

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Detecção molecular e resistência a antimicrobianos no
grupo *V. fluvialis* – *V. furnissii*

Cíntia Carolina da Silva Mayer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública da Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em Saúde
Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. Glavur Rogério Matté

SÃO PAULO
2010

Detecção molecular e resistência a antimicrobianos no
grupo *V. fluvialis* – *V. furnissii*

Cíntia Carolina da Silva Mayer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Glavur Rogério Matté

SÃO PAULO
2010

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

ERRATA

Página 48, Linha 6, onde se lê: 30 ciclos, leia-se: 35 ciclos.

Página 48, Linha 7, onde se lê: 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C, leia-se: 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C.

Página 48, Linha 9, onde se lê: por 10 minutos, leia-se: por 5 minutos.

Página 53, Linha 1, onde se lê: 45,45% foram confirmadas, leia-se: 42,68% foram detectadas.

Página 53, Linha 2, onde se lê: 48,05% como *V. furnissii*, 11,7% não puderam ser confirmadas, leia-se: 43,90% como *V. furnissii*, 10,97% não puderam ser detectadas.

Página 58, Linhas 9 a 37 do Quadro 3 (FSP 287/08 a FSP 50/08), onde se lê: Positivo, leia-se: Positivo para *V. furnissii*.

Página 59, Linhas 1 a 7 do Quadro 3 (FSP 58/08 a FSP 294/08), onde se lê: Positivo, leia-se: Positivo para *V. furnissii*.

Página 63, onde se lê: FSP 6/08, retire-se: FSP 6/08, pois pertence ao Quadro 4.

Dedico esta dissertação

Aos meus Pais

Que sempre me ensinaram a recorrer às minhas raízes para enfrentar todas as adversidades da vida, e lutaram junto comigo para que eu alcançasse todos os meus objetivos.

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.

Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do teu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque Tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.”

-Salmo 23

RESUMO

Introdução - *Vibrio fluvialis* é um microorganismo que provoca a gastroenterite muito semelhante à cólera, mas também há relatos de casos extra-intestinais como sepse, ferida, peritonite e celulite hemorrágica e encefalite. Acredita-se que a infecção por esse microorganismo esteja vinculada ao consumo de peixes crus ou mal cozidos contaminados e / ou frutos do mar. A identificação dessa bactéria por métodos fenotípicos continua a ser um problema devido à sua grande semelhança com *Aeromonas hydrophila* e *V.furnissii*; por isso, a utilização de uma ferramenta de diferenciação entre essas espécies é importante. Nas últimas décadas, o aumento da resistência aos antimicrobianos tem sido um fator preocupante, porque ela interfere na escolha dos medicamentos para o tratamento eficaz e há uma necessidade de rápida produção de novos antibióticos. Ambientes costeiros e estuários estão em perigo de serem contaminados por esgoto, que pode conter drogas que agem de forma seletiva, permitindo o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Vários estudos demonstraram que estirpes clínicas de *V. fluvialis* são resistentes a múltiplas drogas. **Objetivos** - Desenvolver um marcador molecular baseado no 16S rDNA capaz de detectar o grupo *V. fluvialis-V. furnissii*, e avaliar a susceptibilidade a antibióticos destas espécies, principalmente a partir de amostras ambientais. **Métodos** - Após a elaboração dos iniciadores a partir do alinhamento das espécies do gênero *Vibrio*, foram utilizadas cepas identificadas fenotipicamente como *V. fluvialis* e de *V. furnissii* para a sua detecção molecular. O perfil de susceptibilidade a antibióticos pelo método da disco-difusão foi realizada, assim como a investigação molecular da presença do elemento SXT e de seus genes de resistência a antimicrobianos. **Resultados:** Com a utilização dos iniciadores desenvolvidos foi

possível confirmar corretamente as espécies. Observou-se alta porcentagem de resistência a ampicilina e cefalotina, sendo que 65,9% de *V. fluvialis* e 43,24% de *V. furnissi* apresentaram resistência a pelo menos dois dos antibióticos utilizados. Somente em uma cepa de *V. fluvialis* detectou-se a presença de SXT e houve uma banda desconhecida de alto peso molecular quando da pesquisa do gene *sulIII*.

Conclusões: O método molecular mostrou ser um importante instrumento para se detectar espécies altamente relacionadas. Foram detectadas cepas resistentes a múltiplos antibióticos, indicando que o meio ambiente é um provável reservatório de genes de resistência; porém necessita-se de futuras investigações moleculares para se determinar o papel destes e sua possível associação com elementos genéticos. A detecção do elemento SXT sem a presença dos seus genes de resistência conhecidos atualmente reforça a idéia da extensão de seu papel adaptativo, além de ser o primeiro relato de sua existência na América do Sul.

Palavras-Chave: *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, resistência, antibiótico, SXT, ICE.

ABSTRACT

Introduction - *Vibrio fluvialis* is a microorganism that causes gastroenteritis very similar to cholera, however there are also reports of extraintestinal cases as sepsis, skin wounds, peritonitis and hemorrhagic cellulitis and cerebritis. It is believed that infection by this organism is linked to the consumption of raw or undercooked contaminated fish and / or seafood. Identification of this bacteria by phenotypic methods remains a problem due to its great similarity with *Aeromonas hydrophila* and *V.furnissii*, therefore the use of a tool to differentiate these species is important. In recent decades, increasing antimicrobial resistance has been a concerning factor because it interferes in the choice of drugs for effective treatment and there is a need for rapid production of new antibiotics. Coastal and estuarine environments are in danger of being contaminated by sewage, which may contain drugs that will act selectively, allowing the development of antimicrobial resistance. Several studies have demonstrated that clinical strains of *V. fluvialis* are resistant to multiple drugs.

Objectives - To develop a 16S rDNA - molecular marker able to detect the group *V. fluvialis-V.furnissii*, and to evaluate the antibiotic susceptibility of this species mainly from environmental samples. **Methods** - After the development of primers from alignment of the genus *Vibrio* strains phenotypically identified as *V. fluvialis* and *V. furnissii* were used for their molecular identification. The profile of antibiotic susceptibility was performed by the disk diffusion method, and the molecular investigation of the presence of the SXT element and their antimicrobial resistance genes. **Results** - The primers developed were able to confirm correctly the species. A high percentage of resistance to ampicillin and cephalothin was observed, *V. fluvialis* and *V. furnissii* showed resistance to at least two of the antibiotics used, 65.9% and

43.24% respectively. Only in one strain of *V. fluvialis* we detected presence of SXT and there was an unknown band of high molecular weight when we investigated gene *sulIII*. **Conclusions** - Molecular identification has proved to be an important tool for differentiating highly related species. Strains resistant to multiple antibiotics were detected, indicating that the environment is likely a reservoir for resistance genes, but it is needed further molecular investigations to determine their role and their possible association with genetic elements. Detection of the SXT element without the presence of its known resistance genes reinforces the idea of the extent of its adaptive role, and this is the first report of its existence in South America.

Keywords: *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, resistance, antibiotic, SXT, ICE.

SIGLAS UTILIZADAS

AMP - Ampicilina

CFL – Cefalotina

CFO – Cefoxitina

CIP - Ciprofloxacina

CLO – Cloranfenicol

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CONSTIN - *Conjugative, Self-transmissible, Integrating element*

CPM – Cefepima

CTX - Cefotaxima

EST – Estreptomicina

GEN – Gentamicina

I – Intermediária

ICE - *Integrating Conjugative Element*

MER – Meropenem

MLSA - *Multilocus Sequence Analysis*

MRI - *Multiple Resistance Integron*

NAL - Ácido Nalidíxico

ORF - *Open Reading Frame*

PABA - ácido-*p*-aminobenzóico

PCR – Polymerase Chain Reaction

QAC - *Quaternary Ammonium Compound*

QRDRs – *Quinolone Region-Determining Regions*

R – Resistente

S – Sensível

SI -Super-Integron

SUT - Sulfametoxazol-Trimetoprim

TCBS - *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose*

TET – Tetraciclina

VCRs - *Vibrio cholerae repeated sequences*

VFH - *Vibrio fluvialis hemolisin*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>Vibrio</i>	17
1.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	18
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	21
1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	26
1.5 <i>Vibrio</i> spp E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	31
1.6 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	38
2 MÉTODO	43
2.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	43
2.2 TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Vibrio fluvialis</i>	43
2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	44
2.3.1 Extração do DNA Genômico	44
2.3.2 Construção do Iniciador para Detecção	46
2.3.3 Amplificação dos Fragmentos Correspondentes ao 16S rDNA de <i>Vibrio fluvialis</i> Utilizando Iniciadores Específicos	46
2.3.4 Amplificação de Genes Responsáveis pela Resistência a Antibióticos em Isolados de <i>Vibrio fluvialis</i>	47
2.3.5 Visualização e Análise dos Produtos da PCR	49
2.3.6 Sequenciamento do Fragmento 16S rRNA	49
2.4 ANTIBIOGRAMA	50
3 RESULTADOS	51
3.1 IDENTIFICAÇÃO DE <i>Vibrio fluvialis</i> UTILIZANDO PRIMERS ESPECÍFICOS	51
3.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA	59
3.3 DETECÇÃO DO SXT E SEUS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	65
4 DISCUSSÃO	67

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE	67
4.2 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	71
4.3 PRESENÇA DE SXT E SEUS GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	73
5 CONCLUSÕES	76
6 REFERÊNCIAS	77

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Iniciadores para genes responsáveis por resistência aos antibióticos utilizados para o estudo de *Vibrio fluvialis* 45
- Quadro 2** – Iniciadores utilizados para identificação e diferenciação de *Vibrio fluvialis* das demais espécies de *Vibrio* 49
- Quadro 3** – Identificação fenotípica e molecular com origem e ano de isolamento de *Vibrio fluvialis* e *V.furnissii* provenientes de diferentes fontes 54
- Quadro 4** – Perfil de resistência a antibióticos observados no teste de disco difusão para os isolados de *V. fluvialis* 58
- Quadro 5** – Perfil de resistência a antibióticos observados no teste de disco difusão para os isolados de *V. furnissii* 60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Alinhamento das sequências de 16S rDNA das espécies de *Vibrio*. Os iniciadores VFLU e VFUR específicos para identificação de *V. fluvialis* e *V. furnissii*, respectivamente, também estão presentes. 52
- Figura 2** – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose. Iniciadores VFUR -F e MH2 – R. **B)** Iniciadores VFLU - F e MH2 - R. **Para A e B:** Coluna 1: *V. fluvialis*. Coluna 2: *V. furnissii*. Colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8: *V. fluvialis* identificado fenotipicamente. Coluna 9: *A. hydrophila*. Coluna 10: Branco. M: Marcador de peso molecular. 50
- Figura 3** – Árvore filogenética baseada no método UPGMA utilizando as sequências do 16S rRNA das cepas-tipo patogênicas de *Vibrio* e das oriundas do banco de dados da Faculdade de Saúde Pública da USP. Estimativa de distâncias foi obtida pelo modelo de Jukes e Cantor. Como *outgroup* foi utilizada a sequência de *Escherichia coli* HM 194886. 53
- Figura 4** – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose. **A)** Iniciadores para gene *int SXT*. **B)** Iniciadores para o sítio *attP*. **Para A e B:** Coluna 1: *V. cholerae* O139 (Controle positivo SXT). Coluna 2: *V. fluvialis* (FSP 561/08). Coluna 3: Controle *V. fluvialis* (FSP 29/08). Coluna 4: Branco. M: Marcador de peso molecular. 62
- Figura 5** – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose. Iniciadores para gene *sulII* do SXT. Coluna 1: *V. cholerae* O139 (Controle positivo SXT). Coluna 2: *V. fluvialis* (FSP 561/08). Coluna 3: Branco. M: Marcador de peso

molecular.

63

Figura 6 – Árvore filogenética baseada no método UPGMA utilizando as sequências do gene *int* relacionadas aos ICes já descritos e da oriunda do banco de dados da Faculdade de Saúde Pública da USP. Estimativa de distâncias foi obtida pelo modelo de Jukes e Cantor.

64

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO *Vibrio*

Microrganismos pertencentes ao gênero *Vibrio* são bacilos Gram-negativos, retos ou curvos, não formadores de endósporos ou microcistos, que possuem o metabolismo anaeróbico facultativo, são quimiorganotróficos e fermentadores de D-glicose podendo haver produção de gás, sendo que a maioria é oxidase positiva, reduz nitrato a nitrito e é sensível ao agente quimiostático O/129 (FARMER III e JANDA, 2005). Sua motilidade se dá por meio de um flagelo polar quando estão em meio líquido, ou lateral quando em meio sólido (FARMER III e JANDA, 2005).

Vibrios são bactérias de vida livre que estão presentes nos ambientes aquáticos (FARMER III e JANDA, 2005), não estando necessariamente associados à contaminação fecal (MATTE *et al*, 1994). São comuns em habitats marinhos e estuarinos permanecendo tanto no sedimento como na coluna d'água (DUMONTET *et al*, 2000), ou associados com plantas e animais aquáticos, vivendo como simbiontes ou patógenos (NISHIGUCHI e NAIR, 2003). Preferem pH alcalino (de 7 a 8) e são facilmente mortos por dessecação (FARMER III e JANDA, 2005). Sua distribuição e ocorrência dependem da quantidade de sódio, de nutrientes e da temperatura (THOMPSON *et al*, 2004; FARMER III e JANDA, 2005; HAZEN *et al*, 2007).

A salinidade, com exceção para *V. cholerae* e *V. mimicus*, é um dos fatores que influenciam no crescimento dessas bactérias, pois crescem pouco ou nada na ausência de NaCl (THOMPSON *et al*, 2004). A quantidade necessária desse composto para cada espécie é variável, mas a maioria tem um bom crescimento em

meios que contêm 0,5% a 2% de sal (FARMER III e JANDA, 2005). Em escassez nutricional, espécies de *Vibrio* podem entrar num estado viável mas não cultivável (VBNC, do inglês *viable but not culturable*), o que significa que são metabolicamente ativas porém não formam colônias (HUQ *et al*, 2006) e, sob condições favoráveis, podem reverter essa condição vegetativa de crescimento e multiplicação (OLIVER, 1995).

A maioria dos v́brios cresce entre 18°C e 22°C (FARMER III e JANDA, 2005). Quando em temperaturas baixas são encontrados em sedimentos; nos meses quentes há aumento considerável de sua concentração na coluna d'água, principalmente em moluscos filtradores e em outros animais marinhos, e estão em quantidade suficiente para causar infecção no homem (MIRA-GUTIERREZ e GARCÍA-MATOS, 1997). Espécies de interesse clínico desse gênero são menos freqüentemente isolados quando a temperatura dos meios aquáticos está menor que 10°C e maiores que 30°C (HERVIO-HEATH *et al*, 2002).

Muitas espécies de *Vibrio* possuem dois cromossomos circulares: o chamado cromossomo grande, cujo tamanho varia de 3,0 a 3,3 Mb; e o outro designado pequeno com 0,8 a 2,4 Mb (HEIDELBERG *et al*, 2000; OKADA *et al*, 2005). O cromossomo maior estaria envolvido nas funções essenciais da célula e na patogenicidade, enquanto que o cromossomo menor com a adaptação ao meio ambiente (HEIDELBERG *et al*, 2000; OKADA *et al*, 2005; DRYSELIUS *et al*, 2007).

