cholerae*: Structure, Unfolding, and Virstatin Binding. **Biochemistry**. (50). 2962-2972, 2011.

CHAUDHURI K; CHATTERJEE, SN. Cholerae Toxin (CT): Structure. *In: Cholerae Toxins*. Editora Springer. Germany. 105-122, 311p, 2009.

CHÁVEZ, MRC; SEDAS, VP; BORUNDA, EO; REYNOSO, FL. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. **Marine Pollution Bulletin**. v. 50, n. 12, p. 1641-1648, 2005.

CHEN, A; YANG, S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. **Biosens. Bioelectron.** (71). 230–242, 1015.

CHEN, WH; COHEN, MB; KIRKPATRICK, ABD; BRADY, RC; GALLOWAY, D; GURWITH, M; HALL, RH; KESSLER, RA; LOCK, M; HANEY, D; LYON, CE; PASETTI, MF; SIMON, JK; SZABO, BF; TENNANT, S; LEVINE, MM. Single-dose Live Oral Cholera Vaccine CVD 103-HgR Protects Against Human Experimental Infection With *Vibrio cholerae* O1 El Tor. **Clinical Infectious Diseases**. (62). 1329-1335, 2016.

CHIANG, SL; MEKALONOS, JL. Horizontal gene transfer in the emergence of virulent *Vibrio cholerae*. 156-168. *In: Microbial Ecology and Infectious*. Washington, DC: Editora Eugene Rosenberg, American Society for Microbiology., 1999.

CHOI, JS; KIM, SG; LAHOUSSE, M; PARK, HY; PARK, HC; JEONG, B; KIM, J; KIM, SK; YOON, MY. Screening and characterization of high-affinity ssDNA aptamers against anthrax protective antigen. **J. Biomol. Screen.** (16). 266–271, 2011.

CHOWDHURY, FR; NUR, Z; HASSAN, N; SEIDLEIN, L; DUNACHIE, S. Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 16(1). 1-6, 2017.

CLARKSON RESEARCH SERVICES. **Shipping Review and Outlook**. Spring, 2014.

CLEMENS, JD; NAIR, GB; AHMED, T; QADRI, T; HOLMGREN, J. **Cholerae**. **The Lancet**. v. 390, n. 23, 2017.

CLEMENTS, ML; LEVINE, MM; YOUNG, CR; BLACK, RE; LIM, YI; ROBINS-BROWNIE, RM; CRAIG, JP. Magnitude, kinetics, and duration of vibriocidal antibody response in North Americans after ingestion of *Vibrio cholerae*. **Journal of Infectious Diseases**, 145. 465-472, 1982.

COLWELL, RR. Viable but non culturable bacteria: a survival strategy. **Journal Infect. Chemother**. 6. 121-125, 2000.

COLWELL, RR; BRAYTON, P; HERRINGTON, D; TALL, B; HUQ, A. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. **World Journal of Microbiol. Biotechnol**. 12. 28-31, 1996.

COLWELL, RR; HUQ, AE. Vibrios in the environment: Viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. Chapter 9. 117-133. *In*: WASCHSMUTH, IK; BLAKE, PA; OLSVIK, φ. **Vibrio cholerae and cholerae: molecular to global perspectives**. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994. 453p.

COLWELL, RR; KAPER, J; JOSEPH, S. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. **Science**. 198. 394-396, 1977.

COLWELL, W. **Água de lastro, bioinvasão e resposta internacional**. Porto Gente. Disponível em: <https://portogente.com.br/portopedia/80510-agua-de-lastro-bioinvasao-e-resposta-internacional>. Acesso em: 23 fev. 2018, 2018.

COMSTOCK LE; MANEVAL, D. Jr; PANIGRAHI, P. The capsule and O antigen in *Vibrio cholerae* O139 Bengal are associated with a genetic region present *Vibrio cholerae* O1. **Infect Immun**. 63. 317-323, 1995.

COPPER, DB. The new "black death": cholera in Brazil, 1855-1856. **Journal Society Scientific History**, 10(4). 467-488, 1986.

COSTERTON, JW; LEWANDOWSKI, Z; CALDWELL, DE; KORBER, DR; LAPPIN-SCOTT, HM. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol**. 49. 711-745, 1995.

COWMAN, G; OTIPO, S; NJERU, I; ACHIA, T; THIRUMURTHY, H; BARTRAM, J; KIOKO, J. Factors associated with cholera in Kenya, 2008-2013. **Pan. African. Medical Journal**. 28. 2008-2013, 2017.

CUNHA, IA. Fronteiras da gestão: os conflitos ambientais das atividades portuárias. **Revista de Administração Pública**, 40(6). 1019-1040, 2006.

DAS, B; VERMA, I; KUMAR, P; GHOSH, A; RAMAMURTHY, T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. **Vaccine. Article in press**, 2019.

DEGRASSE, JA. A single-stranded DNA aptamer that selectively binds to staphylococcus aureus enterotoxin B. **PLoS One**. (7). e33410, 2012.

DENGO-BALOI, LC; SEMÁ-BALTAZAR, CA; MANHIQUE, LV; CHITIO, JE; INGUANE, DL; LANGA, JP. Antibiotics resistance in El Tor *Vibrio cholerae* O1 isolated during cholera outbreaks in Mozambique from 2012 to 2015. **PLoS ONE**. 12(8), 2017.

DOMINGOS, I; GAMEIRO, C; FERREIRA, A; ADÃO, H; AMORIM, A; BROTA, V; CABRAL, H; CHAINHO, P; COSTA1, JL; GORDO. LS; NEWTON, A; SOUSA, F; TEIXEIRA, H; VIEIRA, AR; ZILHÃO, R; BRITO, AC. **Ecosystemas da Plataforma Continental**. Iceland Liechtenstein Norway, 133p., 2017.

DONADEU, M; LIGHTOWLERS, MW; FAHRION, AS; KESSELS, J; ABELA-RIDDER, B. Weekly epidemiological record: relevé épidémiologique hebdomadaire. **The Weekly Epidemiological Record**. III(47). 445-452, 2009.

DRAKE, LA; DOBLIN, MA; DOBBS, FC. Potential microbial bioinvasions via ships; ballast water, sediment, and biofilm. **Mar. Pollut. Bull.** 55. 333-341, 2007.

DRILLET, G; SCHMOKER, C; TROTTET, A; MAHJOUB MS; DUCHEMIN M; ANDERSEN M. Effects of temperature on type approval testing of ballast water treatment systems. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 9(2). 192-195. 2013.

DUARTE, CP. **Bandeiras de Conveniências: uma abordagem realista**. Orientador: Marcelo José das Neves. 2013.32f. Monografia (Bacharel em Ciências Nauticas). Centro de Instrução Almirante Graça Aranha. Curso de Formação de Oficiais da Marinha Mercante. Marinha do Brasil. 2013.

EILER, A; GONZALEZ-REY, C; ALLEN, S; BERTILSSON, S. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. To cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. **FEMS Microbiological**. (60). 411-418, 2007.

ESTEVES, K; MOSSER, T; AUJOULAT, F; HERVIO-HEATH, D; MONFORT, P; JUMAS-BILAK, E. Highly diverse recombining populations of *vibrio cholerae* and *vibrio parahaemolyticus* in french mediterranean coastal lagoons. **Frontiers in Microbiology**. (6). 1-17, 2015.

EUROPEAN BANK. For Reconstruction and Development. Royal Haskoning DHV: Enhancing Society Together. **Ballast Water Management Infrastructure Investment Guidance**, 2014. 36p.

FARUQUE SM; ALBERT MJ; MEKALANOS JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62. 1301-1314, 1998.

FARUQUE, SM; AHMED, KM; SIDDIQUE, AK; ZAMAN K; ABDUL ALIM, ARM; ALBERT, J. Molecular Analysis of Toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal Strains Isolated in Bangladesh between 1993 and 1996. Evidence for Emergence of a New Clone of the Bengal Vibrios. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 9, p. 2299-2306, 1997.

FASSANO, A; BAUDRY, B; PUMPLIN, D.W; WASSERMAN, S.S; TALL, B.D; KETLEY, J.M; KAPER, J.B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. **Proc. Natl. Academy. Sci.** (88): 5242-5246, 1991.

FERDOUS, J; SULTANA, R; RASHID, RB; TASNIMUZZAMAN, M; NORDLAND, A; BEGUM, A; JENSEN, PKM. A comparative analysis of *Vibrio cholerae* contamination in point-of-drinking and source water in a low-income urban community, Bangladesh. **Frontiers in Microbiology**, n. 9, 2018.

FERNANDEZ, MA; PINHEIRO, FM. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **Int. Journal Environment and Health**. v. 1, n. 3, 2007.

FERNÁNDEZ, S; ALONSO, G. Cólera y *Vibrio cholerae*. **Revista del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”**. 40 (2), 2009.

FERNÁNDEZ-ABREU A; FARINÃS, B; RIVERO-NAVEA G; CABRERA-CANTELAR N; NUÑEZ-FERNÁNDEZ, F; CRUZ-INFANTE, Y; ÁGUILA-SÁNCHEZ, A; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, JL. Determinants of Virulence and Antimicrobial Susceptibility in Non-O1, Non-O139 *Vibrio cholerae* Isolates. **MEDICC Review**. v. 19, n. 4, p. 2121-2125, 2017.

FERNÁNDEZ-ALBA, AR. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. **Analytica Chimica Acta**. Num.456. 303-312. 2002.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M; GARCIA AMADO, MA; CONTRERAS, M; INSCANIO, RN; CHIRINOS, H; ROJAS, H; SUAREZ, P. Survival, induction and resuscitation of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state in the southern Caribbean sea. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. 57(1). 21-26, 2015.

FERNANDEZ-FLÓREZ, CE; CÁCERES-MANRIQUE, FM. *Cólera, se aproxima uma nueva pandemia*. **Méd.UIS**. 27(2). 67-83, 2014.

FIGUEREDO, SCA; NEVES-BORGES, AC; COELHO, A. The Neuraminidase gene is present in the non-toxigenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 100, n. 6, p. 563-569, 2005.

FILIZOLA LRS, FIGUEIRÔA ACTA, ARAÚJO MCMD, CAVALCANTI VO, LIMA CM, HOFER E. Significância de anticorpos vibriocidas circulantes em área pós-epidêmica de diarreia, São Bento do Uma, Estado de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** (40). 686-689, 2007.

FINKELSTEIN, RA; LOSPALLUTO, JJ. Production, purification and assay of cholera toxin. **J. Infect. Dis.** 121. Suplemento, 63p., 1970.

FONSECA, ACCLC. **O Transporte marítimo de mercadorias**. Orientador: António José Fidalgo do Couto. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil – Especialização em Vias de Comunicação) – Faculdade de Engenharia. Faculdade do Porto. Porto, Portugal, 2008.

FONSECA, EL; FREITAS, FS; VIEIRA, VV; VICENTE, ACP. Repeats in *Vibrio cholerae* O1. **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, n. 7, 2008.

FONSECA, MM. **Arte Naval**. 6.ed. Rio de Janeiro: Marinha do Brasil: Serviço de Documentação Marítima, 2002. v.1.

FROHNMEYER, E; FRISCHA, F; FALKEC, S; BETZELC, C; FISCHER, M. Highly affine and selective aptamers against cholera toxin as capture elements in magnetic bead-based sandwich ELISA. **Journal of Biotechnology**. (269). 35-42, 2018.

FU, X; ZHANG, J; LI, T; ZHANG, M; LI, J; KAN, B. The Outer Membrane Protein OmpW Enhanced *V. cholerae* Growth in Hypersaline Conditions by Transporting Carnitine. **Frontiers in Microbiology**, v. 8. Art. 2703, 2018.

GANGAROSA, EJ; MOSLEY, WH. Epidemiology and surveillance of cholera. 381:403p. 1974. In: BARUA, D; BURROWS, W. (Editores). **Cholera**. WB Saunders Co. Philadelphia. EUA, 1974.

GATIDOU, G; THOMAIDIS, NS; ZHOU, JL. Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. **Environment International**. n. 33, p. 70-77, 2007.

GEROLOMO, M; PENNA, MLF. Cólera e condições de vida da população. **Revista de Saúde Pública**. 34(4). 342-347. 2000.

GEROLOMO, M; PENNA, MLF. Os Primeiros cinco anos da sétima pandemia de cólera no Brasil. **IESUS**. 8(3). 49-58, 1999.

GHOSH A; RAMAMURTHY, T. Antimicrobials & cholera: are we stranded ? **Indian Journal Medical Resident**, 133(2). 225-231, 2011.

GLASS, RI; BLACK, RE. The epidemiology of cholera, 129:154p. 1992. In: BARUA, D; GREENOUGH III, BW.(Editores). **Cholera**. Plenum. Medical Book Co. New York, EUA, 1992.