1.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

O isolamento e a identificação tradicionais das espécies do gênero *Vibrio* geralmente envolve pré-enriquecimento seletivo das amostras, plaqueamento em meio seletivo sólido e caracterização bioquímica e sorológica; esta última muito utilizada para diferenciar sorogrupos de *V. cholerae* (FARMER III e JANDA, 2005). Essas técnicas microbiológicas, apesar de serem rotineiramente utilizadas para distinção fenotípica, é um processo trabalhoso que demanda grande quantidade de tempo, além de ser de alto custo (NANDI *et al*, 2000). Adicionalmente a essas propriedades, organismos do gênero *Vibrio* isolados do meio ambiente têm maior variabilidade nos testes bioquímicos e apresentam maior dificuldade na identificação da espécie (MAUGERI *et al*, 2000). Mesmo os testes automatizados podem fornecer resultados controversos (LEE *et al*, 2008). O API 20E, um método semi-automatizado, pode identificar *V. fluvialis* como *Aeromonas hydrophila*, e nesse caso solicita-se a realização de testes adicionais para a correta identificação (HUQ *et al*, 1980; LEE *et al*, 2008); ou o equipamento ser incapaz de efetuar a identificação (O'HARA *et al*, 2003). Outra característica importante é a alta similaridade entre *V. furnissi* e *V. fluvialis*, sendo que a diferenciação ocorre especialmente pela produção de gás do primeiro durante a fermentação de glicose e, por isso, também neste caso há necessidade de se combinar outros testes para a confirmação da espécie (LEE *et al*, 1981; LEE *et al*, 2008). MACIÁN *et al* (2004) descreveram o *V. ponticus*, uma nova espécie que apresenta grande similaridade com *V. fluvialis* e *V. furnisii* de acordo com análise filogênica do 16S rRNA. Porém, sua discriminação fenotípica é possível por algumas características com resultado negativo, como: arginina, hidrólise de

gelatina e L-arabinose (MACIÁN *et al*, 2004), os quais são testes amplamente utilizados na rotina microbiológica.

A diferenciação de espécies é de grande importância clínica e epidemiológica por causa da variação interespecífica como a capacidade invasora, a produção de toxinas, os traços de susceptibilidade aos antibióticos e a distribuição geográfica de cada microrganismo (CABRERA *et al*, 2007).

Os métodos moleculares provocaram uma mudança considerável na detecção e identificação de bactérias porque são ferramentas mais sensíveis e específicas (TANTILLO *et al*, 2004), um exemplo é a PCR (reação em cadeia da polimerase). Essa técnica é uma replicação *in vitro*, na qual ocorre a amplificação de seqüências específicas de DNA de forma exponencial, permitindo sua detecção e visualização como uma banda discreta (LODISH *et al*, 2002a).

Para a identificação de *V. fluvialis* já foram estudados marcadores utilizando-se o gene *toxR* (CHAKRABORTY *et al*, 2006), os espaços intergênicos (IGs) do *operon* do ribossomo (LEE *et al*, 2002), e a seqüência parcial do gene *hsp60* (KWOK *et al*, 2002). Porém a ferramenta mais confiável para estudos taxonômicos da família *Vibrionaceae* é a análise do seqüenciamento a partir do 16S (THOMPSON *et al*, 2004), que corresponde a uma fração do ribossomo dos microrganismos (AMANN *et al*, 1995; RODICIO e MENDOZA, 2004).

O ribossomo bacteriano tem um coeficiente de sedimentação de 70S, e é composto pelas subunidades 50S e 30S (RODICIO e MENDOZA, 2004). A subunidade maior contém os RNAs 5S e 23S, enquanto que a menor possui o 16S, também chamado de 16S rRNA (RODICIO e MENDOZA, 2004).

A maioria dos procariotos possui genes organizados em *operons*, os quais mudam em número e tamanho dependendo das necessidades da célula (GARCÍA-MARTINEZ *et al*, 1999). O arranjo dos genes das subunidades que compõem o RNA ribossômico comumente segue a seguinte ordem: promotor, 16S (*rrs*), 23S (*rrl*), 5S (*rrf*); no intervalo do 16S e 23S, e entre 23S e 5S há espaços com presença de unidades funcionais, como genes para o RNA transportador (GARCÍA-MARTINEZ *et al*, 1999; RODICIO e MENDOZA, 2004).

Algumas das vantagens apresentadas pelo 16S rRNA em relação aos outros marcadores que o fazem ser amplamente utilizado para se estabelecer a identidade de microrganismos são: conter regiões altamente conservadas intercaladas com outras partes variáveis; possuir um vasto banco de dados disponível para a realização de comparações e, assim, tornar possível inferir relações com os grupos já conhecidos (AMANN *et al*, 1995).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Os microrganismos patogênicos possuem alto poder adaptativo, o que permite sua sobrevivência no organismo hospedeiro e, assim, são capazes de provocar infecção (FUCHS, 1998). A expressão dos fatores de virulência é regulada por determinadas condições, como o ambiente em que a bactéria se encontra e mesmo a expressão de uma proteína pode afetar o efeito de outra (SEARS e KAPER, 1996).

A adesão no epitélio do hospedeiro é importante para o estabelecimento da infecção, incluindo a causada por *Vibrio* (JANDA *et al*, 1988; CARVALHO *et al*, 1994). Após se ligarem de maneira irreversível aos receptores da célula do

hospedeiro, podem colonizar o tecido (CRAIG *et al*, 2004) e também liberar as toxinas aos seus alvos-específicos por estarem em contato íntimo com as células (FUCHS, 1998).

Após o surto de *V. fluvialis* ocorrido em Bangladesh, cujos sintomas clínicos assemelhavam-se aos causados pela cólera, passou-se a estudar quais os fatores de virulência que estariam envolvidos na sua patogenicidade.

De acordo com testes realizados *in vitro* (CARVALHO *et al*, 1994) e *in vivo* (HUQ *et al*, 1980), foi observado que *V. fluvialis* não possui a capacidade de invadir as células. Este microrganismo apresenta um padrão difuso de aderência semelhante ao da *Escherichia coli*. Além disso, diferentemente do que ocorre em *V. parahaemolyticus*, os isolados clínicos e ambientais não possuem diferenças com relação a essa característica, sendo assim não há possibilidade de se estabelecer a provável fonte das cepas (CARVALHO *et al*, 1994).

As toxinas são importantes fatores extracelulares na etiologia da diarreia (TADDEI *et al*, 2005). Dentre as espécies de *Vibrio*, a mais conhecida e bem caracterizada é a toxina colérica, que causa alteração na secreção de eletrólitos e, se não for tratada, pode levar à morte (SACK *et al*, 2004).

As toxinas entéricas foram definidas em quatro classes: 1 – enterotoxinas, que estimulam a secreção intestinal; 2 – as que alteram o citoesqueleto, pois modificam a forma da célula sem causar injúria significativa; 3 – citotoxinas, que produzem dano celular ou tecidual levando à morte; 4 – com atividade neuronal, as quais liberam um ou mais neurotransmissores do sistema nervoso entérico (SEARS e KAPER, 1996).

Em estudos realizados com animais, tanto o sobrenadante como as culturas totais de células produziram acúmulo de fluido (SEIDLER *et al*, 1980; HUQ *al*,

1985; RAHIM e AZIZ, 1994; KOTHARY *et al*, 2003), em contraste com a pesquisa realizada por NISHIBUCHI *et al* (1983) na qual se observou esse efeito apenas na presença da célula bacteriana. A enterotoxina termolábil de *V. fluvialis* (NISHIBUCHI e SEIDLER, 1983; HUQ *et al*, 1985) é diferente da produzida por *V. cholerae* em seu modo de ação, tipo de receptor e antigenicidade (AHSAN *et al*, 1988), o que está de acordo com o fato de *V. fluvialis* não possuir o gene responsável pela codificação da toxina colérica (NISHIBUCHI e SEIDLER, 1983; NISHIBUCHI *et al*, 1983).

A citotoxina de *V. fluvialis* foi parcialmente caracterizada, apresentando sensibilidade ao calor e a proteases, ponto isoelétrico de 4,8 e peso molecular de 12,2 KDa; e a causa da morte celular foi a interrupção de funções celulares essenciais após a internalização da toxina (WALL *et al*, 1984). Além disso, é provável que essa substância seja diferente da hemolisina e da fosfolipase produzida por esse microrganismo por estes exibirem outras características físico-químicas (WALL *et al*, 1984).

KOTHARY *et al* (2003) sugere que a hemolisina de *V. fluvialis* (VFH, *Vibrio fluvialis hemolisin*) tem um papel importante na etiologia da diarreia por ser citotóxica às células de ovário de hamster e enterotoxigênica em ratos lactentes. Ela possui várias características físico-químicas e propriedade biológicas que são similares às hemolisinas produzidas por *V. cholerae* e *V. mimicus*. A sequência de DNA não é idêntica, mas apresenta homologia com a da hemolisina produzida por *V. cholerae* El Tor (KOTHARY *et al*, 2003; CHAKRABORTY *et al*, 2005), que é um membro da família HlyA (MIYOSHI e SHINODA, 2000). Essa proteína é sensível ao calor, a proteases e à presença de íons zinco e tem ponto isoelétrico de 4,6

(KOTHARY *et al*, 2003), e é ativa contra uma grande variedade de eritrócitos (MYATT e DAVIS, 1989; KOTHARY *et al*, 2003). O gene que codifica a hemolisina possui 2200 pb (HAN *et al*, 2002). Não há consenso com relação ao seu peso molecular, pois já foram relatadas proteínas com 63KDa e 82KDa, respectivamente (HAN *et al*, 2002; KOTHARY *et al*, 2003). Dependendo do método de purificação escolhido, essas diferenças podem ocorrer, por exemplo: filtração por gel exibe um peso molecular menor do que o do SDS-PAGE (KOTHARY *et al*, 2003). Além disso, a proteína necessita sofrer clivagem para que aconteça o seu amadurecimento e, dessa forma, exerça sua função. Com isso, seu peso molecular pelo SDS-PAGE foi calculado em 79KDa (HAN *et al*, 2002). Foi proposto que a hemolisina também esteja envolvida na vacuolização em células HeLa assim como acontece com a hemolisina de *V. cholerae*, contudo ainda existe a necessidade de se realizar mais estudos para a verificação de alguma correlação (CHAKRABORTY *et al*, 2005).

Os organismos utilizam-se de íons ferro como cofatores para inúmeras reações químicas importantes (MIETHKE e MARAHIEL 2007). No corpo humano, existem proteínas para o transporte e o armazenamento desse íon, como a hemoglobina e a ferritina, respectivamente (MIETHKE e MARAHIEL, 2007).

Os microrganismos desenvolveram mecanismos diretos e indiretos para a captação de ferro quando este encontra-se em baixas concentrações (MIETHKE e MARAHIEL, 2007). O sistema direto envolve um receptor específico para cada tipo de proteína enquanto que o indireto inclui o sistema sideróforo, que é composto por um ligante com capacidade de quelar o ferro (a molécula de sideróforo), um receptor

de membrana externa e enzimas para a liberação intracelular do íon (MIETHKE e MARAHIEL, 2007).

Já foi demonstrado que *V. fluvialis* pode utilizar-se de um sideróforo da classe dos catecolatos (classificação de acordo com MIETHKE e MARAHIEL, 2007), nomeado fluvibactina, com semelhanças estruturais ao sideróforo utilizado pelo *Vibrio cholerae* (ANDRUS *et al*, 1983; YAMAMOTO *et al*, 1993) e um outro chamado sideróforo 4 (YAMAMOTO *et al*, 1993). Também há relatos de que algumas espécies de *Vibrio* fazem uso de outros fatores para utilização de hemoglobina, heme ou hemina (JOSEPH *et al*, 1982; HELMS *et al*, 1984; STROM e PARANJPYE, 2000).

AHN *et al* (2005) identificaram uma proteína de membrana externa com 77 KDa em *V. fluvialis*, a HupO, que se liga especificamente à hemina quando sob condições limitantes de ferro, e a seqüência de nucleotídeos apresentou alta homologia com *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*. Sugere-se que ela seja um fator de virulência importante também por ter envolvimento na atividade hemolítica já que aumenta a produção de hemolisina, e na resistência ao estresse oxidativo apesar de não elevar a expressão da catalase (AHN *et al*, 2005).

Proteases que possuem um íon zinco no seu sítio catalítico são chamadas metaloproteases (MIYOSHI e SHINODA, 2000). A metaloprotease produzida por *V. cholerae* pode ativar a toxina colérica, ajudar na maturação de sua hemolisina e acelerar a adesão bacteriana nas células do epitélio intestinal, enquanto que a produzida por *V. vulnificus* ativa a captação de ferro, causa dano tecidual e, principalmente, aumenta a permeabilidade vascular (MIYOSHI e SHINODA, 2000).

Além disso, essas proteases facilitam a disseminação bacteriana no hospedeiro, levando à sepse devido à invasão da circulação sistêmica (MIYOSHI e SHINODA, 2000).

MIYOSHI *et al* (2002) caracterizaram uma metaloprotease em *V. fluvialis* (VFP) com peso molecular de 45 KDa pertencente à família das termolisinas, a mesma em que se encontra a do *V. vulnificus*, e o seu respectivo gene, o *vfpA*. Ela exibe sensibilidade à temperatura, a íons pesados, a inibidores competitivos, e tem especificidade ao substrato (MIYOSHI *et al*, 2002). Complementarmente, a proteína demonstrou capacidade de agir contra a azocaseína, de provocar hemorragia e de aumentar a permeabilidade da pele assim como o *V. vulnificus*, porém a atividade de hemaglutinação e elastase foi fraca (MIYOSHI *et al*, 2002). O gene que codifica essa protease é muito similar ao do *V. vulnificus*, e a seqüência de aminoácidos também apresenta alta homologia ao do *V. vulnificus*, porém é idêntica ao do *V. cholerae* (MIYOSHI *et al*, 2002).

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS

Os compostos de amônio quaternário (QAC, *Quaternary Ammonium Compounds*) são detergentes catiônicos largamente utilizados como antissépticos e desinfetantes devido à sua ação sobre as membranas, principalmente a membrana citoplasmática interna bacteriana, causando perda estrutural na sua organização e integridade (MCDONNEL e RUSSEL, 1999), junto a outros efeitos danosos para a célula microbiana, como o extravasamento dos componentes celulares, além de

desnaturação de proteínas e enzimas (MCDONNEL e RUSSEL, 1999; WEBER *et al*, 2007). A membrana externa das bactérias Gram-negativas previne o acesso de muitos agentes antimicrobianos e, por isso, são consideradas intrinsicamente mais resistentes aos compostos de amônio quaternário (MCDONNEL e RUSSEL, 1999). No entanto, já foram constatados outros mecanismos de resistência aos QAC, como aquisição de plasmídios ou mutações cromossômicas (MCDONNEL e RUSSEL, 1999).

As sulfonamidas foram os primeiros agentes antimicrobianos usados no tratamento de infecções humanas. São agentes bacteriostáticos de amplo espectro, habitualmente utilizados na forma de sais de sódio que competem com o PABA (ácido-*p*-aminobenzóico) pela enzima diidropteroato sintetase, inibindo-a e, assim, interferem na síntese de ácido fólico pelas bactérias, sendo que esse composto é essencial para a síntese de precursores de DNA e RNA (RANG *et al*, 2001). A resistência a esses compostos pode se dar por diminuição de permeabilidade bacteriana ao antibiótico, expulsão ativa da droga ou hiperprodução que permita a síntese de ácido fólico. Além disso, a resistência também pode ocorrer por mutações ou, mais comumente, à aquisição de genes por meio plasmídios ou outros elementos genéticos móveis (SKÖLD, 2001).

O trimetoprim é um composto bacteriostático antagonista do diidrofolato, pois compete pela diidrofolato redutase, impedindo a formação de ácido fólico (RANG *et al*, 2001). O mecanismo de resistência bacteriano ao antibiótico se dá geralmente por plasmídios ou por mutações no gene que codifica a enzima (SKÖLD, 2001). Atualmente, se conhecem dois genes contidos em plasmídios, *sulI* e *sulII*, e 27 classes de plasmídios que codificam seis tipos de enzimas que são resistentes ao

trimetoprim, sendo que esses elementos são encontrados com frequência em integrons de classe 1 (VICENTE e PÉREZ-TRALLERO, 2010). O cotrimaxazol é a associação do trimetoprim com o sulfametazol muito utilizado na clínica porque, dessa forma, a ação do antimicrobiano é potencializada (HOWE e SPENCER, 1996).

O cloranfenicol é um bacteriostático com ação inibitória potente sobre a síntese de proteínas bacterianas, principalmente por impedir o alongamento da cadeia polipeptídica (SCHWARZ *et al*, 2004). A inativação enzimática da droga por diferentes acetiltransferases (CATs) é o mecanismo de resistência mais encontrado entre os microrganismos. Existem as acetiltransferases do tipo A, que foram detectadas em uma grande variedade de bactérias, e as do tipo B (também conhecidas como xenobióticos) que foram mais recentemente descritas. Contudo, há relatos de outros mecanismos de resistência, como sistemas de efluxo, inativação por fosfotransferases, mutações no sítio-alvo e alteração da permeabilidade da barreira. Em plasmídios, cromossomos e em elementos genéticos móveis, já foram encontrados genes relacionados com a exportação combinada de cloranfenicol e florfenicol, tais como *pp-flo*, *cmlA-like*, *floSt*, *flo*, e *floR* tanto em bactérias clínicas como nas ambientais (SCHWARZ *et al*, 2004).

Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas que inibem a síntese de proteínas pela ligação ao 16S rRNA do microrganismo (SHAKIL *et al*, 2008). A resistência pode ocorrer por mudança da permeabilidade da membrana interna, bombas de efluxo, alteração da subunidade 30S do ribossomo, cessamento da atividade da droga, diminuição do transporte de membrana, desativação do seu sítio de ligação e captura da droga (SHAKIL *et al*, 2008).

As enzimas modificadoras ligam-se a um radical da molécula da droga e diminuem a afinidade do antibiótico ao seu alvo. Essas proteínas são geralmente codificadas por plasmídios e dividem-se em três classes: adenililtransferases, também conhecidas como nucleotidiltransferases (AADs ou ANTs), fosforiltransferases (APHs) e acetiltransferases (AACs) (STRATEVA e YORDANOV, 2009).

Os betalactâmicos constituem um amplo grupo composto por penicilinas, cefalosporinas/cefamicinas, carbapenêmicos e clavulânicos (COULTHURST *et al*, 2005). Eles interferem na formação de *crosslinks* entre os peptidoglicanos da parede celular gerando um complexo estável com a transpeptidase (COULTHURST *et al*, 2005). Os mecanismos de resistência incluem a redução da permeabilidade da membrana externa, a modificação das proteínas fixadoras de penicilina (PBPs, penicillin-binding proteins) e, principalmente, a produção de enzimas (beta-lactamases) que hidrolisam o anel betalactâmico do antibiótico, inativando-o (COULTHURST *et al*, 2005). As beta-lactamases podem ser de espectro estendido (ESBL), do tipo AmpC, e carbapenemase de classes A e B (THOMSON, 2010).

As ESBLs passaram a ser reconhecidas nos anos 80, são usualmente codificadas por genes móveis e as mais encontradas pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M, sendo esta está adquirindo maior prevalência nos últimos anos. Outras ESBLs têm relevância clínica, especialmente os tipos VEB, PER, GES, TLA, IBC, SFO-1, BES-1 e BEL-1 (FALADAS e KARAGEORGOPOULOS, 2009).

Muitas bactérias Gram-negativas produzem AmpC codificada no cromossomo que, em altas taxas, podem hidrolisar penicilinas, aztreonam, cefamicinas e cefalosporinas e, por isso, esta enzima está geralmente associada a

multirresistência. As beta-lactamases desse tipo geralmente pertencem às famílias CMY, FOX e DHA (THOMSON, 2010).

As carbapenemases possuem a habilidade de hidrolisar carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos. Elas são divididas em classes A, B e D. As enzimas de classe A incluem as famílias KPC, IMI e SME; elas hidrolisam as penicilinas e as cefalosporinas de uma maneira mais eficiente do que os carbapenêmicos. As de classe B (metalo-beta-lactamase ou MBL) agrupam as famílias VIM, IMP e SPM; elas hidrolisam carbapenêmicos mas, não, o aztreonam. A maioria das carbapenemases da classe D pertencem à família OXA; elas hidrolisam muito fracamente os carbapenêmicos (THOMSON, 2010).

As quinolonas e fluoroquinolonas são drogas que inibem as topoisomerasas do tipo II (DNA girase e a topoisomerase IV), podendo formar complexos tanto com o DNA como com essas proteínas e, assim, a transcrição e replicação do DNA não são permitidas (STRAHILEVITZ e HOOPER, 2005). A resistência a essa classe de antimicrobianos ocorre pela somatória de mutações nessas duas enzimas (DRLICA e ZHAO, 1997). Além disso, a presença do gene *qnr* confere resistência adicional às quinolonas, oferecendo proteção aos alvos do antibiótico. Esses genes estão geralmente localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídios; no entanto, também foi identificado como parte do SXT (elemento conjugativo integrativo) (KIM *et al*, 2010).

As tetraciclinas são agentes bacteriostáticos de amplo espectro que inibem a síntese de proteínas ligando-se à subunidade 30S do ribossomo (PÉREZ-TRALLERO e IGLESIAS, 2003). Bombas de efluxo e proteínas de proteção ribossomal são os fatores mais relevantes de resistência a essa classe de antibiótico

(PÉREZ-TRALLERO e IGLESIAS, 2003). Elementos genéticos, como transposons e integrons, podem conter genes de resistência e se transferir para outras bactérias. Os genes *tet* e *otr* estão envolvidos na resistência a esse antimicrobiano, sendo que o *tet* pode codificar tanto bomba de efluxo como causar modificação ribossômica. Nas bactérias Gram-negativas, o mecanismo mais comumente encontrado é a bomba de efluxo (VICENTE e PÉREZ-TRALLERO, 2010).

1.5 *Vibrio* spp E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Os microrganismos encontram maneiras de evitar os efeitos de diferentes classes de antibióticos tornando-se resistentes a múltiplas drogas, o que tem importância clínica porque interfere no tratamento efetivo da doença, fazendo com que o paciente possa sucumbir à doença (LEVY e MARSHALL, 2004). Essa característica pode ocorrer de diferentes modos, como bombas de efluxo, enzimas de inativação, impermeabilidade ao antimicrobiano ou por mudança no sítio-alvo do antibiótico. Esses mecanismos podem ser intrínsecos ou ocorrer pela aquisição de genes de resistência através mutações cromossômicas ou, ainda, por troca de material genético que acontece mais comumente pela transdução, conjugação ou transformação mediada por plasmídios, transposons, integrons e outros elementos genéticos (ALESKUN e LEVY, 2007).

Transdução é o processo no qual a transferência de genes entre bactérias é mediada por bacteriófagos (MILLER, 2001). Na conjugação, duas bactérias unem-se temporariamente através do pili sexual e parte do DNA plasmidial da célula doadora

é passado para a receptora (GROHMANN *et al*, 2003). A transformação acontece quando uma bactéria incorpora moléculas de DNA em seu meio e este passa a fazer parte de sua informação genética (LORENZ e WACKERNAGEL, 1994).

A maioria dos plasmídios são moléculas de DNA de fita dupla circulares extracromossômicas, que podem estar presentes em múltiplas cópias em uma célula bacteriana (BENNETT, 2008). Eles se replicam independentemente do microrganismo apesar de utilizarem-se da maquinaria de reprodução deste, sendo que os plasmídios conjugativos possuem a capacidade de se auto-transportarem e também de transferir outros plasmídios de uma célula para outra (BENNETT, 2008). São referidos como elementos acessórios porque não são essenciais para a sobrevivência bacteriana, no entanto, podem conter genes que conferem alguma vantagem adaptativa em determinadas condições ambientais, tal como resistência a elementos tóxicos ou capacidade invasiva (BENNETT, 2008) e, por isso, são considerados agentes importantes na disseminação de determinantes de importância clínica e ambientais (WILKINS e THOMAS, 2000; BENNETT, 2008).

Transposons são seqüências de DNA que têm a capacidade de se transportar para diferentes posições dentro do genoma (LODISH *et al*, 2002b), podem existir em plasmídios, em outros transposons ou no cromossomo do hospedeiro (ALEKSHUN e LEVY, 2007). Há diferentes famílias de transposons, sendo que o mais simples geralmente possui um segmento de DNA flanqueado por repetições invertidas, as quais são reconhecidas pela transposase, a enzima que catalisa a excisão e inserção desses elementos (JUDSON e MEKALANOS, 2000).

Os integrons são elementos genéticos que representam um sistema de captura de quadros abertos de leitura (do inglês, ORF: *open reading frames*), os quais se

encontram em um componente móvel chamado gene cassete (ROWE-MAGNUS e MAZEL, 2001). Acredita-se que não são móveis, contudo são tipicamente encontrados em transposons e/ou plasmídios, os quais catalisam sua própria mobilidade (ROWE-MAGNUS e MAZEL, 2001). A estrutura dos integrons é formada por: um fragmento que codifica uma integrase (*int*) pertencente à família da tirosina recombinase; um sítio que é responsável pela catálise entre *attI* e *attC*; um sítio de recombinação específica (*attI*) e um promotor (Pant), podendo existir um outro promotor mais forte (P₂) (SABATÉ e PRATS, 2002).

A capacidade de integrar genes externos dispensando o reconhecimento de promotores ou a origem de replicação possibilita aos microrganismos usufruírem de uma variedade de cassetes do meio ambiente local e, assim, auxiliar a transferência genética entre os diferentes grupos de bactérias, inclusive entre os altamente divergentes (NEMERGUT *et al.*, 2008).

Os genes cassetes podem existir como moléculas circulares livres (HALL e COLLIS, 1998), normalmente não têm promotores e não são ladeados por repetições invertidas, diferente do que acontece no transposon (KOVALESKAYA, 2002). Comumente estão inseridos num integron, tornando-se parte deste (FLUIT e SCHMITZ, 1999) e sua expressão se dá quando são introduzidos de forma que tenham uma orientação apropriada no integron (KOVALESKAYA, 2002). Os cassetes geralmente possuem um único gene ou ORF e uma seqüência de recombinação sítio específica reconhecida pela integrase na posição 3', chamada *attC* (HALL e COLLIS, 1998). A maioria dos sítios *attC* são exclusivos, sua seqüência e comprimento não são conservadas e, portanto, variam muito; e as similaridades estão restritas às fronteiras RYYAAC e G↓TTRRRY, que

correspondem ao sítio central inverso e ao sítio central respectivamente, sendo que a seta indica o ponto de recombinação (ROWE-MAGNUS *et al*, 1999).

As três primeiras classes de integrons contêm genes que conferem resistência a antibióticos (SABATÉ e PRATS, 2002) e, por isso, são conhecidos também como integrons de resistência (IR) (ROWE-MAGNUS e MAZEL, 2001), sendo que os pertencentes à classe 1 são os mais encontrados na clínica (SABATÉ e PRATS, 2002).

Integrons de classe 1 são organizados em duas seqüências conservadas: na porção 5' tem-se a estrutura comum a todos já descrita anteriormente; e na 3' há dois genes fixos de resistência, um para compostos de amônio quaternário (*qacE* Δ 1) e outro para sulfonamidas (*sul1*) (MAZEL, 2006).

Já foram relatados cassetes para betalactâmicos, aminoglicosídeos, trimetoprim, cloranfenicol, rifampicina e outros agentes quaternários no integron de classe 1 (FLUIT e SCHMITZ, 1999). Em 2004, AHMED *et al* estudaram um isolado de *V. fluvialis* multi-resistente e detectaram a presença de dois genes cassetes relacionados com a resistência a aminoglicosídeos no integron de classe 1 do cromossomo de *V. fluvialis*: o primeiro é o *aac(3)-Id* que corresponde a aminoglicosídeo transferase e confere resistência principalmente à gentamicina; e o segundo é o *aadA7* que se relaciona com a aminoglicosídeo adeniltransferase, proporcionando resistência à estreptomicina e espectinomicina. Algumas cepas continham integrons de classe 1 e integrases de SXT (elemento genético auto-transmissível), no entanto, parece que a resistência a esses antibióticos se dá principalmente por mutações no gene *gyrA* e/ou presença de bombas de efluxo (AHMED *et al*, 2004).

SRINIVASAN *et al* (2006) realizaram um estudo no qual mostraram que *V. fluvialis* isolados de pacientes entre 1998 a 2002 eram resistentes a quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina), e a possível explicação para essa característica seriam mutações na região que determina resistência a essa classe de antibióticos no gene *gyrA* e/ou a presença de bombas de efluxo.

Em 1998, MAZEL *et al* identificaram no cromossomo pequeno de *V. cholerae* O1 um gene de integrase, o *intI4*, com organização semelhante às seqüências repetidas de *V. cholerae* (VCRs, do inglês *Vibrio cholerae repeated sequences*) e relataram sua presença também em *V. metschnikovii*, *V. mimicus* e *V. parahaemolyticus* assim como ROWE-MAGNUS *et al* (1999) detectaram sua existência em *V. fischerii*. Essa estrutura foi denominada super-integron (MAZEL *et al*, 1998) tendo como características 126 Kb, pelo menos 179 cópias de VCR (ROWE-MAGNUS *et al*, 1999) e sítio *attC* dos seus genes cassetes serem altamente relacionados e espécie-específicos (ROWE-MAGNUS e MAZEL, 2001).