GLOBALLAST. Global Ballast Water: Management Programme. **Biota da área sob influência do Porto de Sepetiba**. Rio de Janeiro, Brasil. Levantamentos pretéritos, 2004.

GONÇALVES, VMF. Educação Ambiental como Medida Mitigadora da Bioinvasão Por Água de Lastro de Navios. **Destarte**. v. 4, n. 1, 2014.

GONZÁLEZ LM, CASANOVA M DE LA C, PÉREZ J. Cólera: historia y actualidad. **Rev. Ciencias Médicas**. 15(4). 280-294, 2011.

GRISSOTI, M. Doenças Infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. **Ciência e Saúde Coletiva**. 15. Suplem.1. 1104-1104, 2004.

GROB, C; POLLET, BG. Regrowth in ship's ballast water tanks: Think again! **Marine Pollution Bulletin**. 109(1). 46-48, 2016.

GUZMÁN, TV; MONTES, PB. Historia del cólera en el mundo y México. Universidad Autónoma del Estado de México Toluca. **Ciencia Ergo Sum.** v. 7, n. 2, 2000.

HALL-STOODLEY, L; COSTERTON, JW; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat. Rev. Microbiol.** n.2, p. 95-108, 2004.

HALPERN, M; IZHAKI, I. Fish as hosts of *Vibrio cholerae*. **Frontiers in Microbiology.** (8). 1:7, 2017.

HARRIS, JB; LAROCQUE, RC; QADRI, F; RYAN, ET; CALDERWOOD, SB. *Cholerae*. The Lanet.com. v. 379, 2012. Disponível em: www.telanet.com. Acesso em: 01 maio 2018.

HARVEZ, CB; ÁVILA, VS. La epidemia de cólera en América Latina: reemergencia y morbimortalidad. **Rev. Panam. Salud Publica.** 33(1). 40-46, 2013.

HEDE, N; KHANDERPARKER, L. Influence of Darkness and Aging on Marine and Freshwater Biofilm Microbial Communities Using Microcosm Experiments. **Microbiology Ecology.** 76(2). 314-327. 2018.

HEIDELBERG, JF; EISEN, JA; NELSON, WC; CLAYTON, RA; GWINN, ML; DODSON, RJ; HAFT, DH; HICKEY, EK; PETERSON, JD; UMayAM, L; GIL, SR; NELSON, KE; READ, TD; TETTELIN, H; RICHARDSON, D; ERMOLAEVA, MD; VAMATHEVAN, J; BASS, S; QIN, H; DRAGOI, L; SELLERS, P; MCDONALD, L; UTTERBACK, T; FLEISHMANN, RD; NIERMAN, WC; WHITE, O; SALZBERG, SL; SMITH, HO; COLWELL, RR; MEKALANOS, JJ; VENTER, JC; FRASER, CM. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature** . v. 406, 2000.

HENDRIKSEN, RS; PRICE, LB; SCHUPP, JM; GILLECE, JD; KAAS, RS; ENGELTHALER, DM; BORTOLAIA, V; PEARSON, T; WATERS, AE; UPADHYAY, BP; SHRESTHA, SD; ADHIKARI, S; SHAKYA, G; KEIM, PS; AARESTRUP, FM. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. **MBio.** 2(4). 1-6, 2011.

HERRINGTON, DA; HALL, RH; LOSONSKY, G; JOHN, J; MEKALANOS, I; RONALD, K; TAYLOR, §; LEVINE, MM. Toxin, Toxin-Corregulated Pili and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in Humans. **Journal Exp. Med.** v. 168, p. 1487-1492, 1988.

HOSHINO, K; YAMASAKI, S; MUKHOPADHYAY, AK; CHAKRABORTY, S; BASU, A; BHATTACHARYA, SK; NAIR, GB; SHIMADA, T; TAKEDA, Y. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.** (20). 201-207, 1998.

HOSSAIN, ZZ; FARHANA, I; TULSIANI, SM; BEGUM, A. Transmission and Toxigenic Potential of *Vibrio cholerae* in Hilsha Fish (*Tenulosa ilisha*) for Human Consumption in Bangladesh. **Frontier Microbiology.** (9). 1-13, 2018.

HUQ, A; HALEY, BJ; TAVIANI, E; CHEN, A; HASAN; COLWELL, RR. Detection, isolation and identification of *Vibrio cholerae* from the environment. **Curr. Protoc. Microbiol.** Chapter 6. Unit 6a(5). National Institutes of Health, 58p., 2012.

HUQ, A; SACK, RB; NIZAM, A; LONGINI, IM; NAIR, GB; ALI, A. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. **Appl. Environ. Microbiol.** (71). 4645-4654, 2005.

HUQ, A; WEST, PA; SMALL, EB; HUQ, ML; COLWELL, RR. Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar 01 associated with live copepods in laboratory microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.** 48(2). 420-424, 1984.

HUQ, A; XU, B; CHOWDHURY, MAR; ISLAM, MS; MONTILLA, R; COLWELL, RR. A simple filtration method to remove plankton associated *Vibrio cholerae* in raw water supplies in developing countries. **Application Environment Microbiology.** 62(7). 2508-2512, 1996.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE Cidades@: Rio de Janeiro.**

Disponível em:

<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=330455&search=rio-de-janeiro|rio-de-janeiro>. Acesso em:06 jun. 2016, 2016.

ICS&ISF. **Overview of the international shipping industry.** International Chamber of Shipping and International Shipping Federation. Disponível em:

<http://www.marisec.org/shippingfacts/keyfacts>. In: Dis. Annual Conference. Richards Bay. (11), 2010. Acesso em:09 set. 2015, 2015.

IMO. International Maritime Organization. **Guidelines for Port State Control under the BWM Convention (2014).** Disponível em:

[http://www.imo.org/en/KnowledgeCentre/IndexofIMOResolutions/Marine-Environment-Protection-Committee-\(MEPC\)/Documents/MEPC.252\(67\).pdf](http://www.imo.org/en/KnowledgeCentre/IndexofIMOResolutions/Marine-Environment-Protection-Committee-(MEPC)/Documents/MEPC.252(67).pdf). Acesso em:16 fev. 2018, 2018.

IMO. International Maritime Organization. **IMO Frequently Asked Questions Implementing the Ballast Water Management Convention.** Disponível em:

<http://www.imo.org/en/MediaCentre/HotTopics/Documents/FAQ%20-%20Implementing%20the%20Ballast%20Water%20Management%20Convention.pdf>. Acesso em:28 de abril de 2020, 2020.

IMO. International Maritime Organization. **International Convention for the Control and Management Ship's Ballast Water and Sediments (2004).** Text adopted for conference.

http://www.bsh.de/de/Meeresdaten/Umweltschutz/Ballastwasser/Konvention_en.pdf. Acesso em: 16 fev. 2018, 2018.

IMO. International Maritime Organization. **International shipping facts and figures: Information Resources on Trade, Safety, Security, Environment.** Maritime Knowledge Center. (47), 2012.

IMO. International Maritime Organization. International shipping and world trade: Facts and figures. Disponível em: <http://www.imo.org/>. Acesso em: 06 jun. 2016.

IMO. International Maritime Organization. Resolution MEPC 297/20. Annex 2. **Amendments to the International Convention the control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments 2004**. 2018.

IREDELL, JR; MANNING, PA. The toxin-coregulated pilus (TCP) of *Vibrio cholerae* O1: a model for type IV pilus biogenesis? **Trends Microbiol.** (2). 187-192. 1994a.

IREDELL, JR; MANNING, PA. Biotype-specific tcpA genes in *Vibrio cholerae*. **FEMS Microbiol. Lett.** (121). 47-54. 1994b.

ITWF. International Transport Workers Federation. **Convenience's Flags**. Disponível em: [https:// www.itfglobal.org/itfamericas/flagsconvenience.cfm/languageID/8](https://www.itfglobal.org/itfamericas/flagsconvenience.cfm/languageID/8). Acesso em: 20 Maio 2020, 2020.

JIN, D; LUO, Y; ZHENG, M; LI, H; ZHANG, J; STAMPFL, M; XU, X; DING, G; ZHANG, Y; TANG, Y. Quantitative detection of vibrio cholera toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring. **J. Clin. Microbiol.** (51). 3968–3974, 2013.

KALUZA, P; KOLZSCHA, A; GASTNER, MT; BLAUSIUS, B. The complex network of global cargo ship movements. **J. R. Soc. Interface**. Published OnLine. 1-11, 2010.

KAPER, JB; MORRIS JR, JG; LEVINE, MM. Cholera. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 48-86, 1995.

KARAOLIS, DKR; KAPER, J. Pathogenicity Islands and other mobile virulence elements of *Vibrio cholerae*. Chapter 9. 167-187p. 1999. In: KARAOLIS, KR; KAPER, J. **Pathogenicity Islands and other mobile virulence elements of *Vibrio cholerae***. KAPER, JB; HACKER, J. (editores). American Society for Microbiology. Washington DC, 1999.

KAYSNER, C; HILL, WE. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in food and water. Chapter 10. 135-141p. 1994. In: WASCHSMUTH, IK; BLAKE, PA; OLSVIK, Ø. ***Vibrio cholerae* and cholerae: molecular to global perspectives**. Washington DC. American Society for Microbiology, 1994. 453p.

KEDDY, KH; NADAN, S; GOVIND, C; STURM W. Evidence for a clonally different origin of the two cholera epidemics of 2001-2002 and 1980-1987 in South Africa. **Journal of Medical Microbiology**. (56). 1644-1650, 2007.

KENYON JE; GILLIES DC; PIEXOTO DR; AUSTIN B. *Vibrio cholerae* (non-O1) isolated from California coastal waters. **Appl. Environ. Microbiol.** 46(5).1232-1233, 1983.

KHAN, SA; DEGRASSE, JA; YAKES, BJ; CROLEY, TR. Rapid and sensitive detection of cholera toxin using gold nanoparticle-based simple colorimetric and dynamic light scattering assay. **Anal. Chim. Acta** (892). 167–174, 2015.

KIM, Y; AW T; TEAL G; ROSE JB. Metagenomic Investigation of Viral Communities in Ballast Water. **Environmental Science and Technology**. 49(14). 8396-8407, 2015.

KLINZING, DC; CHIO, SY; HASAN, NA; MATIAS, RR; TAYAG, E; GERONIMO, J; SKOWRONSKI, E; RASHED, SM; KAWASHIMA, K; ROSEMZWIG, CN; GIBBONS,

H.S; TORRES, BC; LILES, V; ALFON, CA; JUAN, ML; NATIVIDAD, FF; CEBULA, TA; COLWELL, RR. Hybrid *Vibrio cholerae* El Tor lacking SXT Identified as the cause of a Cholerae outbreak in the Philippines. **MBio. Microbiology**. v. 6, (2). 1:7, 2015.

KODAMA, K; PIMENTA, TS; BASTOS, FI; BELLIDO, JG. Mortalidade escrava durante a epidemia de cólera no Rio de Janeiro (1855-1856): uma análise preliminar. **História, Ciências e Saúde Manguinhos**. v. 19. Suplemento, p. 59-79, 2012.

KOKASHVILI, T; WHITEHOUSE, CA; TSKHVEDIANI, A; GRIM, CJ; ELBAKIDZE, T; MITAISHVILI, N; TEDIASHVILI, M. Occurrence and Diversity of Clinically Important *Vibrio* Species in the Aquatic Environment of Georgia. **Frontiers in Public Health**. (3). 1-12, 2015.

KOO, D; TRAVERSO, H; LIBEL, M; DRASBEK, CHRISTOPHER J; TAUXE, R; BRANDLING-BENNETT, D.A. TRAVERSO H. Epidemic cholera in Latin America, 1991-1993: implications of case definitions used for public health surveillance. **Bulletin of the Pan American Health Organization**. 30(2). 134-143, 1996.

KUMAR, V; TURNBULL, P. Carbohydrate inhibitors of cholera toxin. **Journal of Organic Chemistry**. (14). 484-498, 2018.

KUNKEL, A; LEWNARD, JA; PITZER, VE; COHEN, T. Antimicrobial resistance risks of cholera prophylaxis for United Nations peacekeepers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61(8), 2017.

LABTRANS. Secretaria de Portos da Presidência da Republica. Universidade Federal de Santa Catarina. Laboratório de Transportes e Logística. Cooperação Técnica para Apoio à SEP/PR no Planejamento do Setor Portuário Brasileiro e na Implantação dos Projetos de Inteligência Logística Portuária. **Plano Mestre: O Porto do Rio de Janeiro**. Florianópolis (SC). 385p., 2014.

LEAROYD, TP; GAUT, RM. Cholera under diagnosis and differentiation from other diarrhoeal diseases. **Journal of Travel Medicine**. v. 25, Supl.(1). 46-51, 2018.