Sugere-se que os super-integrans (SI) sejam os ancestrais dos integrans de resistência múltipla (MRI, do inglês *multiple resistance integrans*) devido à sua relação com a radiação das gammaproteobacteria (ROWE-MAGNUS *et al*, 2001). De acordo, com ROWE-MAGNUS *et al* (2002), os MRIs recrutam genes de resistência diretamente dos SIs que, então, são disseminados. No entanto, os integrans também podem estar envolvidos com virulência já que o gene para a hemaglutinina (VAN DONGEN *et al*, 1987) e o para a enterotoxina termoestável (OGAWA e TAKEDA, 1993) estão estruturados como cassetes. Além disso, foram demonstradas funções metabólicas em três genes cassetes de SI, indicando que os

integrans funcionam como um sistema de adaptação bacteriano e que possivelmente possuem essa atividade há milhões de anos (ROWE-MAGNUS *et al*, 2001).

Em 1992, um novo sorogrupo de *V. cholerae*, denominado O139 Bengal, causou surtos de cólera na Índia e em Bangladesh. Observou-se que esses isolados eram resistentes a sulfametazol e trimetoprim, furazolidona e, em baixos níveis, a estreptomicina (WALDOR *et al*, 1996). Os genes que conferiam resistência a sulfametoxazol, trimetoprim e estreptomicina estavam contidos em uma estrutura chamada elemento SXT (WALDOR *et al*, 1996), que por ser conjugativo, auto-transmissível e integrativo recebeu o acrônimo CONSTIN (do inglês, *conjugative, self-transmissible, integrating element*) (HOCHHUT e WALDOR, 1999).

O SXT se integra na região 5' do *pfrC*, um gene não-essencial que codifica o fator 3 de liberação da cadeia polipeptídica (RF3) encontrado no cromossomo maior de *V. cholerae* (HOCHHUT e WALDOR, 1999). A integração e excisão desse elemento estão relacionadas com a recombinação sítio-específica dos fagos lambdóides porque há formação de uma estrutura intermediária extracromossômica circular essencial para sua transferência, e há necessidade de se codificar a Int, uma tirosina recombinase que possui similaridade com a família da integrase *lambda* (HOCHHUT e WALDOR, 1999).

Em 1995, YAMAMOTO *et al* observaram que os isolados de *V. cholerae* O1 El Tor reemergentes eram o principal agente dos surtos de cólera no subcontinente indiano, e que tinham o mesmo padrão de resistência do O139. Os genes que conferiam essa resistência estavam num CONSTIN altamente relacionado, mas não idêntico ao elemento do *V. cholerae* O139 (HOCHHUT e WALDOR, 1999). Em um estudo comparativo entre o SXT dos dois sorogrupos, foi observado que a

resistência de O139 ao trimetoprim era devido à presença de um novo gene (*dfr18*), e que as cepas que eram sensíveis a esse antibiótico provavelmente sofreram deleção (HOCHHUT *et al*, 2001). Além disso, apesar de o *V. cholerae* O1 El Tor ter a mesma organização do SXT do O139, ele não possui o gene *dfr18* e que sua resistência ao trimetoprim se dava pelo gene *dfrA1* contido em um integron de classe 4 que, por sua vez, localizava-se no CONSTIN (HOCHHUT *et al*, 2001), demonstrando que o SXT faz parte de um grupo de elementos genéticos transmissíveis que contribuem consideravelmente para a distribuição de resistência aos antimicrobianos (HOCHHUT *et al*, 2001; IWANAGA *et al*, 2004; MOHAPATRA *et al*, 2008) através da transferência horizontal de genes entre bactérias Gram-negativas já que são capazes de mobilizar plasmídios e DNA cromossômico (HOCHHUT *et al*, 2000), e que os genes contidos nele provavelmente não são características intrínsecas dessa família (HOCHHUT *et al*, 2001; MOHAPATRA *et al*, 2008).

AHMED *et al* (2005) isolaram de um infante de 6 meses de idade uma cepa de *V. fluvialis* que apresentou o mesmo padrão de resistência do *V. cholerae* O139 e O1 El Tor. Ao estudarem a base genética dessa característica, detectaram a presença de um elemento semelhante ao SXT, contudo os genes para a integrase e o sítio *attP* eram diferentes dos do *V. cholerae*, indicando que o SXT pode ter sido transferido horizontalmente do *V. cholerae* para o *V. fluvialis* ou que esse possa ser um tipo variante (AHMED *et al*, 2005).

Atualmente, o SXT é classificado como um elemento conjugativo integrador (ICE, *integrating conjugative element*) (BURRUS *et al*, 2006). Os ICEs possuem características semelhantes aos plasmídios e aos fagos, porque se transferem via

conjugação e não se replicam de forma autônoma, respectivamente (BURRUS *et al*, 2006).

Apesar de serem conhecidos pela sua relação com resistência a antimicrobianos, supõe-se que esses elementos também podem conferir outras vantagens, pois foram encontrados ICEs sem esses genes, confirmando que aqueles possuem um papel importante na adaptação bacteriana (BURRUS *et al*, 2006; TAVIANI *et al* 2008).

1.6 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Vibrio fluvialis é bacilo halofílico Gram-negativo originalmente designado grupo F na Inglaterra (FURNISS *et al*, 1977) e EF6 nos Estados Unidos (HUQ *et al*, 1980). Essa bactéria pertence à família *Vibrionaceae* (FARMER III e JANDA, 2005) é comumente encontrada em meios aquáticos tanto no sedimento como na coluna d'água, ou associados com plantas e animais aquáticos, principalmente em ambientes estuarinos e marinhos (SEIDLER *et al*, 1980; HUQ *et al*, 1985; DUMONTET *et al*, 2000), mas também já foi isolada de água doce (VENKATESWARAN *et al*, 1989; RAHIM e AZIZ, 1994). Membros dessa família são importantes agentes etiológicos de diarreia pelo mundo (LESMANA *et al*, 2002). A espécie mais conhecida é o *V. cholerae* por ter causado sete pandemias (SACK *et al*, 2004). O mecanismo de virulência do *Vibrio cholera* tem a capacidade de levar o indivíduo rapidamente à desidratação devido à grande perda de água e eletrólitos, podendo chegar ao choque e até à morte (SACK *et al*, 2004). Porém, o número de espécies pertencentes ao gênero *Vibrio* que são capazes de causar diarreia em humanos tem aumentado nos

últimos anos (LESMANA *et al*, 2002), dentre elas está o *V. fluvialis* (FARMER III e JANDA, 2005).

Este microrganismo foi inicialmente isolado de casos esporádicos de diarreia nos Estados Unidos (HUQ *et al*, 1980) e na Inglaterra (FURNISS *et al*, 1977). Mas passou a ser reconhecido como um importante patógeno após um surto em Bangladesh entre 1976 e 1977, no qual foi isolado de mais de 500 pessoas, especialmente infantes, crianças e jovens adultos (HUQ *et al*, 1980). Os sintomas são similares aos do *V. cholerae*, com os pacientes apresentando diarreia, dor abdominal, desidratação moderada a severa e, em alguns casos, febre (HUQ *et al*, 1980). Uma característica importante é a alta frequência de sangue e pus presentes nas amostras de fezes (HUQ *et al*, 1980), diferentemente do que acontece na cólera (BLAKE *et al*, 1980). Existem evidências de que o principal fator que contribui para a patogênese nos casos de gastroenterite e diarreia por *V. fluvialis* seja uma hemolisina (HAN *et al*, 2002; KOTHARY *et al*, 2003) apesar de esse microrganismo produzir diversas toxinas e o papel de cada uma ainda não ser bem estabelecido (LOCKWOOD *et al*, 1982; HUQ *et al*, 1985; KOTHARY *et al*, 2003).

Acredita-se que a infecção esteja relacionada com o consumo de peixes e/ou frutos-do-mar crus ou mal-cozidos contaminados, principalmente ostras já que podem concentrar o microrganismo através da filtração da água (SCHANDEVYL *et al*, 1984; RIPABELLI *et al*, 1999; SERRATORE *et al*, 1999; MAUGERI *et al*, 2000; BUTT *et al*, 2004). Além disso, os pacientes geralmente relatam a ingestão desses produtos aproximadamente sete dias antes do atendimento médico (ALTEKRUSE *et al*, 2000; ALLTON *et al*, 2006).

As infecções mais comumente provocadas por *V. fluvialis* são a gastroenterite e a diarreia (LESMANA *et al*, 2002; KOTHARY *et al*, 2003; TSAI *et al*, 2004), sendo que o microrganismo já foi isolado de fezes de indivíduos diarreicos em diversas regiões: Estados Unidos (TACKET *et al*, 1982; HICKMAN-BRENNER *et al*, 1984), Brasil (CARVALHO *et al*, 1994), Indonésia (LESMANA *et al*, 2002), Tailândia (SRIENGFUNG *et al*, 2004), Índia (AHMED *et al*, 2005; CHAKRABORTY *et al*, 2005), Taiwan (LAI *et al*, 2006) e Costa do Golfo (ALLTON *et al*, 2006). No entanto, já foram descritos casos extraintestinais (TSAI *et al*, 2004; HUANG e HSU, 2005; RATNARAJA *et al*, 2005; RODRÍGUEZ *et al*, 2005; LAI *et al*, 2006; LEE *et al*, 2008), como sepse (LAI *et al*, 2006) e lesão cutânea (TSAI *et al*, 2004), que podem causar complicações e levar à morte, especialmente pessoas imunocomprometidas (HUANG e HSU, 2005; RATNARAJA *et al*, 2005; LEE *et al*, 2008).

A sepse pode se desenvolver quando a bactéria invade a circulação sanguínea pela veia-porta ou pelo sistema linfático intestinal graças à diarreia persistente (TACKET *et al*, 1982). Indivíduos que apresentam alguma doença crônica, como diabetes ou uma desordem hepática (LAI *et al*, 2006), ou que possuam o sistema imune deprimido são os mais afetados (FARMER III e JANDA, 2005) e os sintomas comumente encontrados são: febre, hipotensão, prostração, náuseas e vômitos (TACKET *et al*, 1982). O agente etiológico envolvido com esse quadro geralmente é o *V. vulnificus* (RENGPIPAT *et al*, 2008), no entanto LAI *et al* (2006) relataram um caso de sepse provavelmente causado por *V. fluvialis* em um homem de 65 anos, apesar de este negar ter ingerido frutos-do-mar e não ter apresentado febre.

Outra infecção extraintestinal importante é a ocasionada em feridas cutâneas, sejam elas cortes, picadas ou queimaduras, e que entram em contato com a superfície da água ou de animais aquáticos contaminados (FARMER III e JANDA, 2005). Os indivíduos exibem bolhas, inchaço e sensibilidade na região infectada, evoluindo para necrose; podem ter ainda calafrios, mal-estar generalizado, febre e hipotensão (TSAI *et al*, 2004). Em um estudo com pessoas que exerciam alguma atividade ocupacional relacionada ao contato com a água ou manipulação de peixes ou frutos-do-mar, que estavam hospitalizadas devido à infecção de pele grave, foi isolado *V. fluvialis* em um dos pacientes (TSAI *et al*, 2004). Além disso, já foram observadas outras complicações mais raras causadas por essa bactéria emergente, incluindo encefalite (HUANG e HSU, 2005), peritonite em pacientes recebendo (RATNAJARA *et al*, 2005) ou não diálise peritoneal ambulatorial contínua (LEE *et al*, 2008) e otite severa (RODRÍGUEZ *et al*, 2005), mostrando que a infecção por *V. fluvialis* pode ser mais ampla do que atualmente estimado e que, por esse motivo, necessita de estudos mais aprofundados.

A identificação desse microrganismo por métodos fenotípicos, mesmo pelos automatizados, ainda permanece um problema devido a sua grande similaridade com *Aeromonas hydrophila* e *Vibrio furnissii* (SEIDLER *et al*, 1980; LEE *et al*, 2008). É por essa razão que o desenvolvimento de marcadores moleculares sensíveis, e rápidos na determinação de uma espécie patogênica se faz necessária para o diagnóstico correto e posterior tratamento, além de ser útil para a vigilância de infecções esporádicas e o gerenciamento de surtos (TRACZ *et al*, 2007).

A resistência aos antibióticos entre as bactérias é uma manifestação da evolução bacteriana (LEVY e MARSHALL, 2004; MAZEL, 2006). Ela pode ocorrer

através de mutações e super-expressão de sistemas de efluxo. Sua disseminação pode acontecer através de plasmídios, integrons e/ou transposons (SRINIVASAN *et al*, 2006). Existem descrições a respeito da sensibilidade e resistência de *V. fluvialis* a vários antibióticos (HUQ *et al*, 1980; TACKET *et al*, 1982; RAHIM e AZIZ, 1994; DUMONTET *et al*, 2000; SRIFUENGFUNG *et al*, 2004; TSAI *et al*, 2004; AHMED *et al*, 2005; HUANG e HSU, 2005; RATNARAJA *et al*, 2005; RODRÍGUEZ *et al*, 2005; GROS, 2006; LAI *et al*, 2006; LEE *et al*, 2008), contudo a compreensão e a base genética desses dados ainda são escassas (AHMED *et al*, 2004; AHMED *et al*, 2005).

Atualmente, conhece-se a presença de um integron, que confere resistência a aminoglicosídeos (AHMED *et al*, 2004), e de um elemento integrativo conjugativo (SXT), que confere resistência a sulfonamidas, trimetoprim, aminoglicosídeos e cloranfenicol (AHMED *et al*, 2005).

A compreensão sobre a resistência aos antimicrobianos em *V. fluvialis* ainda precisa ser explorada, pois são informações que podem levar ao sucesso terapêutico, fazendo com que o paciente apresente melhora clínica mais rapidamente, evitando-se complicações devido à infecção (HUQ *et al*, 1980; TSAI *et al*, 2004; RATNAJARA *et al*, 2005; RODRÍGUEZ *et al*, 2005; ALLTON *et al*, 2006), e conduzem à redução de custos porque há utilização de uma droga efetiva (LEVY e MARSHALL, 2004).

No Brasil, existem poucos relatos sobre a ocorrência dessa espécie (CARVALHO *et al*, 1994) e não há estudos moleculares sobre a presença de genes de resistência, o que ressalta a importância da correta e rápida identificação desse patógeno importante para a saúde pública, e o entendimento sobre a sua base molecular da resistência a drogas terapêuticas.

Considerando a justificativa apresentada foram propostos os seguintes objetivos:

1. Selecionar um marcador molecular que possa detectar e diferenciar *Vibrio fluvialis* de *V. furnissii* e *A. hydrophila*;
2. Estudar o perfil de sensibilidade aos antibióticos de *V. fluvialis* e *V. furnissii*;
3. Pesquisar a presença de SXT e os genes de resistência a antimicrobianos relacionados a ele.

2 MÉTODO

2.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram utilizadas 77 isolados de *V. fluvialis* e 5 de *V. furnissii* da coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, previamente isoladas e que foram mantidas em ágar Lúria 1% ou que estavam conservadas em freezer -70°C.

2.2 TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio fluvialis*

Os isolados utilizados foram previamente identificados fenotipicamente em outros trabalhos realizados no Laboratório de Prática de Saúde Pública – FSP/USP. Os testes realizados foram: oxidase, produção de indol, lactose, glicose, produção de gás a partir da glicose, redução de nitrato a nitrito, arginina dihidrolase, lisina,

ornitina, lactose, arabinose, manitol, salicina, esculina, vermelho de metila, Voges-Proskauer, crescimento em caldo com 0%, 6%, 8% e 10% de NaCl.

O crescimento dos isolados foi realizado em caldo Lúria Bertani adicionado de 1% de NaCl (Luria 1%) por 18 a 24 horas em temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2$, e posterior reisolamento em meio seletivo para espécies de *Vibrio* - ágar TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose*) - nas mesmas condições de tempo e temperatura. Foram realizados testes de produção das enzimas catalase e citocromo oxidase após o cultivo em ágar Lúria com 1%, com confirmação da espécie através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*).

2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

2.3.1 Extração do DNA Genômico

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) (MURRAY E THOMPSON, 1980), com algumas modificações:

Os isolados foram semeados em 10mL de caldo Lúria 1% que foram incubados em temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 18 a 24 horas. A seguir, as culturas foram centrifugadas a 5000rpm por 10 minutos a 24°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado com 1mL de água ultrapura e transferido para um tubo tipo *ependorf* de 1,5mL. O resultante foi novamente centrifugado a 10000rpm por 5 minutos a 24°C com posterior descarte do sobrenadante. O *pellet* foi novamente ressuspensionado com 567 μL de solução tamponante TE I (Tris 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM, pH 8.0), acrescentados de 30 μL de solução a 10% de SDS (Dodecil sulfato de

sódio) e 3µL de proteinase K (20mg/mL). Após a homogeneização por inversão, o resultante foi mantido em banho de água a 37°C por 1 hora. Após esse período, foram adicionados 100µL de solução 5M de NaCl e 80µl de CTAB pré-aquecido a 65°C. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados em banho de água a 65°C por 20 minutos. Esperou-se esfriar em temperatura ambiente. Adicionou-se 500µL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 24:1), homogeneizou-se completamente e centrifugou-se a 10000rpm por 25 minutos a 24°C. A fase superior (aquosa) resultante foi transferida para um novo tubo tipo *ependorf* de 1,5mL onde foram acrescentados 5µL de RNAse (1000 µg/mL) e, então, incubados novamente a 37°C por 1 hora. Após o período de incubação, foram acrescentados a cada tubo, 500µL de clorofórmio e em seguida homogeneizado com vigor. O produto foi centrifugado a 10000rpm por 15 minutos a 24°C. A fase superior obtida foi transferida para um novo tubo tipo *ependorf* de 1,5mL, no qual foram adicionados 500µL de isopropanol gelado. O DNA foi precipitado fazendo-se movimentos rotatórios e, então, centrifugado a 10000rpm por 5 minutos a 24°C e o sobrenadante descartado. Após a precipitação, os DNAs foram lavados com 1mL de etanol 70% e, novamente, centrifugados a 10000rpm por 5 minutos a 24°C sendo o sobrenadante descartado. Os tubos foram secos sob vácuo por um período de 18 horas. No dia seguinte, o DNA foi eluído com 50µL de solução tamponante TE II (Tris 10mM, pH 8.0; EDTA 0,1mM, pH 8.0) e armazenado a 4°C. Após 24 horas, verificou-se a qualidade do DNA por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% em intensidade de corrente de 6V/cm por 30 min. O DNA foi mantido a 4°C até o momento de ser utilizado na amplificação pela reação em cadeia pela polimerase.

2.3.2 Construção do Iniciador para Detecção

Foi realizado o alinhamento manual, utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999), das sequências do 16S rDNA de todas as espécies de *Vibrio* descritas na literatura, disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A seguir, foram identificadas regiões de variabilidade, entre as diferentes espécies e que fossem capazes de diferenciar *Vibrio fluvialis* e *V. furnissii*. O programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) foi utilizado com a finalidade de selecionar as melhores regiões para serem utilizadas no desenho dos iniciadores. A especificidade dos iniciadores foi testada com as sequências disponíveis no GenBank utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (BAUER e RØRVIK, 2007).

2.3.3 Amplificação dos Fragmentos Correspondentes ao 16S rDNA de *Vibrio fluvialis* Utilizando Iniciadores Específicos

Os fragmentos 16S do DNA dos isolados utilizados no estudo foram amplificados por PCR com iniciadores específicos para diferenciação de *Vibrio fluvialis* e *V. furnissii*. Após a construção do iniciador para identificação, a reação se deu da seguinte forma:

Para cada 25µL de reação foram utilizados 5µL de DNA (50µg/µL); 2,5µL de tampão 10x; 0,2µL de solução DNTP 25 mM; 0,4µM de cada iniciador, 1,25U de polimerase termoestável (GoTaq-polimerase) e água estéril suficiente para completar o volume de 25µL.

Para amplificação do fragmento, foi empregado um ciclo inicial a 95°C por 7 minutos; 30 ciclos compreendendo denaturação a 95°C por 2 minutos, anelamento a 66°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. Como controle positivo foi utilizado um isolado de *V. fluvialis* (FSP 29/08, para reação com VFLU-F) e um de *V. furnissii* (FSP 33/08, para reação com VFUR-F) pertencentes à coleção de cultura e previamente submetidas ao seqüenciamento e, como controles negativos, um isolado de *V. cholerae* e um de *Aeromonas hydrophila* da coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

2.3.4 Amplificação de Genes Responsáveis pela Resistência aos Antibióticos em Isolados de *Vibrio fluvialis*

Os iniciadores para os genes de resistência estão descritos no Quadro 1. Os iniciadores, condições e ciclos de reação foram modificados de acordo com o estudo proposto por AHMED *et al* (2005).

Quadro 1 – Iniciadores para genes responsáveis por resistência aos antibióticos utilizados para o estudo de *Vibrio fluvialis*

Gene	Nome do Iniciador	Seqüência de Nucleotídeos (5' para 3')	Tamanho do fragmento
<i>floR</i>	FLOR - F	TTATCTCCCTGTCGTTCCAGCG	915pb
	FLOR - B	TCGTCGAACTCTGCCAAAGC	
<i>sulIII</i>	SUL2 - F	AGGGGGCAGATGTGATCGAC	606pb
	SUL2 - B	TGTGCGGATGAAGTCAGCTCC	
<i>strA</i>	STRA - F	TTGATGTGGTGTCCCGCAATGC	384pb
	STRA - B	CCAATCGCAGATAGAAGGCAA	
<i>dfr18</i>	TMP - F	TGGGTAAGACACTCGTCATGGG	389pb
	TMP - B	ACTGCCGTTTTTCGATAATGTGG	
sítio <i>attP</i>	attP- F	TGCTGTCATCTGCATTCTCTG	785pb
	attP- B	GCCAATTACGATTAACACGACGG	
<i>int SXT</i>	Int - SXT - F	CCCAAAGCAGAATCACGTAA	1350pb
	Int - SXT - B	GAAGATTTGGAGGAGTATGAG	

Adaptado de Ahmed *et al*, 2005

Para cada 25µL de reação foram utilizados 5µL de DNA (50µg/µL); 2,5µL de tampão 10x; 2,5 mM de cloreto de magnésio; 0,2µL de solução DNTP 25 mM; 0,4µM de cada iniciador, 1,25U de polimerase termoestável (Taq-polimerase) e água estéril suficiente para completar o volume de 25µL.

Para amplificação com os iniciadores de genes de resistência de *Vibrio fluvialis*, foi empregado um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos compreendendo denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. Foi utilizado como controle positivo o DNA de uma cepa de *Vibrio cholerae* O139 da coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

2.3.5 Visualização e Análise dos Produtos da PCR

O produto final da amplificação de cada isolado foi separado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, em intensidade de corrente de 6V/cm. Os perfis foram corados com Brometo de Etídio e visualizados em sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

As bandas obtidas no gel foram verificadas para correspondência ao tamanho das bandas de genes de resistência descritos na literatura através de comparação com um marcador de peso molecular 100pb (MassRuler DNA Ladder, Fermentas). As amostras que apresentaram tais bandas foram consideradas positivas.

2.3.6 Sequenciamento do Fragmento 16S rDNA

A amplificação do fragmento 16S rDNA foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), utilizando iniciadores específicos, ciclos e condições de reação descritos por THOMPSON *et al*, 2001. Em um volume final de 25µL de reação foram adicionados 250 µL de DNA, tampão10X, 200µM de DNTPs, 0,2µM de cada iniciador e 1,25U Taq-DNA-polimerase.

O sequenciamento foi utilizado para confirmação do posicionamento taxonômico de alguns isolados (Quadro 3). Também foram sequenciados os amplicons correspondentes aos genes de resistência aos antibióticos do SXT para determinação da especificidade dos iniciadores utilizados nesse estudo.

Os amplicons foram purificados utilizando Kit comercial GFX PCR DNA and gel Band Purificação Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do

fabricante. Os amplicons foram enviados para sequenciamento nas duas direções utilizando os iniciadores correspondentes (Genomic Engenharia Molecular).

As seqüências resultantes foram alinhadas manualmente contra seqüências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) por meio do sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (BAUER e RØRVIK, 2007). As distâncias filogenéticas para o fragmento 16S rDNA foram computadas utilizando o método de máxima verossimilhança (TAMURA *et al*, 2007) e foram consideradas na forma de número de unidades de substituições utilizando o programa MEGA 4.1 (Beta 3) disponível online em <http://www.megasoftware.net/mega41.html>.

2.4 ANTIBIOGRAMA

Para detecção do perfil fenotípico de resistência aos diferentes antibióticos foi empregado o teste de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton, segundo os critérios do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para *V. cholerae* (2009) utilizando sulfametaxazol-trimetoprim, cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, e ainda o protocolo recomendado para Enterobactérias (2009) utilizando estreptomicina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cefalotina, cefoxitina, cefepima, cefotaxima e meropenem. Após a obtenção de colônias isoladas, foram transferidas para caldo salina. A suspensão com turbidez de 0,5 de acordo com a escala McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi semeada em placa de Mueller-Hinton com o auxílio de um *swab* embebido na suspensão já padronizada. Os discos de antibióticos foram distribuídos sobre as placas, contendo os microrganismos em estudo, as quais

foram incubadas por 16-18 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O diâmetro das zonas de inibição foi medido em milímetros, incluindo o diâmetro do disco. Os isolados foram considerados susceptíveis, intermediários ou resistentes de acordo com o diâmetro do halo de inibição de crescimento. Foram realizadas três repetições na tentativa de induzir a expressão de resistência. Então, colônias que foram observadas dentro da zona de inibição foram reisoladas e repassadas no teste de disco-difusão para se confirmar o resultado.

3 RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio fluvialis* UTILIZANDO INICIADORES ESPECÍFICOS

Da pesquisa por regiões do 16S rRNA para identificação de *Vibrio fluvialis* foi observado que uma região possuía diferenças capazes de separar *Vibrio fluvialis* das demais espécies de *Vibrio*, porém essa região apresentava apenas 2 nucleotídeos de diferença da espécie mais próxima *V. furnisii* (Figura 1). O Quadro 2 apresenta as sequências dos iniciadores selecionados no presente estudo para identificação de *V. fluvialis*. Com a seleção de uma região específica, optou-se por utilizar um dos iniciadores senso ou anti-senso previamente descrito por THOMPSON *et al*, 2001 para obtenção de fragmento compatíveis de serem separados em géis de agarose de baixa concentração, ou seja entre 500 e 1000 pares de bases. Com a realização dos experimentos, o iniciador reverso genérico proposto por THOMPSON *et al*, 2001,

foi o que apresentou melhor desempenho na amplificação e diferenciação dos controles positivos e negativos fornecendo um fragmento de 1068 pb.

Quadro 2 - Iniciadores utilizados para identificação e diferenciação de *Vibrio fluvialis* das demais espécies de *Vibrio* com base no gene 16S rDNA.

Espécie-alvo	Iniciador	Sequências (5' - 3')	Fonte	Tamanho
<i>V. fluvialis</i>	VFLU - F	GCAGTGAGGAAGGAGGTATC	Este estudo	1068pb
Genérico	MH 2 - R	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA	Thompson <i>et al.</i> , 2001	1068pb
<i>V. furnissii</i>	VFUR - F	GCAGTGAGGAAGGGGATATC	Este estudo	1068pb

Quando as reações de PCR foram realizadas com os controles positivos e negativos e também com os isolados que deveriam ser identificados, foi possível observar que a utilização dos iniciadores VFLU-F e MH2-R amplificavam também fragmentos nos isolados de *V. furnissii*, porém a amplificação com os iniciadores VFUR-F e MH2-R somente amplificavam *V. furnissii*. Como consequência foi necessário realizar as reações de PCR com ambos iniciadores para a confirmação da identificação de *V. fluvialis* (Figura 2).

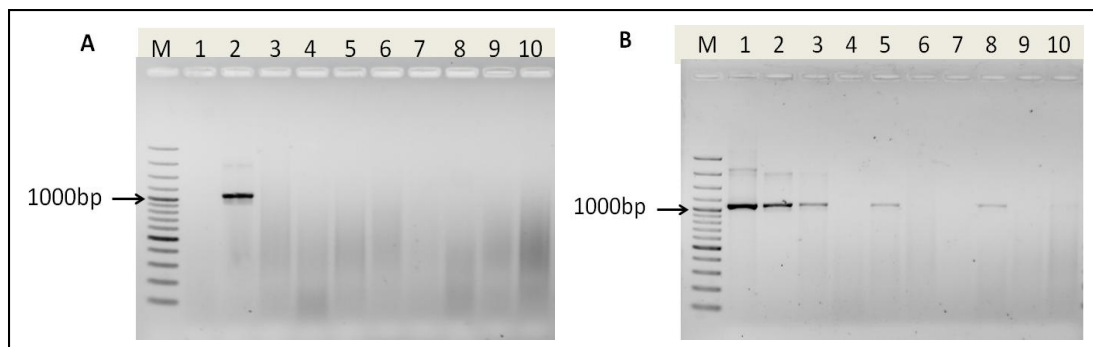


Figura 2 – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose. **A)** Iniciadores VFUR - F e MH2 - R. **B)** Iniciadores VFLU - F e MH2 - R. **Para A e B:** Coluna 1: *V. fluvialis* (FSP 29/08). Coluna 2: *V. furnisii* (FSP 33/08). Colunas 3, 4, 5, 6, 8 e 10: *V. fluvialis* identificado fenotipicamente (FSP 290/08, FSP 293/08, FSP 52/08, FSP 13/08, FSP 31/08 e FSP 52/08, respectivamente). Coluna 7: *A. hydrophila*. Coluna 9: Branco. M: Marcador de peso molecular.