LESSLER, J; MOORE, SM; LUQUERO, FJ; MCKAY, HS; GRAIS, R; HENKENS, M; AZMAN, AS. Mapping the burden of cholera in sub-Saharan Africa and implications for control: an analysis of data across geographical scales. **The Lancet**. 6736(17). 1-8, 2018.

LEVADE, I; TERRAT, Y; LEDUCQ, JB; WEIL, AA; MAYO-SMITH, LM; CHOWDHURY, F; SHAPIRO, BJ. *Vibrio cholerae* genomic diversity within and between patients. **Microbial Genomics**. 1-15, 2017.

LEVINE, MM. South America: The return of Cholera. **The Lancet**. v. 388, Art.(8758). 45-46, 1991.

LEVINE, MM; BLACK, RE; CLEMENTS, ML; CISNEROS, L; SAAH, A; NALIN, DR; GILL, DM. CRAIG, JP; YOUNG, CR; RISTAINO, P. The Pathogenicity of Nonenterotoxigenic *Vibrio cholerae* Serogroup O1 Biotype El Tor Isolated from Sewage Water in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**. v. 145, n. 3, 1982.

LEVINE, MM; KAPER, JB; BLACK, RE; CLEMENTS, ML. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiology Rev.** (47). 510-550, 1983.

LEVINE, MM; KAPER, JB; HERRINGTON, D; LOSONSKY, G; MORRIS, JG; CLEMENTS, ML; BLACK, RE; TALL, B; HALL, R. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. **Infect. Immun.** (56) 161-167, 1988.

LEWINSOHN, R. **Três epidemias: lições do passado**. 1. ed. São Paulo: Editora Unicamp. 2003. 584 p.

LI, J; LIM, MS; LI, S; BROCK, M; PIQUE, ME; WOODS JR, VL; CRAIG, L. *Vibrio cholera* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. **NHI Public Access.** 16(1). 137-148, 2008.

LI, Z; LU, X; WANG, D; LIANG, WL; ZHANG, J; LI, J; XU, J; PANG, B; KAN, B. Genomic comparison of serogroups O159 and O170 with other *Vibrio cholera* serogroups. **BMC Genomics.** (20). 241, 2009.

LIPPI, D; GOTUZZO, E; CAINI, S. **Cholera**. *Microbiology Spectrum*. American Society for Microbiology Press. ASM Science.org/MicrobiolSpectrum. 1-6, 2016.

LO IACONO, G; ARMSTRONG, B; FLEMING, LE; ELSON, R; KOVATS, S; VARDOULAKIS, S; NICHOLS, GL. Challenges in developing methods for quantifying the effects of weather and climate on water-associated diseases: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** v. 11, 2017.

LOUIS VR; RUSSEK-COHEN E; RIVER ING; GANGLE B; JIANG SC; RUBIN A; PATZ JA; HUQ A; COLWELL RR. Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, n. 5, p. 2773-2785, 2003.

LOUIS, MEST; PORTER, JD; HELAL, A; DRAME, K; HARGRETT-BEAN, N; WELLS, JG; TAUXE, RV. Epidemic Cholerae in West Africa: The role of food handling and high risk foods. **American Journal of Epidemiology.** v. 131, n. 4, 1990.

LUCIEN MAB; SCHAAD N; STEENLAND MW; MINTZ ED; EMMANUEL R; FREEMAN N; BONCY J; ADRIEN P; JOSEPH GA; KATZ MA. Identifying the most sensitive and specific sign and symptom combinations for cholera: results from an analysis of laboratory-based surveillance data from Haiti, 2012–2013. **Am. Journal Trop. Med Hyg.** (92). 758-764, 2015.

LUTZ, C; ERKEN, M; NOORIAN, P; SUN, S; MCDUGALD D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. **Frontier of Microbiology.** v. 4, Art.(375). 1-15, 2013.

LV, B; CUI, Y; TIAN, W; FENG, D. Composition and influencing factors of bacterial communities in ballast tank sediments: Implications for ballast water and sediment management. **Mar. Environ. Res.** (132). 14-22, 2017.

LYMPEROPOULOU DS; DOBBS FC. Bacterial Diversity in Ships' Ballast Water, Ballast-Water Exchange, and Implications for Ship-Mediated Dispersal of Microorganisms. **Environ. Sci. Technol.** 51(4). 1962-1972, 2017.

MAC FADDIN, JF. **Pruebas bioquímicas para la identific bacterias import clinic.** Ed. Medica Panamericana (ME), 1993. 850 p.

MAGALHÃES, FM. **Arte Naval.** 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Marinha do Brasil, 2002. 676 p.

MAGALHÃES, V; MAGALHÃES, M; MARQUES, L.R.M. Vibrios among patients of good socioeconomic conditions during the cholera epidemic in Recife, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical.** 35(4). 345-346. 1993.

MAGLIÉ, L; FRANÉIÉ, V; ZEC, D; DAVID, M. Ballast water sediment management in ports. **Marine Pollut. Bull.** 1:8. 2017.

MANNING, PA. **The tcp gene cluster of Vibrio cholera.** *Gene* 192. 63-70. 1997.

MARINE IMPACT. Our expertise in stories. Industry Insilght. **Type-approved, USCG-compliant ballast water treatment systems now widely available.** Disponível em: <https://www.dnvgl.com/expert-story/maritime-impact/Ballast-water-management-type-approved-USCG-compliant-treatment-systems-now-widely-available.html>. Acesso em: 30 dez. 2019, 2019.

MARINE TRAFFIC. **Global Ship Marine Traffic.** Disponível em: <https://www.marinetraffic.com/>. Acesso em: 28 nov. 2019, 2019.

MARKAN CV. **Caracterização de V. cholerae, V. parahaemolyticus e V. vulnificus em amostras da região costeira do Estado de São Paulo, de regiões portuárias brasileiras e de tanque de lastro de navios.** Orientador: Irma Nelly Gutierrez Rivera. 2008. 178f. Dissertação (Doutorado em Ciências). Centro de Ciências Médicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

MARTINELLI, JEM. **A associação entre o zooplâncton e o Vibrio cholerae no complexo estuarino de Santos – Bertioga e plataforma adjacente.** Orientador: Rubens Mendes Lopes. 2007. 151f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de Oceanografia Biológica). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

MASOUMI-ASL, H; GOUYA, MM; RAHBAR, M; SABOURIAN, R. The epidemiology and antimicrobial resistance of cholera cases in Iran during 2013. **Iranian Journal of Microbiology.** 8(4). 232-237, 2016.

MAZEL, D; DYCHINCO, B; WEBB, VA; DAVIES, J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. **Science.** (24). 280(5363). 605-608, 1998.

MCCARTHY SA. Effects of Temperature and Salinity on Survival of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in Seawater. **Microb. Ecol.** (31). 167-175, 1996.

MCCARTHY, SA; KHAMBATY, FM. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. **American. Soc. For Microbiology.** v. 60, n. 7, 1994.

MEDRONHO, RA; WERNECK, GL; PEREZ, MA. Distribuição das doenças no Espaço e Tempo. 83:102p. 2009. *In:* MEDRONHO, RA; BLOCH, KV, LUIZ, RB; WERNECK, GL. **Epidemiologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2009. 685p.

MENDES-MARQUES, CL; NASCIMENTO, LM; THEOPHILOS, GND; HOFFER, E; MELO NETO, OP; LEAL, NC. Molecular characterization of *Aeromonas* spp. And vibrio cholerae 01 isolated during a diarrhea outbreak. **Revista Instituto de Medicina Tropical.** 54 (6). 299-304, 2012.

MENEZES, FGR; NEVES, SS; SOUSA, OV; VILA-NOVA, CMVM; MAGGIONI, R; THEOPHILO, GND; HOFER, E; VIEIRA, RHSF. Detection of virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholera* from estuaries in Northeastern Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.** 56(5). 427-432, 2014.

MILLER, CJ; DRASAR, BS; FEACHEM, RG. Response of toxigenic *V. cholera* O1 to physico-chemical stresses in aquatic environments. **Journal of Hygiene.** (93). 475-495, 1984.

MIMURA, H; KATAKURA, R; ISHIDA, H. Changes of microbial populations in a ship's ballast water and sediments on a voyage from Japan to Qatar. **Marine Pollution Bulletin.** v. 50, p. 751-757, 2005.

MITCHELL, KC; BREEN, P; BRITTON, S; NEELY, MN; WITHEY, JH. Quantifying *Vibrio cholerae* Enterotoxigenicity. **American Society for Microbiology: Applied and Environmental Microbiology.** v. 83, n. 16, p. 1-10, 2017.

MONIÉ, F; VIDAL, SMSC. Cidades, portos e cidades portuárias na era da integração produtiva. **Rev. Adm. Pública.** v. 40, n.6, p. 975-995, 2006.

MONQUERO, PA; SILVA, PV; SILVA, H; TABLAS, DC; ORZARI, I. Lixiviação e persistência dos herbicidas sulfentrazone e imazapic. **Planta daninha,** v. 28, n. 1, p. 185-195, 2010.

MONTEALEGRE-QUIJANO, SM; LAURINO, LB. Navegação. Capítulo (4). 86:107 *In:* CALAZANS D. **Estudos oceanográficos:** do instrumental ao prático. Pelotas , RS: Editora Textos. 2011. 462p.

MONTILLA, R; CHOWDHURY, MA; HUQ, A; XU, B; COLWELL, RR. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* non-O1 to *Vibrio cholerae* O1: effect of growth state of cells, temperature, and salinity. **Can. J. Microbial.** (42). 87-93, 1996.

MOORE, SM; AZMAN, AS; ZAITCHIK, BF; MINTZ, ED; BRUNKARD, J; LEGROS, D; HILL A; MCKAYA H; LUQUERO FJ; OLSON D; LESSLERG, J. El Niño and the shifting geography of cholera in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 114(17). 4436-4441, 2017.

MORENO-ANDRÉS, J; ACEVEDO-MERINO, A; NEBOT, E. Study of marine bacteria inactivation by photochemical processes: disinfection kinetics and growth modeling after treatment. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 1-11, 2018.

MORGAN, SJ; FELEK, S; GADWAL, S; KOROPATKIN, NM; PERRY, JW; BRYSON, AB; KRUKONIS, ES. The two faces of ToxR: activator of ompU, co-regulator of toxT in *Vibrio cholera*. **Molecular Microbiology.** v. 81, n. 1, p. 113-128, 2011.

MORSE, SS. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. **Perspectives Emerging Infectious Diseases**, New York, EUA. v. 1, p. 7-14, 1995.

MUKHOPADHYAY, AK. Mapping of cholera cases using satellite based recording systems to investigate the outbreak. **Indian Journal of Medical Research.** (142). 509-511, 2015.

NADRI, J; SAUVAGEOT, D; NJANPOP-LAFOURCADE, BM; BALTAZAR, CS; KERE, AB; BWIRE, G; GESSNER, BD. Sensitivity, specificity, and public-health utility of clinical case definitions based on the signs and symptoms of cholera in Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 98(4). 1021-1030, 2018.

NANDI, B; NANDY RK; VICENTE, ACP; GHOSE, AC. Molecular Characterization of a New Variant of Toxin-Coregulated Pilus Protein (TcpA) in a Toxigenic Non-O1/Non-O139 Strain of *Vibrio cholera*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 948-952, 2000.

NASSER, VL. **Estudo da Qualidade de água na Baía de Guanabara:** utilizando técnicas de sensoriamento remoto e análise geostatística. Orientador: Otto Corrêa Rotunno Filho. 2001. 167f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ). Rio de Janeiro, 2001.

NELSON, EJ; HARRIS, JB; MORRIS, JG JR; CALDERWOOD, SB; CAMILLI, A. *Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic.* **Nat. Rev. Microbiol.** 7(10). 693-702, 2009.

NG, C; GOH SG; SAEIDI, N; GERHARD, WA; GUNSCH, CK; GIN, KYH. Occurrence of *Vibrio* species, beta-lactam resistant *Vibrio* species, and indicator bacteria in ballast and port waters of a tropical harbor. **Science of the Total Environment**, p. 651-656, 2018.

NG, D; HARN, T; ALTINDAL, T; KOLAPPAN, S; MARLES, JM; LALA, R; SPIELMAN, I; GAO, Y; HAUKE, CA; KOVACIKOVA G; VERJEE, Z; TAYLOR, RK; BIAIS, N; CRAIG, L. The *Vibrio cholerae* Minor Pilin TcpB Initiates Assembly and Retraction of the Toxin-Coregulated Pilus. **PLOS Pathogens.** 1-31, 2016.

NIH. National Institute of Health. Detection, Isolation, and Identification of *Vibrio cholerae* from the Environment, 2012. **Curr. Protoc. Microbiol.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461827/>. Acesso em: 17 mar. 2018.

NOGUEIRA, JMR; RODRIGUES DP; HOFER, E. Viabilidade de *Vibrio cholerae* O1 em diferentes tipos de águas em condições experimentais. **Cadernos de Saúde Pública.** 18(5). 1339-1345, 2002.

OCHSNER, UA; KATILIUS, E; JANJIC, N. Detection of clostridium difficile toxins A, B
OGIERMAN, MA; VOSS, E; MEANEY, CA; FAAST, R; ATTRIDGE, SR; MANNING,
PA. **Comparison of the promoter regions of the tcp gene cluster in classical and El Tor
strains of Vibrio cholerae O1.** Gene (170). 9-16, 1996.

OGIERMAN, MA; ZABIHI, S; MOURTZIOS, L; MANNING, PA. **Genetic organization
and sequence of tcp gene cluster of Vibrio cholerae.** Gene (126). 51-60, 1993.

OLIVEIRA, DD; SILVA, EE; PEREIRA, SS; LOPES, AP; COSTA, BS; VENTURA, M;
FERNANDES, MAS. Monitoring vessel traffic in Rio de Janeiro port area: Control of marine
antifouling regulations. **Ocean & Coastal Management.** Vol.(182), 2019.

PADILLA, G; COSTA, SOP. Genética Bacteriana. 37:49. 2008. *In:* TRABULSI, LR;
ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.760 p.

PASSOS, ADC. Epidemia de cólera no Sul do Brasil. **Cad. Saúde Pública.** v. 15, n. 2, p.
426-427, 1999.

PATEL M; ISAA` CSON M. The Effect of iron on the toxenicity of Vibrio cholerae. **Am. J.
Trop. Med. Hyg.** 60(3). 392-396, 1999.

PAZ, FA; BERCINI MA. Doenças Emergentes e Reemergentes no Contexto da Saúde
Pública. **Boletim da Saúde,** v. 23, n. 1, 2009. Disponível em:
[http://www.boletimdasaude.rs.gov.br/conteudo/1441/doen%C3%A7as-emergentes-e-
reemergentes-no-contexto-da-sa%C3%BAdede-p%C3%ABblica-](http://www.boletimdasaude.rs.gov.br/conteudo/1441/doen%C3%A7as-emergentes-e-reemergentes-no-contexto-da-sa%C3%BAdede-p%C3%ABblica-). Acesso em: 03 mar. 2018.

PEREIRA, C; VEIGA, N. A Epidemiologia de Hipócrates ao Século XX. **Revista
Millenium.** (47). 129-140. jun/dez, 2014.

PEREIRA, CS; POSSAS, CA; VIANA, CM; RODRIGUES, DP. Vibrio spp. isolados a partir
de mexilhões (Perna perna) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio
de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, n. 2, p. 387-390, 2007.

PEREIRA, NN. **Alternativas de tratamento de água de lastro em portos exportadores de
minério de ferro.** Orientador: Hernani Luiz Brinati. 2012. 349f. Tese (Doutorado em
Engenharia). Escola Politécnica de São Paulo. São Paulo, 2012.

PÉREZ-REYTOR, D; JAÑA, V; PAVEZ, L; NAVARRETE, P; GARCÍA, K. Accessory
Toxins of Vibrio Pathogens and Their Role in Epithelial Disruption During Infection.
Frontiers in Microbiology. Vol.(9). Art.(2248), 2018.

PIARROUX, R; BARRAIS, R; FAUCHER, B; HAUS, R; PIARROUX, M; GAUDART, J.
Understanding the cholera epidemic Haiti. **Emerg Infect Dis.**17(7). 1161-1168, 2011.

PORTOSRIO. **Docas do Rio de Janeiro:** Autoridade Portuária. Disponível em:
<http://www.portosrio.gov.br/node/show/102>. Acesso em:17 Maio 2019.

PURDY, AE; BALCH, D; LIZÁRRAGA-PARTIDA, ML; ISLAM, MS, MARTINEZ-URTAZA J; HUQ A; COLWELL RR; BARTLETT DH. Diversity and distribution of cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. **Environ. Microbiol. Rep.** (2)1. 198-207, 2010.

QUEVEDO E. Los tiempos del cólera: orígenes y llegada de la peste a Colombia. **Revista Credencial Historia.** (29). 1:4. 1992. Disponível em: <http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/revistas/credencial/mayo1992/mayo2.htm>. Acesso em: 28 fev. 2018.

RAJANNA, C; WANG, J; ZHANG, D; XU, Z; ALI, A; HOU, YM; KARAOLIS, DKR. The *Vibrio* Pathogenicity Island of Epidemic *Vibrio cholerae* Forms Precise Extrachromosomal Circular Excision Products. **Journal of Bacteriology.** v. 185, n. 23, p. 6893-6901, 2003.

RALSTON, EP; KITE-POWELL, H; BEET, A. An estimate of the cost of acute health effects from food- and water- borne marine pathogens and toxins in the USA. **Journal of Water and Health.** (9). 680:694, 2012.

RAMAIAH N; KOLHE V; SADHASIVAN A. Quantitative analyses of pollution-indicator and pathogenic bacteria in Mumbai waters from Ballast water exchange perspective. **Environ. Monit. Assess.** v.104, n. 1, p. 295-308, 2005.

RAMAMURTHY, T; MUTREJA, A; WEILL, FX; DAS, B; GHOSH, A; NAIR, GB. Revisiting the Global Epidemiology of Cholera in Conjunction With the Genomics of *Vibrio cholerae*. **Front. Public Health.** (23). July, 2019.

REIDL J; KLOSE KE. *Vibrio cholerae and cholera: out of the water and into the host.* **FEMS Microbiology Reviews.** v. 26. n. (2)1. 125-139, 2002.

REZENDE, J. *O Cólera, A Cólera.* Revista De Patologia Tropical. **Journal of Tropical Pathology.** 26(1). 149:153, 1997.

RHINE, JA; TAYLOR, KR. TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.** (13). 1013-1020, 1994.

RIECKMANN, A; TAMASON, CC; GURLEY, ES; ROD, NH; KJÆR, P; JENSEN, M. Exploring Droughts and Floods and Their Association with Cholera Outbreaks in Sub-Saharan Africa: A Register-Based Ecological Study from 1990 to 2010. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 1-15, 2012.

RIVERA, ING. **Aspectos moleculares de *Vibrio cholerae* O1 e não O1 e relação entre amostras isoladas na fase pré e epidêmica durante a sétima pandemia.** Orientador: Maria Therezinha Martins. 1995. 201f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Médicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995.

RIVERA, ING; CHUN, J; HUQ, A; SACK, RB; COLWELL, RR. Genotype associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Appl. Environment. Microbiology.** v. 67, n. 6, p. 2421-2429, 2001.

RIVERA, ING; SOUZA, KM; SOUZA, CP; LOPES, RM. Free-living and plankton-associated vibrios: assessment in ballast water, harbor areas, and coastal ecosystems in Brazil. **Frontier of Microbiology**. Vol.(3). Art.(443), 2013.

RIVERA, ING; SOUZA, LIPP, E.K; GIL, A; CHOOPUN, N; HUQ, A; COLWELL, R.R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* 01 and 0139 from aquatic ecosystems. **Environmental Microbiology**. 5(7). 599-606, 2003.

ROSEN, G. *Uma História da Saúde Pública*. 2. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2000. 400 p.

RUIZ, GM; RAWLINGS, TK; DOBBS, FC; DRAKE, LA; MULLADY, T; HUQ, A; COWELL, RR. Global spread of microorganisms by ships. **Nature**. (408). 49-50, 2000.

RYAN, SJ; STEWART-IBARRA, AM; ORDÓÑEZ-ENIREB, E; CHU, W; FINKELSTEIN, JL; KING, CA; POLHEMUS, M. Spatiotemporal variation in environmental *Vibrio cholerae* in an estuary in southern coastal Ecuador. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 15(3), 2018.

SÁ, LLC; FONSECA, EL; PELLEGRINI M; FREITAS, F; LOUREIRO, ECB; VICENTE, ACP. Occurrence and composition of class 1 and class 2 integrons in clinical and environmental 01 and non-01/non-1039 *vibrio cholerae* strains from the Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol.105(2). 229-232, 2010.

SACHS, I. *Caminhos pra o desenvolvimento sustentável*. Rio de Janeiro: Editora Garamond, 2012. 95 p.

SACK, DA; SACK, RB; NAIR, GB; SIDDIQUE, AK. *Cholerae*. **The Lancet**. v. 363, n. 17, 2004. Disponível em: <http://www.thelancet.com>. Acesso em: 01 mar. 2017.

SAEKI, EK; FARHAT, LP; PONTES, EA. Eficiência dos crioprotetores glicérol e leite desnatado para o congelamento de microrganismos. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 9, n. 2, p. 195-198, 2015.

SAFA, A; NAIR, GB; KONG, RYC. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 1, 2010.

SATIR T. Ballast water treatment systems: design, regulations, and selection under the choice varying priorities. **Environ. Sci. Pollut. Res.** (18). 10686-10695, 2014.

SCALLAN, E; GRIFFIN, PM; ANGULO, FJ; TAUXE, RV; HOEKSTRA, RM. Foodborne illness acquired in the United States—unspecified agents. **Emerging Infectious Diseases**. (17). 16-22, 2011.

SCHMIEGELOW, L. **O Planeta Azul**: uma introdução às Ciências Marinhas. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 379 p.

SEEBENS, H; GASTNER, MT; BLASIUS. The risk of marine bioinvasion caused by global shipping. **Ecology Letters**. 16(6). 782-790, 2013.

- SEIDLEIN, LV; DEEN, JL. Preventing cholera outbreaks through early targeted interventions. **PLoS Medicine**. 15(2). 2016-2019, 2018.
- SENDEROVICH, Y; IZHAKI, I; HALPERN, M. Fish as reservoirs and vectors of *Vibrio cholerae*. **PLoS ONE**. (5), 2010.
- SHIKUMA NJ; HADFIELD MG. Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **Biofouling**. (26). 39-46, 2010.
- SILVA, JSV; FERNANDES, FC; SOUZA, RCCL; LARSEN, KTS; DANELOM OM. Água de Lastro e Bioinvasão. 1-9. 2004. In: SILVA, JSV, FERNANDES, FC, SOUZA, RCCL (Organizadores). **Água de Lastro e Bioinvasão**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 224 p.
- SILVA, ES. **Identificação de risco de possíveis casos de cólera na cidade de Itaguaí (RJ) e adjacências**: A contribuição da Água de Lastro. Orientadores: Christiane Soares Pereira e Cristiane da Silveira Fiori. 2009. 125f. Monografia (Especialização em Biologia Marinha e Oceanografia). Departamento de Biologia Marinha, Faculdades Integradas Maria Thereza. Niterói, Rio de Janeiro. 2009.
- SILVA, ES. **Possibilidade de cólera no porto da Cidade do Rio de Janeiro, Brasil**. Niterói, Rio de Janeiro. Orientadores: Célio Mauro Vianna. 2012. 150p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais, Área de Grociências). Departamento de Geociências. Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro. 2012.
- SILVA ES; VIANA CM; RIVERA ING; WEDEKIND ES. Verificação de *V.cholerae* em águas portuárias da cidade do Rio de Janeiro, Brasil: um ensaio metodológico. **Vigilância Sanitária em Debate**. 4(1). 13-19, 2015.
- SILVA, ES, OLIVEIRA, DD; LOPES, AP. Acesso ao Saneamento básico e Incidência de Cólera: uma análise quantitativa entre 2010 e 2015. **Saúde em Debate**. v. 43, n. (Especial) 3. 121-136, 2019a.
- SILVA, ES; FERNANDEZ, MAS; LOPES, AP; COSTA, BA; PEREIRA, SS; PEREIRA, MV. Variation of pH, salinity and temperature for the establishment of *Vibrio cholerae* in the city of Rio de Janeiro (Brazil). **Vigil. Sanit. em Debate**. 7(1). 14-22, 2019b.
- SINGH, AK; HALDAR, R; MANDAL, D; KUNDU, M. Analysis of the Topology of *Vibrio cholerae* NorM and Identification of Amino Acid Residues Involved in Norfloxacin Resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 50, n. 11, p. 3717-3723, 2006.
- SINGLETON, F L; ATTWELL, R; JANGI, S; COLWELL, RR. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. **Appl. Environ. Microbiol**. 44(5). 1047-1058, 1982.
- SIRIPHAP, A; LEEKITCHAROENPHON, P; KAAS, RS; THEETHAKAEW, C; AARESTRUP, FM; SUTHEINKUL, O; HENDRIKSEN, RS. Characterization and Genetic Variation of *Vibrio cholerae* Isolated from Clinical and Environmental Sources in Thailand. **Plos One**. (19). 1-17, 2017.