Com o emprego dos iniciadores propostos 45,45% foram confirmadas como *V. fluvialis* e 48,05% como *V. furnisii*, 11,7% não puderam ser confirmadas utilizando os iniciadores desenhados no presente estudo e foram submetidas ao seqüenciamento do fragmento 16S para confirmação do posicionamento taxonômico. No Quadro 3, é possível observar que dos 77 isolados inicialmente identificados utilizando métodos fenotípicos como *V. fluvialis*, 35 foram confirmados como pertencentes à essa espécie quando foi utilizado a PCR com iniciadores específicos enquanto que 32 foram identificados como *V. furnisii*, e 1 isolado como *Aeromonas hydrophila*. Com relação às 5 cepas identificadas fenotipicamente como *V. furnisii*, molecularmente, 4 confirmaram pertencer a esta espécie ao passo que 1 foi

identificada como *V. fluvialis*. Ao todo, 9 cepas não foram identificadas pela PCR. Porém, quando a reação foi realizada novamente com os purificados dessas cepas, os *V. fluvialis* apresentaram resultado positivo.

A figura 3 apresenta o posicionamento filogenético dos isolados que foram sequenciados no presente estudo.

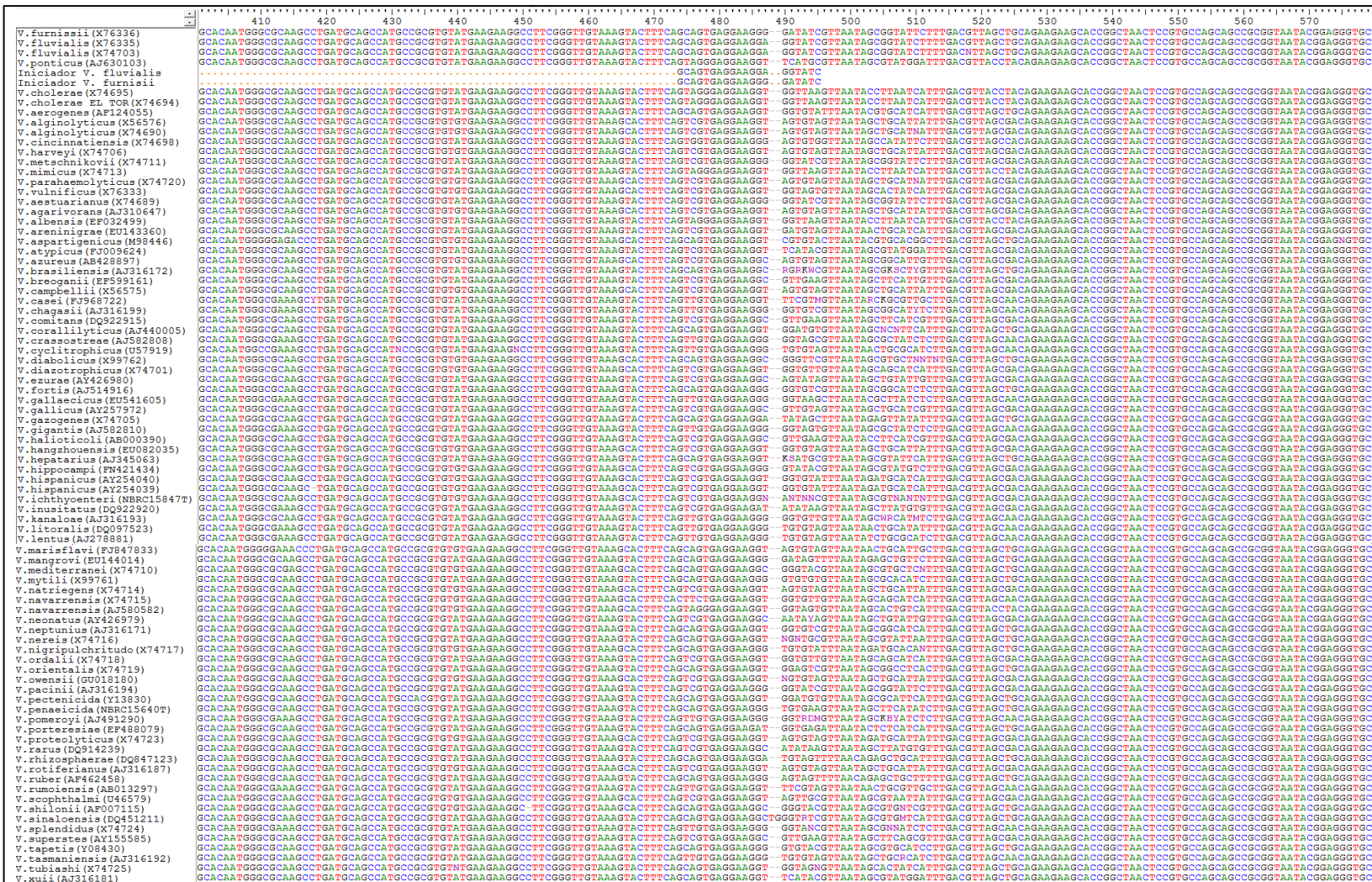


Figura 1 – Alinhamento das sequências de 16S rRNA das espécies de *Vibrio*. Os iniciadores VFLU e VFUR específicos para identificação de *V. fluvialis* e *V. furnissii*, respectivamente, também estão presentes.

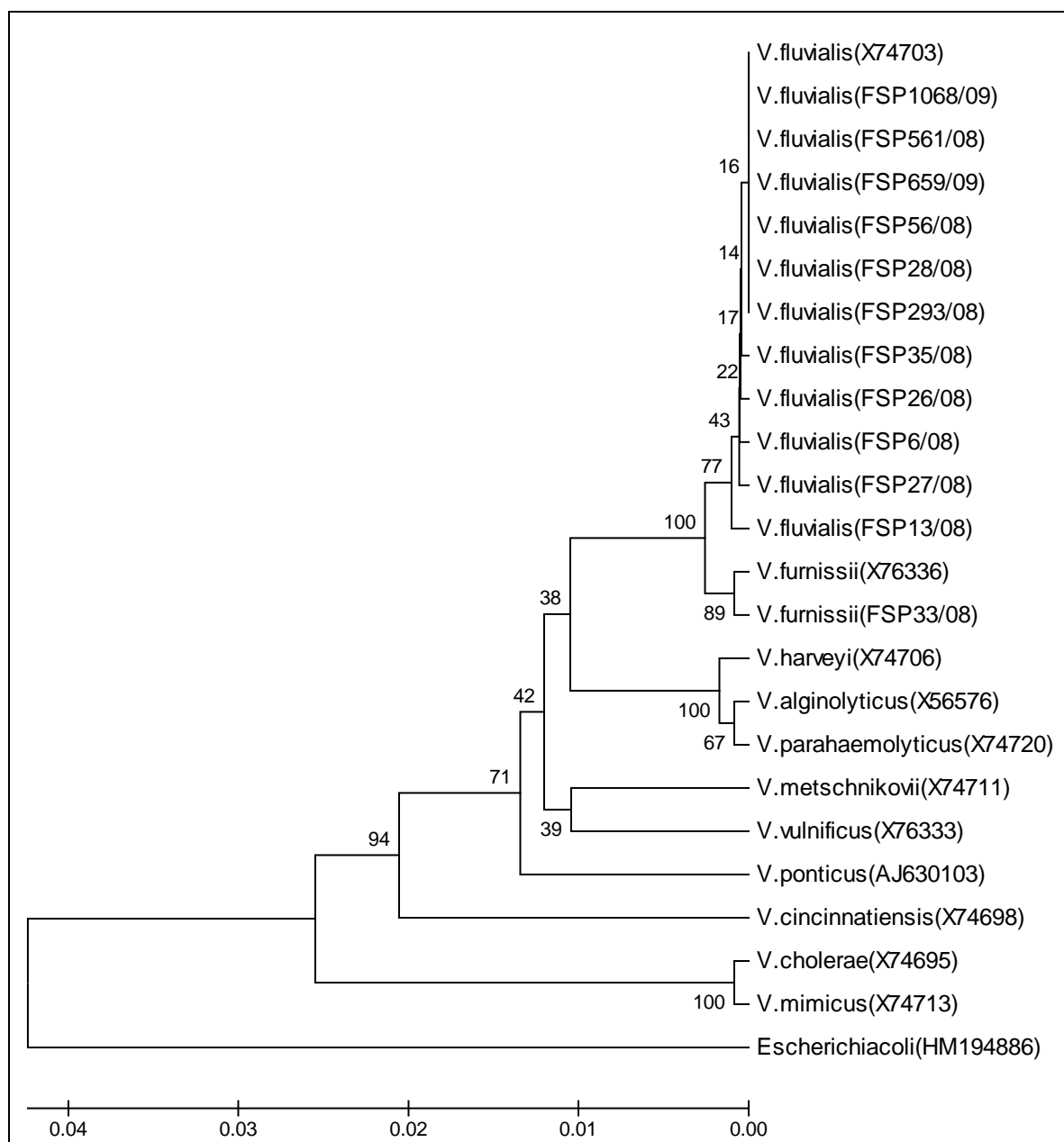


Figura 3 – Árvore filogenética baseada no método UPGMA utilizando as sequências do 16S rRNA das cepas-tipo patogênicas de *Vibrio* e das oriundas do banco de dados da Faculdade de Saúde Pública da USP. Estimativa de distâncias foi obtida pelo modelo de Jukes e Cantor. Como *outgroup* foi utilizada a sequência de *Escherichia coli* HM 194886.

Quadro 3 - Identificação fenotípica e molecular com origem e ano do isolamento de *Vibrio fluvialis* e *V. furnisii* provenientes de diferentes fontes

Identificação	Identificação Fenotípica	Identificação por PCR	Sequenciamento	Origem e Ano
FSP 8/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 38/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 561/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	<i>V. fluvialis</i> ⁺	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 67/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 28/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	<i>V. fluvialis</i> ⁺	Esgoto Bruto, 2006
FSP 29/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Clínica, 2007**
FSP 279/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 39/08	<i>V. furnisii</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 41/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 42/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 44/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 291/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 292/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 30/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 283/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 281/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 663/09	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 24/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 675/09	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Esgoto Bruto, 1996 ^b
FSP 560/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2001 ^d
FSP 288/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2001 ^d
FSP 47/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2001 ^d
FSP 49/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 51/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 52/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 53/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 54/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 57/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 59/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 60/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 61/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 66/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 290/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 36/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1990 ^a
FSP 55/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 01/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 26/08	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 35/08	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Molusco Bivalve, 1989 ^a

Continua

Quadro 3 - Identificação fenotípica e molecular com origem e ano do isolamento de *Vibrio fluvialis* e *V. furnissii* provenientes de diferentes fontes (Continuação)

Identificação	Identificação Fenotípica	Identificação por PCR	Sequenciamento	Origem e Ano
FSP 293/08	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 13/08	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 27/08	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 56/08	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 659/09	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Esgoto Bruto, 1996 ^b
FSP 1068/09	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>V. fluvialis</i> *	Água Marinha, 2005 ^c
FSP 1069/09	<i>V. fluvialis</i>	Negativa	<i>A. hydrophila</i> *	Água Marinha, 2005 ^c
FSP 6/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	<i>V. fluvialis</i> ⁺	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 287/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2001 ^d
FSP 9/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 2/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 4/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 32/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 31/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 19/08	<i>V. furnissii</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 12/08	<i>V. furnissii</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 567/09	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 18/08	<i>V. furnissii</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 20/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 21/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 33/08	<i>V. furnissii</i>	Positiva	<i>V. furnissii</i> ⁺	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 37/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 40/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 43/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 45/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 3/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 5/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 14/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 22/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 25/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 11/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 17/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 295/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 296/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 299/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 10/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 50/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d

Continua

Quadro 3 - Identificação fenotípica e molecular com origem e ano do isolamento de *Vibrio fluvialis* e *V. furnisii* provenientes de diferentes fontes (Continuação)

Identificação	Identificação Fenotípica	Identificação por PCR	Sequenciamento	Origem e Ano
FSP 58/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 62/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 63/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 64/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 65/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 2002 ^d
FSP 16/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a
FSP 294/08	<i>V. fluvialis</i>	Positiva	NR	Molusco Bivalve, 1989 ^a

*Identificado pelo sequenciamento

**Isolado de fezes humanas conjuntamente com rotavírus.

⁺Realizado seqüenciamento para confirmação do resultado na PCR.

NR: Não realizado.

^aLocais descritos em Matté, 1993.

^bColetado em Barueri – SP.

^cSob Ponte Pontal da Cruz, São Sebastião – SP

^dLocais descritos em Barboni, 2003.

3.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Todos os isolados de *V. fluvialis* foram sensíveis a tetraciclina, cotrimoxazol, cloranfenicol e ciprofloxacina. Dentre os resistentes, foram observadas as seguintes porcentagens: ampicilina (61,54%), cefalotina (76,92%), cefepima (30,77%), cefotaxima (10,26%), cefoxitina (25,64%), meropenem (2,56%), gentamicina (15,38%), estreptomicina (15,38%) e ácido nalidíxico (15,38%), sendo que 65,9% eram resistentes a dois antibióticos pelo menos.

Os isolados de *V. furnisii* foram sensíveis a tetraciclina, cotrimoxazol, cloranfenicol, meropenem e ciprofloxacina. Observando-se apenas os isolados com resistência, obtivemos as

seguintes porcentagens: ampicilina (35,16%), cefalotina (56,76%), cefepima (10,81%), cefotaxima (5,4%), ceftioxina (10,81%), gentamicina (13,51%), estreptomicina (18,92%) e ácido nalidíxico (2,7%), sendo que 43,24% eram resistentes a dois antimicrobianos pelo menos.

Os resultados obtidos no teste de disco difusão para os isolados utilizados nesse estudo estão apresentados nos Quadros 4 e 5.