SNOW, J. *Sobre a maneira de transmissão do cólera*. São Paulo: Editora Abrasco, 1999. 249 p.

SOMBOONWIT, C; MENEZES, LJ; HOLT, DA; SINNOTT, JT; SHAPSHAK, P. Current views and challenges on clinical cholera. **Bioinformation**, 13(12). 405-409, 2017.

SON, MS; TAYLOR, RK. Genetic Screens and Biochemical assays to characterize Vibrio cholera O1 Biotypes: Classical and El Tor. **Curr. Protoc. Microbiol.** (22a), 2011.

SOUZA, MTA. A bioinvasão de ambientes aquáticos provocada pela água de lastro das embarcações e suas consequências jurídicas. Jus.Com.br. Setembro. Disponível em: <https://jus.com.br/artigos/42998/a-bioinvasao-de-ambientes-aquaticos-provocada-pela-agua-de-lastro-das-embarcacoes-e-suas-consequencias-juridicas>. Acesso em: 10 fev. 2019.

SOUZA, RCCL; CALAZANS, SH; SILVA, EP. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. **Cienc. Cult.** Vol.(61). Num.(1), 2009.

SSEMAKALU, CC; WOULTER, L; PILLAY, M. Impact of solar irradiation on cholera toxin secretion by different strains of Vibrio cholerae. **South African Journal of Science.** (109). 1-6, 2013.

STARLIPER, CE; WATTEN, BJ; IWANOWICZ, DD; GREEN, PA; BASSETT, NL, ADAMS, CR. Efficacy of pH elevation as a bactericidal strategy for treating ballast water of freight carriers. **Journal Adv. Res.** 6(3). 501-509, 2015.

STEWART, RH. Introduction to Physical Oceanography. **Temperature, Salinity, and Density**. Chapter 6. Definition of Temperature, 2004.

STHEPANIDES, M. *Jasão e os Argonautas*. 2. ed. São Paulo: Editora Odysseus, 2001. 177p.

STROEHER, UH; JEDANI, KE; MANNING, PA. **Genetic organization of the regions associated with surface polysaccharide synthesis in Vibrio cholerae O1, O139 and Vibrio anguillarum O1 and O2**: a review. *Gene*. (223). 269-282, 1998.

SULTANA, M; NUSRIN, S; HASAN, NA; SADIQUE, A; AHMED, KU; ISLAM, A; ALAM, M. Biofilms Comprise a Component of the Annual Cycle of Vibrio cholerae in the Bay of Bengal Estuary, **MBio**. 9(2), 2018.

TAMPLIN, ML; COLWELL, RR. Effects of microcosm salinity and organic substrate concentration on production of Vibrio cholerae enterotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**. (52). 297-301, 1986.

TAMPLIN, ML; GAUZENS, AL.; HUQ, A; SACK, DA; COLWELL, RR. Attachment of Vibrio cholerae serogroup O1 to Zooplankton and Phytoplankton of Bangladesh waters. **Application environment microbiology**. 56(6). 1977-1980, 1990.

TAYLOR, JL; TUTTLE, J; PRAMUKUL, T; O'BRIEN, K; BARRETT, TJ; JOLBITADO, B; LIM, YL; VUGIA, D; MORRIS, JG; TAUXE, RV. An outbreak of cholera in Maryland associated with imported commercial frozen fresh coconut milk. **Journal Infect. Dis.** 167(6). 1330-1335, 1993.

TEIXEIRA, CAN; ROCIO, MAR; MENDES, APA; D'OLIVEIRA, LAS. **Navegação de Cabotagem Brasileira**. BNDES. Setorial 47. 391-436, 2018.

THOMAS, KU; JOSEPH, N; RAVEENDRAN, O; NAIR, S. Salinity- induced survival strategy of *Vibrio cholerae* associated with copepods in Cochin backwaters. **Mar. Pollut. Bull.** (52). 1425-1430, 2006.

UNCTAD. United Nations Conference on Trade and Development. **Review of Maritime Transport (2018)**. Disponível em: https://unctad.org/en/PublicationsLibrary/rmt2018_en.pdf. Acesso em: 07 set. 2018, 2019.

UNCTAD. United Nations Conference on Trade and Development. **Review of Maritime Transport (2019)**. Disponível em https://unctad.org/en/PublicationsLibrary/rmt2019_en.pdf. Acesso em: 30 abr. 2020.

UNO. United Nations Organization: **Department of Economic and Social Affairs**. Disponível em: <http://esa.un.org/unpd/wup/DataQuery/>. Acesso em: 12 dez. 2017.

USUPORTRJ. Associação dos usuários dos portos do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.usuportrj.org/portos-e-terminais-do-rj.html>. Acesso em: 21 abr. 2020.

VANBENNEKOM, N. **Cholera Toxin Activates: The Unfolded Protein Response Through An Adenylate Cyclase-independent Mechanism**. Orientador: Kenneth Teter. 2013. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Microbiologia e Biologia Molecular. Centro de Ciências Biomédicas. Universidade da Flórida. EUA, 2013.

VARALLO, FR; PASSOS, AC; NADAI, TR; MASTROIANNI, PC. Incidents reporting: barriers and strategies to promote safety culture. **Rev. Esc. Enferm. USP**. Vol.(52). 2018.

VARGA, JJ; NGUYEN, V; O'BRIEN, DK; RODGERS, K; WALKER, RA; MELVILLE, SB. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. **Mol. Microbiol.** (62). 680-694, 2006.

VESSEL FINDER. **Free AIS Ship Tracking of Marine Traffic**. Disponível em: <http://https://www.vesselfinder.com/>. Acesso em: 20 dez. 2019.

VILLAC, MC; FERREIRA, CEL; JUNQUEIRA, AOR. Bioinvasão. 43:69, 2008. *In*: NETO, JAB; WALLNER-KERRSSANACH, M. PATCHINEELAM, SM. (Org.). **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2008. 412 p.

VUGIA, DJ; KOEHLER, JE; RIESS, A. Surveillance for epidemic cholera in the Americas: an assessment. **Mmwr Morb Mortal Wkly Rep.** (41). 27-34, 1992.

WANG, J; MELYING Y; GAO, H; LU X; KAN B. *Vibrio cholerae* Colonization of Soft-Shelled Turtles. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 83, n. 14, 2007.

WEI, S; ZHAO H; XIAN, Y; HUSSAIN MA; WU, X. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 79, n. 2, p.115-118, 2014.

WEIL, AA; KHAN, AI; CHOWDHURY, F; LAROCQUE, RC; FARUQUE, AS. Clinical outcomes in household contacts of patients with cholera in Bangladesh. **Clin. Infect. Dis.** 49(10). 1473-1479, 2009.

WEINER, R. The plasticity of marine bacteria: adaptations to high-and-low-nutrient habitats. 212-234. 1999. In: ROSEMBERG , (Ed.) **Microbial Ecology and infectious diseases**. Washington DC: American Society of Microbiology, 1999.

WENNBERG, AC, TRYLAND, I; ØSTENSVIK, Ø; SECIC, I; MONSHAUGEN, M; LILTVED H. Effect of water treatment on the growth potential of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in seawater. **Marine Environmental Research**. (83). 10-15, 2013.

WERSCHKUN, B; BANERJI, S; BASURKO, OC, DAVID, M; FUHR, F; GOLLASCH, SE; GRUMMTF, T; HAARICH MG; AWADHESH, N; JHA, J; KACAN, SI; KEHRER, AJ; LINDERS, LK; MESBAHIL E; PUGHIUCM D; RICHARDSON SDN; SCHWARZ-SCHULZ, B; SHAHO, A; THEOBALD, NI; GUNTENO, UVP; WIECKJ S; HÖFER T. Emerging risks from ballast water treatment: The run-up to the International Ballast Water Management Convention. **Chemosphere**. (112). 256-266, 2014.

WEYNBERG, KD; VOOLSTRA, CR; NEAVE, MJ; BUERGER, P; VAN OPPEN, MJH. From cholera to corals: Viruses as drivers of virulence in a major coral bacterial pathogen. **Scientific Reports**. (5). 1-9, 2015.

WHO. World Health Organization. **Surto de Cólera: Avaliar a resposta ao surto de Cólera e melhorar a preparação**. 2006. 90p.

WHO. World Health Organization. Cholera vaccines: WHO position paper. Geneva, France. **Weekly epidemiological Record**. v. 85, n. 13, p. 117-128, 2010.

WHO. World Health Organization. **Cholerae: Number of cases reported**. Disponível em: http://gamapserv.who.int/gho/interactive_charts/cholera/atlas.html. Acesso em: 31 dez. 2017.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for Drinking-Water Quality**. Disponível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob6.pdf. Acesso em: 27 nov. 2019.

WORDEN, AZ; SEIDEL, M; SMRIGA, S; WICK, A; MALFATTI, F; BARLETT, D; AZAM, F. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. **Environmental Microbiology**, 8(1). 21-29, 2006.

WORLD BANK. **Data Bank and Databases**. Disponível em: <http://databank.worldbank.org/>. Acesso em: 06 dez. 2017.

WU, B; LIANG, W; KAN, B. Growth Phase, Oxygen, Temperature, and Starvation Affect the Development of Viable but Non-culturable State of *Vibrio cholera*. **Frontier of Microbiology**. Vol.(7). Art.(404), 2006.

ZANELLA, TV. **Água de Lastro**: Um problema Ambiental Global. Curitiba: Editora Juruá, , 2010. 159 p.

ZHANG, X; BAI, M; TIAN, Y; DU, H; ZHANG, Z. The estimation for ballast water discharged to China from 2007 to 2014. **Marine Pollution Bulletin**. 124(1). 89-93, 2017.

ZILLER, SR; ZALBA, S. Modelo para o desenvolvimento de uma estratégia nacional para espécies exóticas invasoras. Programa de Espécies Exóticas Invasoras para a América do Sul. The Nature Conservancy. Programa Global de Espécies Invasoras – GISP. *Natureza & Conservação*. 5(2). 2007.

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
01	20.03 2016	PN	25 / 35 (78)	0.4 / 1.1	P1	09:10	09:17	28,60	*	8,45	*	24,00	*
					P2	08:48	08:55	27,60	*	8,86	*	26,00	*
					P3	08:28	08:29	28,10	*	8,67	*	26,50	*
					P4	07:49	07:57	28,20	*	8,39	*	27,00	*
					P5	07:30	07:39	27,90	*	8,47	*	27,00	*
					P6	10:38	10:44	25,90	*	8,72	*	28,00	*
					P7	09:58	10:05	27,10	*	8,80	*	27,00	*
					P8	*	*	*	*	*	*	*	*
					P9	*	*	*	*	*	*	*	*
02	20.05 2016	PN	26 / 37 (75)	0.4 / 1.0	P1	09:39	09:58	20,80	*	8,51	*	32,00	*
					P2	09:21	09:27	20,00	*	8,47	*	31,80	*
					P3	08:43	08:52	20,30	*	8,47	*	30,10	*
					P4	08:07	08:28	20,00	*	8,57	*	32,50	*
					P5	07:49	07:57	19,60	*	8,57	*	32,00	*
					P6	12:00	12:07	21,00	*	8,59	*	32,00	*
					P7	11:38	11:44	22,00	*	8,69	*	31,80	*
					P8	11:01	11:04	22,00	*	8,66	*	32,00	*
					P9	09:00	09:07	20,40	*	8,33	*	27,80	*

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo (continuação)

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
03	24.06 2016	PN	18 / 21 (82)	1.1 / 0.3	P1	08:52	08:57	21,50	*	8,49	*	31,80	*
					P2	08:38	08:42	21,40	*	8,61	*	32,30	*
					P3	08:06	08:10	21,10	*	8,51	*	31,60	*
					P4	07:42	07:44	20,70	*	8,50	*	30,50	*
					P5	07:12	07:21	20,70	*	8,53	*	32,30	*
					P6	10:56	10:59	21,70	*	8,60	*	32,00	*
					P7	10:29	10:34	21,80	*	8,62	*	32,00	*
					P8	09:51	09:54	21,60	*	8,55	*	32,00	*
					P9	08:19	08:29	21,40	*	8,44	*	31,90	*
04	22.07 2016	PN	16 / 21 (78)	1.1 / 0.2	P1	09:05	09:09	21,20	*	8,38	*	31,20	*
					P2	08:40	08:57	21,20	*	8,40	*	31,50	*
					P3	08:12	08:20	20,60	*	8,25	*	29,60	*
					P4	07:51	07:55	20,80	*	8,38	*	31,20	*
					P5	07:32	07:41	20,70	*	8,45	*	31,40	*
					P6	11:00	11:10	21,30	*	8,46	*	31,30	*
					P7	10:39	10:41	21,60	*	8,56	*	31,20	*
					P8	10:00	10:07	21,30	*	8,51	*	29,80	*
					P9	08:24	08:30	21,10	*	8,40	*	31,20	*
05	30.08 2016	PN	20 / 29 (83)	0.3 / 0.1	P1	08:38	08:49	24,00	*	8,31	*	31,30	*
					P2	08:28	08:31	23,40	*	8,14	*	31,40	*
					P3	08:03	08:06	22,80	*	7,82	*	31,00	*
					P4	07:42	07:48	23,70	*	8,29	*	31,40	*
					P5	07:26	07:32	23,80	*	8,38	*	30,80	*
					P6	11:43	11:45	23,50	*	8,44	*	31,90	*
					P7	11:15	11:17	24,80	*	8,60	*	31,40	*
					P8	09:27	09:30	24,90	*	8,55	*	29,80	*
					P9	08:13	08:15	23,20	*	7,66	*	29,40	*

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo (continuação)

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
06	29.09 2016	PN	15 / 31 (49)	2.0 / 0.2	P1	08:41	08:44	23,70	*	7,97	*	30,70	*
					P2	08:30	08:34	23,50	*	7,99	*	31,40	*
					P3	07:58	08:04	22,90	*	7,66	*	28,20	*
					P4	07:39	07:43	23,00	*	8,02	*	31,50	*
					P5	07:26	07:30	22,90	*	8,03	*	31,00	*
					P6	10:43	10:46	23,60	*	8,10	*	31,70	*
					P7	10:11	10:16	23,70	*	8,14	*	31,30	*
					P8	09:30	09:38	23,70	*	8,01	*	31,30	*
					P9	08:13	08:16	23,10	*	7,75	*	29,90	*
07	21.10 2016	PN	22 / 28 (80)	0.6 / 0.8	P1	08:42	08:47	25,90	*	8,06	*	31,30	*
					P2	08:29	08:34	25,40	*	8,06	*	32,70	*
					P3	08:04	08:08	25,10	*	7,94	*	32,30	*
					P4	07:40	07:46	25,40	*	8,10	*	32,10	*
					P5	07:28	07:33	25,20	*	8,17	*	33,10	*
					P6	10:30	10:35	25,50	*	8,19	*	32,90	*
					P7	10:05	10:10	25,90	*	8,33	*	32,60	*
					P8	09:33	09:37	26,00	*	8,29	*	32,60	*
					P9	08:14	08:19	25,50	*	8,00	*	32,20	*
08	23.11 2016	NU	22 / 29 (65)	1.2 / 0.4	P1	10:38	10:41	29,70	24,70	8,29	8,28	28,30	29,70
					P2	10:11	10:16	25,00	23,50	8,25	8,06	29,80	32,90
					P3	09:38	09:43	25,10	24,20	7,91	7,65	27,80	31,10
					P4	09:20	09:23	24,80	23,50	8,33	8,14	29,60	32,40
					P5	09:09	09:12	24,50	24,00	8,31	8,27	30,30	31,60
					P6	12:53	12:55	24,80	24,00	8,43	8,18	27,10	29,20
					P7	12:32	12:37	24,70	23,40	8,51	8,15	27,20	32,40
					P8	11:30	11:35	24,90	24,00	8,55	8,31	28,00	30,10
					P9	09:49	09:54	24,90	24,80	8,00	7,98	29,20	29,20

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo (continuação)

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
09	21.12 2016	EN	22 / 35 (72)	0.4 / 0.9	P1	08:27	08:32	28,70	26,30	8,19	7,91	23,00	30,80
					P2	08:12	08:16	28,60	24,40	8,39	8,08	27,40	34,00
					P3	07:47	07:49	28,10	27,50	8,26	8,28	26,80	28,60
					P4	07:28	07:30	27,70	25,10	8,52	8,09	27,00	33,00
					P5	07:15	07:20	27,30	25,60	8,31	8,11	28,50	32,00
					P6	10:12	10:15	27,00	26,00	8,43	8,09	28,60	31,10
					P7	09:56	09:58	27,70	22,80	8,55	8,04	27,50	34,80
					P8	09:18	09:25	28,00	24,40	8,57	8,11	27,90	34,20
					P9	07:57	08:00	28,60	25,10	8,34	7,99	26,50	33,40
10	24.01 2017	PN	22 / 35 (53)	0.5 / 0.4	P1	08:27	08:32	29,80	28,10	7,31	7,69	29,50	32,20
					P2	08:12	08:17	28,10	27,90	7,77	7,78	32,50	32,80
					P3	07:45	07:47	29,90	29,20	7,76	7,70	28,90	30,00
					P4	07:26	07:30	29,50	29,20	7,95	7,89	29,40	30,60
					P5	07:15	07:17	29,70	28,30	7,99	7,85	29,20	32,40
					P6	10:21	10:24	29,40	28,70	*	*	28,30	31,50
					P7	09:58	10:05	29,30	29,10	*	*	26,80	29,10
					P8	09:17	09:27	29,20	28,90	*	*	27,80	29,60
					P9	07:55	08:00	29,60	28,50	7,55	7,66	24,80	32,10
11	22.02. 2017	NU	20 / 37 (32)	0.4 / 1.0	P1	08:40	08:44	26,90	24,40	8,52	8,33	31,20	32,60
					P2	08:25	08:30	26,90	19,30	8,53	8,21	31,70	34,80
					P3	07:57	08:00	25,90	25,70	8,27	8,40	28,30	31,30
					P4	07:35	07:40	27,20	21,20	8,52	8,16	32,30	37,30
					P5	07:20	07:27	26,60	23,30	8,41	8,32	32,80	33,70
					P6	10:38	10:45	26,50	25,70	8,35	8,25	33,10	33,20
					P7	10:10	10:25	26,30	23,70	8,36	8,31	33,00	33,70
					P8	09:32	09:36	28,10	24,10	8,55	8,24	31,80	33,70
					P9	08:08	08:11	25,40	25,50	8,27	8,25	29,60	29,00

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo (continuação)

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
12	21.03.2017	NU	21 / 27 (71)	0.8 / 0.6	P1	08:20	08:22	24,90	23,60	8,31	8,26	31,50	33,50
					P2	07:18	07:23	23,90	23,00	8,28	8,30	33,30	33,80
					P3	07:38	07:41	24,00	23,50	8,12	8,14	31,60	33,00
					P4	07:18	07:23	24,10	23,30	8,33	8,30	32,80	33,80
					P5	07:10	07:14	24,20	23,10	8,33	8,29	32,90	33,90
					P6	09:53	09:59	24,40	23,80	8,40	8,31	32,70	33,60
					P7	09:37	09:42	24,70	24,10	8,38	8,37	32,50	33,20
					P8	09:00	09:09	25,30	23,30	8,45	8,29	31,70	33,90
					P9	07:49	07:57	24,10	23,30	8,27	8,18	32,00	33,00
13	21.04 2017	NU	21 / 34 (88)	0.3 / 0.9	P1	08:29	08:32	24,00	23,10	8,24	8,14	31,50	32,90
					P2	08:18	08:21	23,80	22,90	8,18	8,18	31,50	33,10
					P3	07:52	07:53	24,20	23,50	7,68	8,19	25,60	32,10
					P4	07:29	07:36	23,80	23,40	8,24	8,24	31,00	32,90
					P5	07:20	07:23	24,30	23,10	8,30	8,27	29,90	33,10
					P6	10:13	10:21	24,10	23,90	8,33	8,30	32,10	32,60
					P7	09:52	09:57	24,50	22,90	8,43	8,29	31,50	33,10
					P8	09:17	09:21	24,80	22,30	8,43	8,26	31,50	33,90
					P9	08:00	08:06	23,80	23,10	8,10	8,05	30,40	32,60
14	24.05 2017	NU	18 / 26 (94)	0.1 / 1.1	P1	08:31	08:34	22,40	21,90	8,61	8,73	29,80	31,80
					P2	08:18	08:22	21,80	21,60	8,18	8,22	31,30	31,00
					P3	07:47	07:32	22,20	21,10	8,54	8,60	31,00	31,70
					P4	07:29	07:32	20,50	21,50	8,65	8,74	31,50	31,30
					P5	07:16	07:21	22,00	20,80	8,71	8,74	30,90	31,80
					P6	10:18	10:21	22,40	21,50	8,90	8,90	30,20	31,80
					P7	09:55	10:00	22,40	22,30	8,82	8,86	30,30	30,30
					P8	09:18	09:25	30,10	31,70	8,75	8,89	30,10	31,70
					P9	08:02	08:08	22,40	21,20	8,51	8,72	31,80	30,50

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo (continuação)

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
15	21.06 2017	NU	17 / 21 (70)	0.2 / 1.2	P1	08:22	08:28	21,70	21,20	7,90	7,82	25,20	26,50
					P2	08:11	08:15	21,70	21,20	7,86	7,87	25,20	26,50
					P3	07:43	07:49	21,30	21,20	7,83	7,85	23,30	26,70
					P4	07:26	07:28	21,70	21,10	7,97	7,89	24,70	26,50
					P5	07:16	07:20	21,50	21,20	7,33	7,90	24,30	27,20
					P6	08:22	08:28	21,30	21,10	8,08	8,04	26,70	27,20
					P7	09:50	09:52	21,30	21,10	8,04	7,97	26,30	27,20
					P8	09:06	09:12	21,50	21,10	7,97	7,96	24,20	26,90
					P9	07:55	07:57	21,50	21,20	7,75	7,27	22,10	27,00
16	20.07 2017	NU	12 / 23 (94)	0.1 / 1.1	P1	08:43	08:47	19,50	19,20	7,98	8,05	25,90	27,70
					P2	08:32	08:35	19,40	19,10	8,06	8,08	27,30	27,70
					P3	08:05	08:11	19,40	19,20	8,01	8,07	24,70	26,70
					P4	07:45	07:51	19,70	19,20	8,12	8,10	27,20	27,30
					P5	07:30	07:40	19,50	19,20	8,14	8,12	27,30	27,50
					P6	08:43	08:47	19,90	19,30	8,14	8,12	27,30	27,20
					P7	10:06	10:11	20,10	19,10	8,28	8,19	27,00	28,00
					P8	09:28	09:33	19,80	19,10	8,90	8,12	26,70	27,90
					P9	08:20	08:21	19,20	19,10	8,03	8,03	26,80	27,20
17	19.08 2017	NU	20 / 30 (82)	1.2 / 0.0	P1	08:20	08:25	20,80	20,50	8,30	8,19	27,20	27,80
					P2	08:06	08:11	20,60	19,70	8,23	8,20	26,40	27,00
					P3	07:44	07:49	20,20	19,70	7,84	7,73	25,00	26,80
					P4	07:26	07:31	21,20	20,20	8,21	8,20	26,00	27,50
					P5	07:16	07:22	20,80	20,10	8,24	8,23	26,70	27,60
					P6	09:56	09:59	21,70	20,30	8,24	8,20	27,40	27,60
					P7	09:36	09:40	21,50	21,10	8,32	8,18	27,40	27,60
					P8	09:04	09:08	21,10	19,80	8,30	8,19	27,20	27,80
					P9	07:54	08:02	20,50	19,40	7,86	7,73	25,00	26,80

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo (continuação)

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
18	25.10 2017	NU	18 / 30 (93)	1.0 / 0.6	P1	08:20	08:22	21,50	21,00	7,89	8,02	25,60	27,30
					P2	08:08	08:11	21,00	20,30	7,84	8,06	26,80	27,70
					P3	07:45	07:49	20,90	20,80	7,65	7,85	21,10	23,70
					P4	07:28	07:30	21,50	20,60	8,13	8,10	27,00	27,20
					P5	07:18	07:22	21,00	21,10	8,15	8,04	27,30	27,50
					P6	09:45	09:48	21,00	20,90	8,13	8,10	27,60	27,70
					P7	09:30	09:32	21,70	21,10	8,16	8,15	27,10	27,50
					P8	09:00	09:06	21,60	20,50	8,05	8,10	27,10	27,70
					P9	07:55	07:57	20,80	20,30	7,84	8,00	25,60	27,20
19	28.11 2017	NU	19 / 26 (98)	0.3 / 0.8	P1	07:52	07:55	23,30	22,40	8,19	8,09	25,60	26,60
					P2	07:41	07:45	22,70	22,50	8,12	8,14	26,10	26,40
					P3	07:08	07:16	22,90	22,80	7,85	8,05	23,70	25,60
					P4	06:46	06:53	23,40	23,20	8,27	8,26	24,70	25,70
					P5	06:35	06:39	23,30	21,90	8,29	8,14	25,50	26,90
					P6	09:31	09:33	23,20	21,30	8,31	8,08	25,80	27,50
					P7	09:10	09:13	23,40	21,70	8,33	8,07	25,50	27,10
					P8	08:32	08:37	23,80	23,00	8,36	8,17	25,40	26,10
					P9	07:22	07:31	22,50	22,20	7,76	8,01	23,80	26,40
20	20.12 2017	NU	21 / 36 (81)	1.2 / 0.4	P1	07:40	08:48	24,20	22,10	8,40	8,48	25,30	26,90
					P2	08:28	08:31	22,40	21,00	8,04	7,93	26,80	27,30
					P3	07:49	07:58	23,90	23,40	7,98	7,85	23,70	23,60
					P4	07:31	07:33	23,20	22,00	8,19	8,08	26,30	26,90
					P5	07:18	07:24	24,00	22,50	8,24	8,11	26,10	27,00
					P6	10:13	10:16	26,90	27,10	8,29	8,13	24,40	24,00
					P7	09:57	10:00	26,20	26,30	8,24	8,24	24,40	24,00
					P8	09:30	09:32	23,50	21,00	8,14	7,97	26,30	27,50
					P9	08:04	08:17	21,30	18,40	8,23	7,46	25,70	27,72