Quadro 4 – Perfil de resistência a antibióticos observados no teste de disco difusão para os isolados de *V. fluvialis*

Identificação	Tamanho dos halos (em mm) dos antibióticos												
	AMP	CFL	TET	SUT	CLO	CPM	CTX	CFO	MER	GEN	EST	CIP	NAL
FSP 8/08	(26)S	(24)S	(24)S	(30)S	(36)S	(32)S	(36)S	(16)I	(30)S	(22)S	(18)S	(28)S	(6)R
FSP 38/08	(8)R	(6)R	(22)S	(32)S	(32)S	(30)S	(30)S	(22)S	(28)S	(20)S	(6)R	(34)S	(12)R
FSP 561/08	(6)R	(6)R	(24)S	(32)S	(34)S	(6)R	(26)S	(14)R	(30)S	(20)S	(22)S	(28)S	(26)S
FSP 67/08	(22)S	(26)S	(22)S	(30)S	(36)S	(14)R	(30)S	(20)S	(28)S	(12)R	(12)I	(34)S	(30)S
FSP 28/08	(6)R	(6)R	(22)S	(38)S	(32)S	(6)R	(6)R	(6)R	(10)R	(24)S	(24)S	(42)S	(30)S
FSP 29/08	(14)I	(6)R	(24)S	(32)S	(34)S	(30)S	(32)S	(22)S	(28)S	(22)S	(22)S	(>42)S	(34)S
FSP 279/08	(28)S	(12)R	(26)S	(32)S	(32)S	(30)S	(38)S	(26)S	(36)S	(26)S	(26)S	(42)S	(24)S
FSP 39/08	(26)S	(36)S	(30)S	(42)S	(38)S	(38)S	(>42)S	(28)S	(36)S	(26)S	(24)S	(>42)S	(38)S
FSP 41/08	(10)R	(6)R	(22)S	(28)S	(30)S	(24)S	(32)S	(22)S	(30)S	(20)S	(20)S	(36)S	(6)R
FSP 42/08	(6)R	(6)R	(24)S	(32)S	(32)S	(30)S	(12)R	(12)R	(34)S	(18)S	(18)S	(32)S	(30)S
FSP 44/08	(24)S	(18)S	(28)S	(38)S	(38)S	(36)S	(>42)S	(28)S	(36)S	(24)S	(24)S	(42)S	(36)S
FSP 291/08	(26)S	(6)R	(24)S	(32)S	(32)S	(34)S	(40)S	(24)S	(32)S	(18)S	(20)S	(36)S	(18)I
FSP 292/08	(26)S	(6)R	(24)S	(34)S	(32)S	(32)S	(38)S	(22)S	(32)S	(24)S	(20)S	(38)S	(32)S
FSP 30/08	(12)R	(6)R	(26)S	(24)S	(36)S	(10)R	(38)S	(12)R	(32)S	(18)S	(18)S	(42)S	(36)S
FSP 283/08	(12)R	(20)S	(30)S	(34)S	(40)S	(6)R	(40)S	(20)S	(32)S	(12)R	(14)I	(40)S	(34)S
FSP 281/08	(8)R	(12)R	(24)S	(32)S	(20)S	(8)R	(6)R	(8)R	(28)S	(20)S	(20)S	(30)S	(6)R
FSP 663/09	(12)R	(6)R	(22)S	(32)S	(34)S	(22)S	(32)S	(22)S	(32)S	(22)S	(20)S	(>42)S	(32)S
FSP 24/08	(28)S	(6)R	(26)S	(34)S	(36)S	(30)S	(18)I	(24)S	(34)S	(26)S	(26)S	(36)S	(34)S
FSP 675/09	(12)R	(6)R	(22)S	(34)S	(34)S	(26)S	(10)R	(6)R	(30)S	(22)S	(24)S	(42)S	(14)I
FSP 560/08	(34)S	(>42)S	(28)S	(20)S	(32)S	(40)S	(40)S	(36)S	(>42)S	(30)S	(22)S	(22)S	(12)R
FSP 288/08	(12)R	(6)R	(24)S	(36)S	(34)S	(18)S	(18)I	(14)R	(32)S	(20)S	(20)S	(40)S	(32)S

Continua

Quadro 4 – Perfil de resistência a antibióticos observados no teste de disco difusão para os isolados de *V. fluvialis* (Continuação)

Tamanho dos halos (em mm) dos antibióticos													
Identificação	AMP	CFL	TET	SUT	CLO	CPM	CTX	CFO	MER	GEN	EST	CIP	NAL
FSP 47/08	(28)S	(42)S	(28)S	(40)S	(38)S	(30)S	(>42)S	(30)S	(>42)S	(20)S	(26)S	(>42)S	(36)S
FSP 49/08	(24)S	(26)S	(24)S	(32)S	(34)S	(6)R	(36)S	(26)S	(34)S	(22)S	(18)S	(36)S	(38)S
FSP 51/08	(24)S	(24)S	(30)S	(34)S	(30)S	(12)R	(40)S	(28)S	(34)S	(24)S	(24)S	(>42)S	(36)S
FSP 52/08	(22)S	(28)S	(26)S	(38)S	(36)S	(16)I	(38)S	(24)S	(32)S	(18)S	(20)S	(42)S	(36)S
FSP 53/08	(28)S	(6)R	(20)S	(30)S	(30)S	(24)S	(38)S	(20)S	(28)S	(20)S	(6)R	(42)S	(34)S
FSP 54/08	(6)R	(6)R	(20)S	(30)S	(30)S	(14)R	(22)S	(14)R	(26)S	(14)I	(16)S	(24)S	(24)S
FSP 57/08	(18)S	(20)S	(22)S	(32)S	(36)S	(16)I	(28)S	(20)S	(30)S	(18)S	(16)S	(38)S	(32)S
FSP 59/08	(26)S	(28)S	(26)S	(32)S	(34)S	(36)S	(>42)S	(24)S	(32)S	(22)S	(22)S	(42)S	(32)S
FSP 60/08	(26)S	(28)S	(26)S	(36)S	(34)S	(36)S	(>42)S	(26)S	(32)S	(12)R	(18)S	(42)S	(32)S
FSP 61/08	(26)S	(28)S	(24)S	(34)S	(36)S	(14)R	(36)S	(24)S	(32)S	(8)R	(10)R	(42)S	(36)S
FSP 66/08	(6)R	(6)R	(24)S	(32)S	(32)S	(32)S	(34)S	(22)S	(28)S	(20)S	(22)S	(40)S	(30)S
FSP 290/08	(6)R	(6)R	(24)S	(32)S	(32)S	(20)S	(18)I	(18)S	(30)S	(20)S	(20)S	(42)S	(32)S
FSP 36/08	(6)R	(14)R	(24)S	(28)S	(34)S	(24)S	(38)S	(22)S	(30)S	(18)S	(18)S	(36)S	(32)S
FSP 55/08	(6)R	(6)R	(22)S	(26)S	(32)S	(18)S	(26)S	(16)I	(26)S	(18)S	(6)R	(32)S	(20)S
FSP 01/08	(6)R	(6)R	(26)S	(36)S	(30)S	(20)S	(26)S	(24)S	(32)S	(20)S	(6)R	(36)S	(30)S
FSP 26/08	(6)R	(12)R	(22)S	(34)S	(32)S	(38)S	(38)S	(28)S	(32)S	(22)S	(22)S	(40)S	(32)S
FSP 35/08	(6)R	(6)R	(26)S	(36)S	(34)S	(34)S	(32)S	(26)S	(30)S	(30)S	(24)S	(42)S	(32)S
FSP 293/08	(8)R	(6)R	(24)S	(36)S	(36)S	(14)R	(36)S	(22)S	(34)S	(20)S	(22)S	(38)S	(16)I
FSP 13/08	(6)R	(6)R	(24)S	(30)S	(30)S	(34)S	(34)S	(12)R	(32)S	(12)R	(24)S	(36)S	(36)S
FSP 27/08	(6)R	(6)R	(22)S	(28)S	(30)S	(6)R	(16)I	(8)R	(28)S	(12)R	(22)S	(34)S	(32)S
FSP 56/08	(6)R	(6)R	(26)S	(36)S	(36)S	(18)S	(>42)S	(14)I	(32)S	(20)S	(22)S	(36)S	(32)S
FSP 659/09	(6)R	(6)R	(24)S	(36)S	(34)S	(30)S	(22)S	(22)S	(30)S	(26)S	24	(42)S	(34)S
FSP 1068/09	(16)I	(6)R	(22)S	(30)S	(28)S	(20)S	(28)S	(24)S	(26)S	(24)S	(12)R	(32)S	(12)R

Ampicilina 10µg (AMP); Cefalotina 30µg (CFL); Tetraciclina 30µg (TET); Sulfametoxazol-Trimetoprim 25µg (SUT); Cloranfenicol 30µg (CLO); Cefepima 30µg (CPM); Cefotaxima 30µg (CTX); Cefoxitima 30µg (CFO); Meropenem 10µg (MER); Gentamicina 10µg (GEN); Estreptomomicina 10µg (EST); Ciprofloxacin 5µg (CIP); Ácido Nalidíxico 30µg (NAL). S: Sensível; I: Intermediária; R: Resistente.

Quadro 5 - Perfil de resistência a antibióticos observados no teste de disco difusão para os isolados das cepas de *V. furnissii*

Identificação	Tamanho dos halos (em mm) dos antibióticos												
	AMP	CFL	TET	SUT	CLO	CPM	CTX	CFO	MER	GEN	EST	CIP	NAL
FSP 6/08	(12)R	(6)R	(24)S	(30)S	(36)S	(26)S	(30)S	(22)S	(30)S	(22)S	(10)R	(>42)S	(36)S
FSP 287/08	(24)S	(22)S	(24)S	(32)S	(34)S	(34)S	(40)S	(24)S	(30)S	(20)S	(14)I	(30)S	(24)S
FSP 9/08	(34)S	(32)S	(24)S	(38)S	(38)S	(38)S	(>42)S	(30)S	(28)S	(26)S	(26)S	(40)S	(36)S
FSP 2/08	(16)I	(6)R	(24)S	(36)S	(30)S	(36)S	(40)S	(14)R	(34)S	(26)S	(18)S	(36)S	(24)S
FSP 4/08	(28)S	(30)S	(24)S	(36)S	(34)S	(36)S	(>42)S	(26)S	(28)S	(24)S	(10)R	(40)S	(34)S
FSP 32/08	(12)R	(6)R	(22)S	(30)S	(32)S	(28)S	(28)S	(22)S	(24)S	(22)S	(16)S	(30)S	(10)R
FSP 31/08	(28)S	(6)R	(24)S	(32)S	(32)S	(32)S	(32)S	(26)S	(32)S	(20)S	(22)S	(30)S	(30)S
FSP 19/08	(6)R	(6)R	(26)S	(38)S	(36)S	(34)S	(38)S	(22)S	(34)S	(16)S	(16)S	(36)S	(32)S
FSP 12/08	(6)R	(6)R	(26)S	(32)S	(32)S	(32)S	(32)S	(22)S	(32)S	(22)S	(14)I	(30)S	(28)S
FSP 567/09	(14)I	(6)R	(24)S	(32)S	(36)S	(30)S	(26)S	(20)S	(30)S	(20)S	(20)S	(42)S	(34)S
FSP 18/08	(20)S	(26)S	(24)S	(32)S	(36)S	(36)S	(40)S	(24)S	(30)S	(22)S	(22)S	(38)S	(32)S
FSP 20/08	(24)S	(24)S	(20)S	(26)S	(30)S	(34)S	(38)S	(20)S	(24)S	(20)S	(20)S	(36)S	(32)S
FSP 21/08	(24)S	(24)S	(24)S	(28)S	(34)S	(36)S	(42)S	(22)S	(26)S	(22)S	(22)S	(34)S	(30)S
FSP 33/08	(20)S	(26)S	(24)S	(32)S	(32)S	(28)S	(32)S	(22)S	(30)S	(24)S	(24)S	(34)S	(32)S
FSP 37/08	(28)S	(30)S	(26)S	(34)S	(36)S	(36)S	(>42)S	(28)S	(34)S	(22)S	(22)S	(42)S	(32)S
FSP 40/08	(18)S	(26)S	(26)S	(38)S	(36)S	(38)S	(>42)S	(24)S	(34)S	(18)S	(26)S	(42)S	(36)S
FSP 43/08	(12)R	(6)R	(26)S	(38)S	(36)S	(30)S	(34)S	(22)S	(34)S	(24)S	(12)R	(42)S	(34)S
FSP 45/08	(10)R	(6)R	(24)S	(34)S	(36)S	(16)I	(24)S	(18)S	(30)S	(24)S	(20)S	(40)S	(32)S
FSP 3/08	(28)S	(30)S	(26)S	(32)S	(42)S	(36)S	(>42)S	(24)S	(36)S	(22)S	(26)S	(>42)S	(38)S
FSP 5/08	(24)S	(36)S	(30)S	(32)S	(32)S	(36)S	(40)S	(22)S	(36)S	(18)S	(10)R	(30)S	(36)S
FSP 14/08	(8)R	(6)R	(26)S	(26)S	(32)S	(32)S	(32)S	(20)S	(28)S	(10)R	(14)I	(30)S	(28)S
FSP 22/08	(8)R	(6)R	(24)S	(26)S	(32)S	(32)S	(32)S	(18)S	(32)S	(12)R	(18)S	(38)S	(34)S

Continua

Quadro 5 - Perfil de resistência a antibióticos observados no teste de disco difusão para os isolados das cepas de *V. furnissii* (Continuação)

Identificação	Tamanho dos halos (em mm) dos antibióticos												
	AMP	CFL	TET	SUT	CLO	CPM	CTX	CFO	MER	GEN	EST	CIP	NAL
FSP 25/08	(10)R	(6)R	(24)S	(30)S	(34)S	(14)R	(26)S	(22)S	(30)S	(12)R	(16)S	(36)S	(32)S
FSP 11/08	(6)R	(6)R	(22)S	(36)S	(36)S	(10)R	(8)R	(10)R	(32)S	(12)R	(12)R	(24)S	(30)S
FSP 17/08	(14)I	(6)R	(24)S	(30)S	(32)S	(10)R	(28)S	(16)I	(30)S	(12)R	(14)I	(38)S	(36)S
FSP 295/08	(22)S	(8)R	(26)S	(32)S	(34)S	(34)S	(36)S	(22)S	(26)S	(22)S	(22)S	(38)S	(32)S
FSP 296/08	(22)S	(26)S	(22)S	(32)S	(32)S	(32)S	(38)S	(24)S	(28)S	(20)S	(10)R	(34)S	(30)S
FSP 299/08	(22)S	(26)S	(24)S	(32)S	(30)S	(32)S	(36)S	(22)S	(28)S	(20)S	(6)R	(38)S	(32)S
FSP 10/08	(26)S	(28)S	(24)S	(36)S	(34)S	(32)S	(40)S	(32)S	(30)S	(22)S	(14)I	(38)S	(34)S
FSP 50/08	(24)S	(24)S	(24)S	(40)S	(34)S	(36)S	(40)S	(18)S	(30)S	(14)I	(26)S	(>42)S	(34)S
FSP 58/08	(6)R	(6)R	(26)S	(38)S	(38)S	(26)S	(10)R	(6)R	(38)S	(24)S	(26)S	(42)S	(36)S
FSP 62/08	(8)R	(6)R	(20)S	(30)S	(30)S	(32)S	(30)S	(14)R	(30)S	(20)S	(18)S	(30)S	(24)S
FSP 63/08	(6)R	(6)R	(24)S	(34)S	(34)S	(30)S	(20)I	(22)S	(32)S	(20)S	(24)S	(36)S	(30)S
FSP 64/08	(24)S	(24)S	(24)S	(36)S	(36)S	(28)S	(38)S	(20)S	(34)S	(22)S	(38)S	(42)S	(36)S
FSP 65/08	(16)I	(6)R	(24)S	(34)S	(32)S	(12)R	(28)S	(16)I	(32)S	(20)S	(24)S	(34)S	(28)S
FSP 16/08	(18)S	(6)R	(26)S	(30)S	(36)S	(32)S	(32)S	(24)S	(34)S	(26)S	(26)S	(38)S	(30)S
FSP 294/08	(26)S	(14)R	(24)S	(34)S	(34)S	(36)S	(38)S	(24)S	(30)S	(20)S	(14)I	(42)S	(30)S

Ampicilina 10µg (AMP); Cefalotina 30µg (CFL); Tetraciclina 30µg (TET); Sulfametoxazol-Trimetoprim 25µg (SUT); Cloranfenicol 30µg (CLO); Cefepima 30µg (CPM); Cefotaxima 30µg (CTX); Cefoxitima 30µg (CFO); Meropenem 10µg (MER); Gentamicina 10µg (GEN); Estreptomicina 10µg (EST); Ciprofloxacina 5µg (CIP); Ácido Nalidíxico 30µg (NAL). S: Sensível; I: Intermediária; R: Resistente.