APÊNDICE A - Padrões de temperatura, pH e salinidade encontrados no monitoramento do local de estudo (continuação)

Campanha Data		Tempo		Maré	Ponto	Horário		Temperatura (°C)		pH (upH)		Salinidade	
		Cond	MI/MA (UR)			Início	Final	S	F	S	F	S	F
21	31.01 2018	NU	22 / 27 (89)	0.8 / 0.7	P1	09:17	09:27	24,20	23,20	7,82	7,87	23,50	26,30
					P2	09:00	09:08	25,20	24,30	7,84	7,88	25,40	26,40
					P3	08:15	08:27	25,60	24,90	7,47	7,18	18,40	21,80
					P4	07:55	07:58	25,00	23,90	7,84	7,88	25,40	26,50
					P5	07:43	07:47	25,00	25,00	7,81	7,89	23,80	26,00
					P6	10:59	11:02	24,10	23,40	7,33	7,33	24,00	25,80
					P7	10:40	10:44	24,20	23,50	8,02	7,93	22,00	25,70
					P8	10:08	10:14	24,30	22,40	7,93	7,90	23,00	27,10
					P9	08:34	08:48	25,50	24,60	7,78	7,86	24,80	26,40
22	28.02 2018	EN	22 / 29 (74)	0.3 / 1.0	P1	08:31	08:34	27,10	26,00	7,91	7,96	23,00	25,90
					P2	08:18	08:22	27,20	26,70	8,15	8,05	21,80	22,70
					P3	07:47	07:32	27,00	26,50	8,01	7,86	17,70	22,80
					P4	07:29	07:32	27,10	26,30	8,28	7,98	19,80	24,10
					P5	07:16	07:21	27,30	26,50	8,25	8,03	19,90	23,20
					P6	10:18	10:21	27,30	26,90	8,25	8,20	21,50	22,50
					P7	09:55	10:00	27,80	26,30	8,25	8,10	19,10	21,90
					P8	09:18	09:25	27,90	27,10	8,28	8,03	18,40	21,90
					P9	08:02	08:08	27,00	26,20	7,99	7,94	17,80	24,60

LEGENDA: Cond = Condições do tempo (PN =Parcialmente Nublado / EN = Ensolarado / NU = Nublado)

MI = Máxima / MI = Mínima / UR = Umidade Relativa

S = Superfície / F = Fundo / (*) = Dados não aferidos

FONTE: O Autor.

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (RO)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Afeganistão	Ásia	3.957	45.481	58.064	677	33	108.212	1	31,1	31,8	31,9	34,7	37,5	33,4	2	Não	1	4	1
África do Sul	África	1	0	0	0	0	1	4	65,3	65,8	66,4	66,5	66,6	66,1	3	Sim	2	9	2
Albânia	Europa	0	0	0	0	0	0	5	92,7	93,2	93,2	93,2	93,2	93,1	4	Sim	2	11	3
Alemanha	Europa	0	0	0	1	0	1	4	99,2	99,2	99,2	99,4	99,5	99,3	4	Sim	2	10	3
Angola	África	6.655	213	0	78	828	7.774	3	50,6	51,1	51,6	51,8	52,0	51,4	3	Não	1	7	2
Antigua e Barbuda	Américas	0	0	0	0	0	0	5	91,4	91,4	91,4	91,4	91,3	91,4	4	Sim	2	11	3
Arábia Saudita	Ásia	0	0	0	0	5	5	4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Sim	2	10	3
Argélia	África	0	0	0	0	0	0	5	87,2	87,4	87,6	87,6	87,6	87,5	4	Não	1	10	3
Argentina	Américas	0	0	0	0	0	0	5	95,8	96,1	96,4	96,4	96,4	96,2	4	Sim	2	11	3
Arruba	Américas	0	0	0	0	0	0	5	97,7	97,7	97,7	97,8	97,9	97,8	4	Não	1	10	3
Austrália	Oceania	3	4	2	1	3	13	4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Sim	2	10	3
Áustria	Europa	0	0	0	0	0	0	5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Não	1	10	3
Bahamas	Américas	0	0	0	0	0	0	5	92,0	92,0	92,0	92,3	92,5	92,2	4	Sim	2	11	3
Bangladesh	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	58,7	59,6	60,6	63,6	66,6	61,8	3	Não	1	9	2
Bélgica	Europa	0	0	0	0	0	0	5	99,5	99,5	99,5	99,7	99,8	99,6	4	Sim	2	11	3
Benin	África	528	832	0	761	11	2.132	3	19,0	19,6	19,7	22,6	25,5	21,3	2	Não	1	6	1
Botsuana	África	0	0	0	0	0	0	5	63,3	63,3	63,4	63,6	63,8	63,5	3	Não	1	9	2
Brasil	Américas	0	0	0	0	0	0	5	82,1	82,7	82,8	82,9	82,9	82,7	4	Sim	2	11	4
Brunei Darassalam	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	5	Não	1	11	3

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Burkina Faso	África	0	0	0	0	0	0	5	19,0	19,4	19,7	23,1	26,5	21,5	1	Não	1	7	2
Burundi	África	1.557	582	442	434	399	3.414	3	47,8	48,0	48,0	48,1	48,2	48,0	2	Não	1	6	1
Cabo Verde	África	0	0	0	0	0	0	5	70,1	72,0	72,2	72,4	72,5	71,8	3	Não	1	9	2
Camarões	África	26	3.355	124	0	0	3.505	3	45,4	45,6	45,8	45,9	46,0	45,7	2	Não	1	6	1
Camboja	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	39,0	40,8	42,4	47,5	52,5	44,4	2	Não	1	8	2
Canadá	Américas	1	4	3	1	4	13	4	99,8	99,8	99,8	99,9	99,9	99,8	4	Sim	2	10	3
Cazaquistão	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	97,5	97,5	97,5	97,8	98,0	97,7	4	Não	1	10	3
Catar	Ásia	0	0	0	0	5	5	4	98,0	98,0	98,0	98,3	98,5	98,2	4	Sim	2	10	3
Chade	África	0	0	0	0	1.266	1.266	4	12,0	12,0	12,1	15,8	19,5	14,3	1	Não	1	6	1
Chile	Américas	2	24	0	0	0	26	4	99,0	99,0	99,1	99,2	99,3	99,1	4	Não	1	9	2
China	Ásia	53	24	13	0	14	104	4	74,2	75,4	76,5	76,7	76,9	75,9	4	Não	1	9	2
Colômbia	Américas	0	0	0	0	0	0	5	80,6	81,1	81,1	81,6	82,0	81,3	4	Não	1	10	3
Comoros	África	0	0	0	0	0	0	5	35,0	35,8	35,8	37,2	38,5	36,5	2	Não	1	8	2
Congo	África	1.624	0	0	15	0	1.639	4	27,9	28,3	28,7	28,9	29,1	28,6	2	Sim	2	8	2
Costa do Marfim	África	56	235	199	0	0	490	4	22,0	22,3	22,5	28,8	35,0	26,1	2	Não	1	7	2
Croácia	Europa	0	0	0	0	0	0	5	97,1	97,1	97,0	97,4	97,8	97,3	4	Sim	2	11	3
Cuba	Américas	181	76	0	0	0	257	4	93,1	93,2	93,2	93,4	93,6	93,3	4	Não	1	9	2
Curaçao	Américas	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	5	Não	1	11	3
Dinamarca	Europa	0	0	0	1	0	1	4	99,6	99,6	99,6	99,7	99,8	99,7	4	Sim	2	10	3
Djibuti	África	0	0	0	0	0	0	5	47,3	47,4	47,4	47,7	47,9	47,5	2	Não	1	8	2

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Egito	África	0	0	0	0	0	0	5	94,7	94,7	94,7	94,9	95,0	94,8	4	Sim	2	11	3
El Salvador	Américas	0	0	0	0	0	0	5	73,4	74,2	75,0	78,5	82,0	76,6	4	Não	1	10	3
Emirados Árabes	Ásia	0	0	0	0	12	12	4	97,5	97,5	97,6	97,9	98,1	97,7	4	Sim	2	10	3
Equador	Américas	0	0	0	0	0	0	5	83,8	84,7	84,7	84,7	84,6	84,5	4	Não	1	10	3
Eritreia	África	0	0	0	0	0	0	5	15,4	15,6	15,7	15,9	16,0	15,7	1	Não	1	7	2
Espanha	Europa	0	0	2	0	0	2	4	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	4	Sim	2	10	3
EUA	Américas	14	14	4	14	11	57	4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Não	1	9	2
Etiópia	África	0	0	0	0	0	0	5	25,5	26,8	28,0	28,9	29,8	27,8	2	Não	1	8	2
Fiji	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	91,1	91,1	91,1	91,3	91,5	91,2	4	Sim	2	11	3
Filipinas	Ásia	6	4.547	0	0	134	4.687	3	72,5	73,2	73,9	74,1	74,2	73,6	3	Não	1	7	2
Finlândia	Europa	0	0	0	0	0	0	5	97,6	97,6	97,6	97,7	97,8	97,7	4	Sim	2	11	3
França	Europa	0	0	2	0	0	2	4	98,7	98,7	98,7	99,0	99,2	98,9	4	Sim	2	10	3
Gabão	África	0	0	0	0	0	0	5	41,6	41,8	41,9	42,1	42,2	41,9	2	Não	1	8	2
Gâmbia	África	0	0	0	0	0	0	5	58,8	58,8	58,9	59,6	60,2	59,3	3	Não	1	9	2
Gana	África	50	28.944	692	175	0	29.861	2	14,7	14,8	14,9	15,2	15,5	15,0	1	Sim	2	5	1
Georgia	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	87,5	86,9	86,3	86,7	87,1	86,9	4	Sim	2	11	3
Gibraltar	Europa	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	5	Não	1	11	3
Grécia	Europa	0	0	0	0	0	0	5	99,0	99,0	99,0	99,1	99,2	99,1	4	Sim	2	11	3
Guatemala	Américas	0	0	0	0	0	0	5	63,6	63,7	63,9	64,5	65,0	64,1	3	Não	1	9	2
Guina Francesa	Américas	0	0	0	0	0	0	5	83,6	83,6	83,7	83,9	84,0	83,8	4	Não	1	10	3

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Guiné	África	319	1	0	0	0	320	4	19,4	20,0	20,1	22,3	24,5	21,3	1	Não	1	6	1
Guiné Bissau	África	969	11	0	0	0	980	4	20,5	20,7	20,8	22,4	24,0	21,7	1	Não	1	6	1
Haiti	Américas	58.809	27.753	36.045	41.421	13.681	177.709	1	27,1	27,4	27,6	27,7	27,8	27,5	2	Não	1	4	1
Holanda	Europa	0	0	0	1	0	1	4	97,8	97,7	97,7	98,0	98,3	97,9	4	Não	1	9	2
Honduras	Américas	0	0	0	0	0	0	5	81,3	82,6	82,6	82,8	83,0	82,5	4	Sim	2	11	3
Iêmen	Ásia	0	0	0	15.751	1.032.481	1.048.232	1	53,1	53,5	53,7	53,9	60,0	54,8	3	Não	1	5	1
Ilhas Cook	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	79,7	79,7	79,7	80,5	81,2	80,2	4	Sim	2	11	3
Ilhas Fiji	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	79,7	79,7	79,7	80,5	81,2	80,2	4	Não	1	10	3
Ilhas Malvinas	Américas	0	0	0	0	0	0	5	95,6	95,5	95,6	96,3	97,0	96,0	4	Sim	2	11	3
Ilhas Marshalls	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	76,7	76,8	76,9	77,5	78,0	77,2	4	Sim	2	11	3
Ilhas virgens	Américas	0	0	0	0	0	0	5	97,5	97,5	97,5	97,7	97,8	97,6	4	Não	1	10	3
Índia	Ásia	6.008	4.031	889	841	385	12.154	3	38,5	39,5	39,6	40,4	41,1	39,8	2	Não	1	6	1
Indonésia	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	59,7	60,6	60,8	63,2	65,5	62,0	3	Sim	2	10	3
Inglaterra	Europa	6	14	15	19	0	54	4	99,2	99,2	99,2	99,4	99,6	99,3	4	Sim	2	10	3
Irã	Ásia	256	0	86	0	634	976	4	89,9	89,9	90,0	90,4	90,8	90,2	4	Sim	2	10	3
Iraque	Ásia	1	0	4.965	3	0	4.969	3	85,6	85,6	85,6	88,6	91,5	87,4	4	Não	1	8	2
Irlanda	Europa	0	0	0	0	0	0	5	90,4	90,5	90,5	91,1	91,6	90,8	4	Não	1	10	3
Israel	Ásia	1	0	0	0	0	1	4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Não	1	9	2
Itália	Europa	1	0	0	0	0	1	4	99,5	99,5	99,5	99,7	99,9	99,6	4	Não	1	9	2
Jamaica	Américas	0	0	0	0	0	0	5	81,8	81,8	81,8	83,9	86,0	83,1	4	Sim	2	11	3

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Japão	Ásia	8	10	7	0	7	32	4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Sim	2	10	3
Jordânia	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	98,6	98,6	98,6	99,3	100,0	99,0	4	Sim	2	11	3
Kenia	África	0	35	13.291	5.866	4.288	23.480	2	29,9	30,1	30,1	28,8	27,5	29,3	2	Sim	2	6	1
Kiribati	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	37,9	37,9	37,9	38,3	38,6	38,1	2	Sim	2	9	2
Kuait	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Não	1	10	3
Libano	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	80,7	80,7	80,7	81,0	81,3	80,9	4	Sim	2	11	3
Libéria	África	92	44	0	0	0	136	4	16,4	16,6	16,9	17,1	17,2	16,8	1	Sim	2	7	2
Lituânia	Europa	0	0	0	0	0	0	5	91,6	92,0	92,4	92,6	92,8	92,3	4	Sim	2	11	3
Malásia	Ásia	171	189	244	0	3	607	4	96,0	96,0	96,0	96,6	97,1	96,3	4	Sim	2	10	3
Malavi	África	0	0	693	1.792	344	2.829	3	40,1	40,6	41,0	42,3	43,5	41,5	2	Não	1	6	1
Maldivas	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	98,0	98,0	97,9	88,1	78,3	92,1	4	Não	1	10	3
Mali	África	23	0	0	0	0	23	4	23,8	24,2	24,7	27,4	30,0	26,0	2	Não	1	7	2
Malta	Europa	0	0	0	0	0	0	5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Sim	2	11	3
Madagáscar	África	0	0	0	0	0	0	5	11,7	11,9	12,0	12,1	12,2	12,0	1	Sim	2	8	2
Marrocos	África	0	0	0	0	0	0	5	76,5	76,6	76,7	77,0	77,3	76,8	4	Sim	2	11	3
Martinica	Américas	0	0	0	0	0	0	5	96,4	96,4	96,4	97,0	97,6	96,8	4	Não	1	10	3
Mauritânia	África	0	0	0	0	0	0	5	39,5	39,7	40,0	39,8	39,5	39,7	2	Não	1	8	2
México	Américas	187	14	1	0	0	202	4	84,4	85,1	85,2	86,2	87,2	85,6	4	Sim	2	10	3
Mianmar	Ásia	33	400	103	782	0	1.318	4	79,5	79,5	79,6	79,9	80,2	79,7	4	Não	1	9	2
Micronésia	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	57,0	57,1	57,1	58,6	60,0	58,0	3	Não	1	9	2

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Moçambique	África	1.869	480	8.739	883	5.892	17.863	2	20,3	20,4	20,5	31,5	42,5	27,0	2	Não	1	5	1
Mongólia	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	58,5	59,1	59,7	61,1	62,5	60,2	3	Sim	2	10	3
Montenegro	Europa	0	0	0	0	0	0	5	95,1	95,6	95,9	94,7	93,5	95,0	4	Sim	2	11	3
Namíbia	África	3	485	0	0	0	488	4	33,6	34,0	34,4	34,7	34,9	34,3	2	Não	1	7	2
Nepal	Ásia	0	993	80	169	7	1.249	4	42,6	44,2	45,8	48,4	51,0	46,4	2	Não	1	7	2
Nicaragua	Américas	0	0	0	0	0	0	5	67,8	67,8	67,9	68,0	68,1	67,9	3	Não	1	9	2
Níger	África	585	2.059	51	38	0	2.733	3	10,5	10,8	10,9	14,7	18,5	13,1	1	Não	1	5	1
Nigéria	África	6.600	35.996	5.290	768	12.174	60.828	2	29,6	29,3	29,0	31,0	33,0	30,4	2	Sim	2	6	1
Niue	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	65,6	65,6	65,6	65,9	66,1	65,8	3	Sim	2	10	3
Noruega	Europa	0	0	1	0	0	1	4	98,1	98,1	98,1	98,7	99,3	98,5	4	Sim	2	10	3
Nova Zelândia	Oceânia	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	5	Sim	2	12	3
Oman	África	0	0	1	0	0	1	4	96,7	96,7	96,7	96,8	96,9	96,8	4	Não	1	9	2
Palau	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Sim	2	11	3
Panamá	Américas	0	0	0	0	0	0	5	73,9	74,5	75,0	75,5	76,0	75,0	3	Sim	2	10	3
Papua Nova Guiné	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	18,9	18,9	18,9	19,6	20,2	19,3	1	Não	1	7	2
Paquistão	Ásia	1.069	1.218	0	0	0	2.287	3	60,0	61,8	63,5	67,8	72,0	65,0	3	Não	1	7	2
Paraguai	Américas	0	0	0	0	0	0	5	86,8	87,8	88,6	88,9	89,2	88,3	4	Não	1	10	3
Peru	Américas	0	0	0	0	0	0	5	94,1	94,5	94,9	95,3	95,7	94,9	4	Sim	2	11	3
Porto Rico	Américas	0	0	0	0	0	0	5	99,3	99,3	99,3	99,5	99,7	99,4	4	Não	1	10	3
Portugal	Europa	0	0	0	0	0	0	5	99,6	99,7	99,7	99,8	99,9	99,7	4	Sim	2	11	3

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Rep. Central da África	África	0	0	0	0	0	0	5	21,6	21,7	21,8	24,6	27,3	23,4	1	Não	1	7	2
República da Coreia	Ásia	3	0	0	0	5	8	4	14,8	14,9	15,0	15,4	15,7	15,2	1	Sim	2	7	2
Rep. Dem. do Congo	África	26.944	22.230	19.182	28.093	56.190	152.639	1	27,9	28,3	28,7	29,0	29,2	28,6	2	Não	1	4	1
Rep. Dem. do Laos	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	83,3	83,6	84,0	84,2	84,3	83,9	4	Não	1	10	3
Rep Dominicana	Américas	1.954	603	546	1.159	122	4.384	3	83,3	83,6	84,0	84,3	84,6	84,0	4	Não	1	8	2
República Thecka	Europa	0	0	0	0	0	0	5	99,1	99,1	99,1	99,3	99,5	99,2	4	Não	1	10	3
Ruanda	África	0	0	0	355	0	355	4	60,0	60,8	61,6	61,8	61,9	61,2	3	Não	1	8	2
Rússia	Europa	0	2	0	0	0	2	4	72,2	72,2	72,2	72,8	73,3	72,5	3	Não	1	8	2
Saara Ocidental	África	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	1	Sim	2	8	2
Santa Lúcia	Américas	0	0	0	0	0	0	5	90,0	90,5	90,5	90,5	90,5	90,4	4	Não	1	10	3
São Tomé e Príncipe	África	0	0	0	0	0	0	5	34,5	34,6	34,7	38,1	41,5	36,7	2	Sim	2	9	2
Seichelles	África	0	0	0	0	0	0	5	98,4	98,4	98,4	98,8	99,2	98,6	4	Não	1	10	3
Senegal	África	0	0	0	0	0	0	5	46,6	47,1	47,6	47,8	48,0	47,4	2	Sim	2	9	2
Serra Leoa	África	377	0	0	0	0	377	4	13,0	13,1	13,3	15,4	17,5	14,5	1	Não	1	6	1
Singapura	Ásia	2	4	0	0	3	9	4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	4	Sim	2	10	3
Síria	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	5	Sim	2	12	3
Somália	África	6.864	28.020	7.536	15.619	75.414	133.453	1	23,8	23,9	24,1	24,1	24,2	24,0	1	Sim	2	4	1
Sri Lanka	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	94,8	95,1	95,1	95,3	95,5	95,2	4	Não	1	10	3
Suazilândia	África	0	0	0	0	0	0	5	57,5	57,5	57,5	57,9	58,2	57,7	3	Não	1	9	2
Sudão	África	0	0	0	0	0	0	5	23,6	23,6	23,9	29,0	34,0	26,8	2	Não	1	8	2

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

País	Continente	IIC							ISB							IPC		RO	
		2013	2014	2015	2016	2017	Tot	Rsc	2013	2014	2015	2016	2017	Md	Rsc	St	Rsc	RO	Rsc
Sudão do Sul	África	0	6.421	1.818	4.295	16.088	28.622	2	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	1	Não	1	4	1
Suécia	Europa	0	0	1	0	0	1	4	99,3	99,3	99,3	99,6	99,8	99,5	4	Não	1	9	2
Suíça	Europa	0	0	2	0	0	2	4	99,9	99,9	99,9	100,0	100,0	99,9	4	Sim	2	10	3
Suriname	Américas	0	0	0	0	0	0	5	79,2	79,2	79,2	79,9	80,5	79,6	4	Sim	2	11	3
Tailândia	Ásia	8	12	125	52	8	205	4	93,1	93,0	93,0	95,0	97,0	94,2	4	Não	1	9	2
Tanzânia	África	270	0	11.563	11.360	4.895	28.088	2	14,5	15,0	15,6	23,8	32,0	20,2	1	Não	1	4	1
Togo	África	166	262	35	0	0	463	4	16,1	16,4	16,5	16,7	16,8	16,5	1	Não	1	6	1
Tonga	Oceânia	0	0	0	0	0	0	5	91,1	91,0	91,0	91,4	91,8	91,3	4	Não	1	10	3
Trinidad e Tobago	Américas	0	0	0	0	0	0	5	91,5	91,5	91,5	91,6	91,7	91,6	4	Sim	2	11	3
Tunísia	África	0	0	0	0	0	0	5	90,9	91,6	91,6	94,3	97,0	93,1	4	Não	1	10	3
Turquemenistão	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	5	Não	1	11	3
Turquia	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	*	*	*	*	*	0,0	5	Sim	2	12	3
Tuvalu	Oceania	0	0	0	0	0	0	5	83,3	83,4	83,5	83,5	8,4	68,4	3	Sim	2	10	3
Ucrania	Europa	0	0	0	0	0	0	5	95,8	95,9	95,9	96,2	96,5	96,1	4	Não	1	10	3
Uganda	África	748	309	1.461	516	252	3.286	3	18,8	19,0	19,1	19,8	20,5	19,4	1	Não	1	5	1
Uruguai	Américas	0	0	0	0	0	0	5	96,1	96,3	96,4	96,7	96,9	96,5	4	Não	1	10	3
Venezuela	Américas	4	0	0	0	0	4	4	94,4	94,4	94,4	94,6	94,8	94,5	4	Não	1	9	2
Vietnã	Ásia	0	0	0	0	0	0	5	74,7	76,3	78,0	78,5	79,0	77,3	4	Não	1	10	3
Zâmbia	África	0	0	0	0	1.794	1.794	3	43,5	43,7	43,9	44,2	44,4	43,9	2	Não	1	6	1
Zimbábue	África	0	0	60	10	0	70	4	37,2	37,0	36,8	37,2	37,5	37,1	2	Não	1	7	2

APÊNDICE B – Valores dos Indicadores constituintes do Risco Embarcação (continuação)

LEGENDA: IIC = Indicador de Incidência de Cólera
ISB = Indicador de Acesso ao Saneamento Básico
IPC = Indicador País Contratante
Tot = Total
Med = Média
Rsc = Risco
St = Situação
Qtd = Quantidade
RO = Risco Origem
♦ Risco 1 / ♦ Risco 2 / ♦ Risco 3 / ♦ Risco 4

FONTE: Dados extraídos de WHO, 2017; World Bank, 2017.