3.3 DETECÇÃO DO SXT E SEUS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Todos os isolados foram submetidos à reação de PCR utilizando os iniciadores para detecção do sítio *attP* e o gene *int SXT*. Apenas o isolado número FSP 561/08 foi positivo (Figura 4). Para os genes de resistência do elemento SXT, houve somente um fragmento de alto peso molecular quando utilizados os iniciadores para o gene *sulII* (Figura 5). Após o sequenciamento do fragmento, a sequência não demonstrou nenhuma homologia com a sequência originalmente descrita.

A figura 6 apresenta o posicionamento filogenético para o gene *int* sequenciado da cepa positiva no presente estudo.

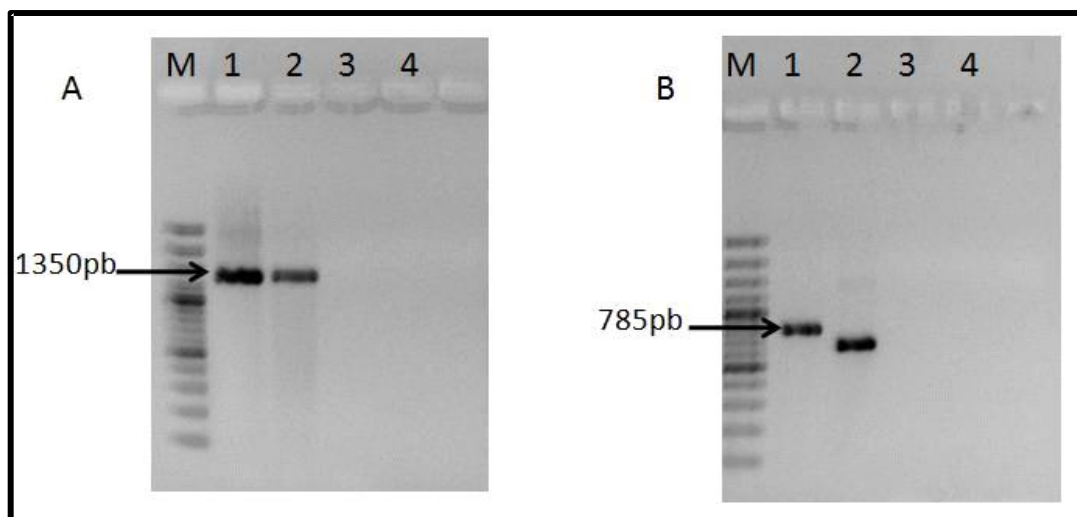


Figura 4 – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose. **A)** Iniciadores para gene *int SXT*. **B)** Iniciadores para o sítio *attP*. **Para A e B:** Coluna 1: *V. cholerae* O139 (Controle

positivo SXT). Coluna 2: *V. fluvialis* (FSP 561/08). Coluna 3: Controle *V. fluvialis* (FSP 29/08). Coluna 4: Branco. M: Marcador de peso molecular.

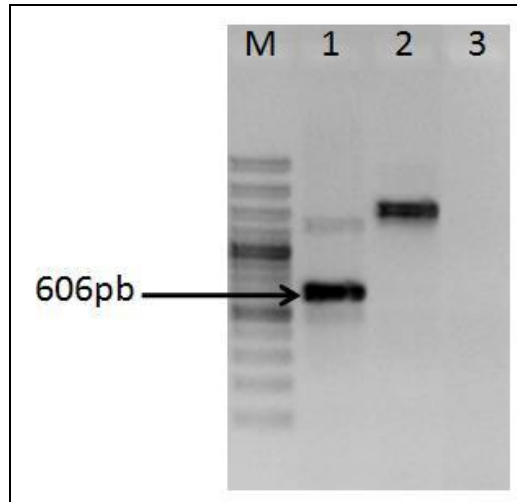


Figura 5 – Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose. Iniciadores para gene *sultII* do SXT. Coluna 1: *V. cholerae* O139 (Controle positivo SXT). Coluna 2: *V. fluvialis* (FSP 561/08). Coluna 3: Branco. M: Marcador de peso molecular.

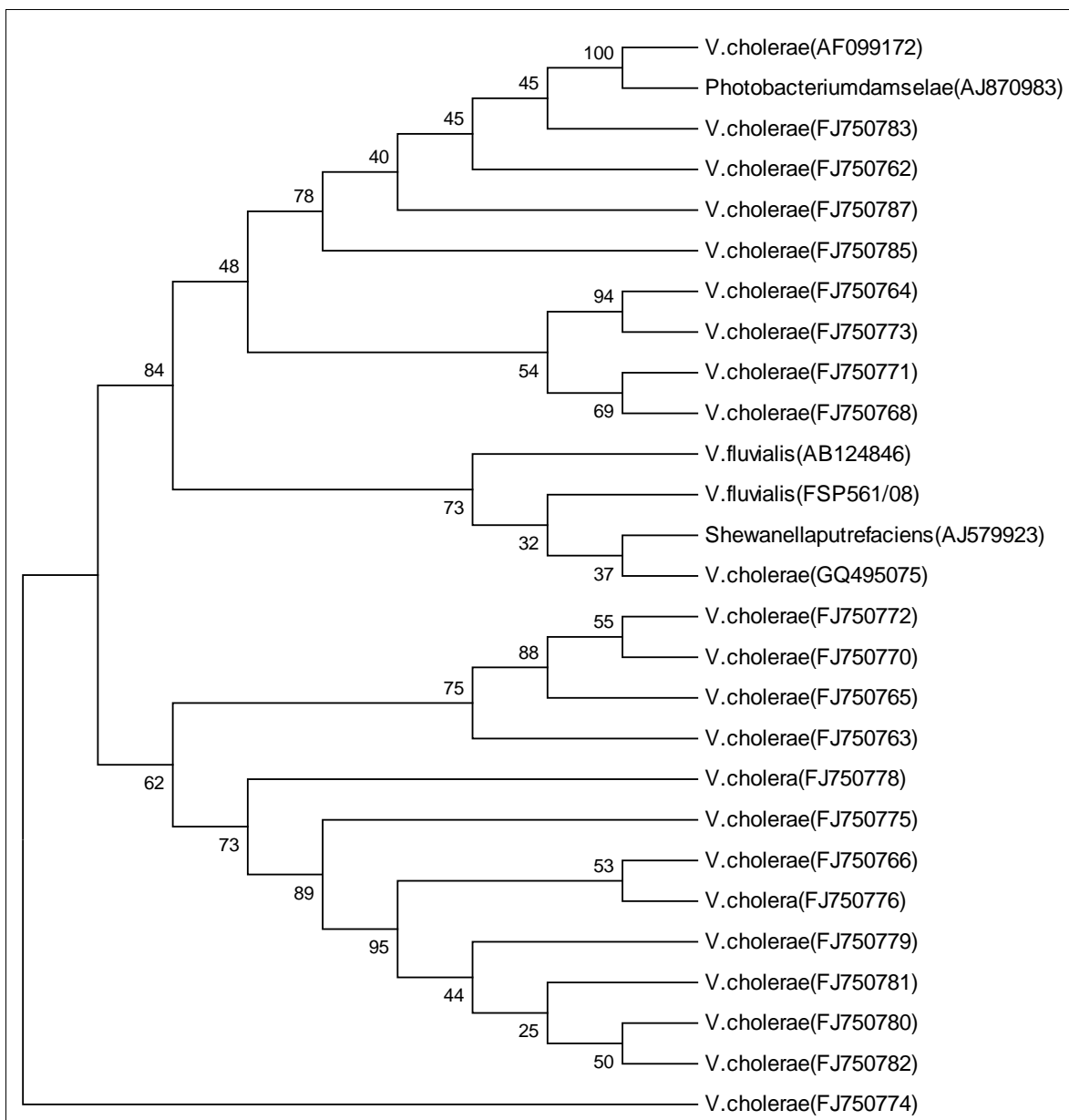


Figura 6 – Árvore filogenética baseada no método UPGMA utilizando as seqüências do gene *int* relacionadas aos ICEs já descritos e da oriunda do banco de dados da Faculdade de Saúde Pública da USP. Estimativa de distâncias foi obtida pelo modelo de Jukes e Cantor.

4 DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Vibrio fluvialis é um microrganismo que provoca gastroenterite similar à cólera, no entanto existem relatos de casos extra-intestinais, como sepse (LAI *et al*, 2006), peritonite (RATNAJARA *et al*, 2005; LEE *et al*, 2008) e lesão cutânea (TSAI *et al*, 2004). Acredita-se que sua infecção esteja relacionada com o consumo de peixe e/ou frutos-do-mar crus ou mal-cozidos (MAUGERI *et al*, 2000; BUTT *et al*, 2004). Os resultados mostram que um grande número de cepas que foram classificadas fenotipicamente como *V. fluvialis*, eram *V. furnissii* e uma *Aeromonas hydrophila*, confirmando que a identificação por métodos fenotípicos dessas espécies ainda é um desafio devido à grande similaridade entre elas (HICKMAN-BRENNER *et al*, 1984; DALSGAARD *et al*, 1997). O diagnóstico feito por identificação bioquímica requer um grande gasto de tempo (NANDI *et al*, 2000), é considerada uma técnica subjetiva devido à possível variação das condições do meio, da inoculação e da incubação; o que pode afetar os resultados (ABBOTT *et al*, 2003). Além disso, as vibrioses não são facilmente identificadas na rotina dos laboratórios clínicos (OKEY *et al*, 2003; LEE *et al*, 2008; LAGO *et al*, 2009).

A diferenciação das espécies que fizeram parte deste estudo é de grande valia do ponto de vista clínico e epidemiológico. *V. fluvialis* é um patógeno que está adquirindo importância para a saúde pública. Já *V. furnissii*, apesar de já ter sido isolado de pacientes com diarreia e/ou gastroenterite (BRENNER *et al*, 1983), ainda não tem seu papel elucidado nesses casos. Contudo, nos últimos anos, têm aumentado o número de infecções provocadas por microrganismos que eram

inicialmente considerados não-patogênicos, demonstrando que bactérias ambientais representam risco potencial para a saúde pública (BAQUERO *et al* , 2008; MARTÍNEZ *et al*, 2008).

Considerando o alto nível de similaridade da região 16S rRNA entre as espécies do gênero *Vibrio*, outros genes são propostos como marcadores para a diferenciação das espécies principalmente para a descrição de novas espécies.

CHAKRABORTY *et al* (2006) desenvolveram um método de identificação baseado no *toxR*. MAEDA *et al* em 2000, demonstraram que espaço intergênico 16S - 23S rRNA apresentam mais variações do que os genes 16S rRNA, permitindo discriminação entre as espécies de *Vibrio*. KWOK *et al* (2002) desenvolveram iniciadores tendo como alvo o gene *hsp60* enquanto que THOMPSON *et al* (2005) estabeleceram iniciadores para a família *Vibrionaceae* utilizando os genes *rpoA*, *recA* e *pyrH*, método conhecido como MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*).

Porém, nos trabalhos realizados por URBANCZYK *et al* (2007) e RAMESHKUMAR *et al* (2008), o uso do MLSA foi considerado desnecessário pois as relações filogenéticas poderiam ser sustentadas apenas com o a utilização do gene 16S rRNA (PASCUAL *et al*, 2010).

Apesar de esses marcadores serem considerados apropriados para se diferenciar espécies proximamente relacionadas do gênero *Vibrio*, o gene 16S rRNA possui um banco de dados mais vasto disponível para a realização de comparações, tornando possível inferir relações entre os diferentes grupos. Além disso, diferentemente da rotina laboratorial, a necessidade da combinação de distintas estratégias para a confirmação da posição taxonômica geralmente ocorre para a descrição de uma nova espécie ou para estudos taxonômicos (UEHARA, 2008).

Na rotina laboratorial clínica, a pesquisa por um microrganismo é feita a partir da cultura e da triagem fenotípica dos isolados para sua identificação prévia. O mesmo procedimento foi realizado no presente estudo, os iniciadores foram utilizados apenas para confirmação da espécie e para diferenciação entre *Vibrio fluvialis* e *Vibrio furnissii*; pois a presença de gás, teste que diferencia rapidamente as duas espécies, é muito discreta e pode não ser percebida no meio de triagem utilizado (Kliger Iron Agar). Fazendo uso do gene 16S rRNA foi possível confirmar a diferenciação das duas, sendo que a região utilizada permitiu a visualização de diferenças entre as cepas potencialmente patogênicas de *Vibrio* que são normalmente alvo da rotina laboratorial na clínica (Figuras 1 e 3), separando não somente as duas espécies de interesse clínico, *V. fluvialis* e *V. furnissii*, mas também diferenciando essas duas espécies de *Vibrio ponticus* que, embora não seja fenotipicamente relacionado a essas espécies, é geneticamente próximo quando comparados o gene 16S rRNA (MACIÁN *et al*, 2004; Figura 1).

Neste estudo, iniciadores, tendo como alvo o 16S rRNA, foram desenvolvidos como ferramentas capazes de detectar *V. fluvialis* e *V. furnissii*, corroborando com os trabalhos de SAULNIER *et al* (2000), OAKEY *et al* (2003) e AVENDAÑO-HERRERA *et al* (2004) que afirmam que o método genotípico é uma alternativa eficaz e rápida para a identificação de espécies, principalmente em isolados altamente relacionados (LAGO *et al*, 2009). Com esses resultados, fica claro que a maior acessibilidade das técnicas moleculares para a caracterização bacteriana aumenta a acurácia da diversidade e complexidade nesses microrganismos se comparados com os métodos de cultivo (BAQUERO *et al*, 2008). Nossos resultados

indicam que o uso do 16S rRNA pode ser usado como um complemento aos métodos microbiológicos e bioquímicos para a detecção desses vibrios pouco estudados.

4.2 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Neste estudo foram relatados fenótipos de resistência a antimicrobianos em *V. fluvialis* isolados principalmente do meio ambiente. Foi observada uma alta porcentagem de múltipla resistência (65,9%), sendo que houve prevalência de resistência à ampicilina (82,76%) e cefalotina (82,21%), que pertencem à classe dos beta-lactâmicos, antibióticos preferencialmente utilizados no tratamento de doenças infecciosas (BUSH e JACOBY, 2010). A hidrólise desses antimicrobianos por enzimas, as beta-lactamases, é o mecanismo de resistência mais comum em bactérias Gram-negativas e têm um papel crítico na seleção da terapia apropriada (BUSH e JACOBY, 2010).

Os genes responsáveis geralmente residem em cromossomos ou plasmídios (RAJPARA *et al*, 2009; BUSH e JACOBY, 2010). Já foram detectados alguns genes em espécies do gênero *Vibrio* que codificam a produção de enzimas beta-lactamases: em *V. cholerae* foram relatados *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SAR-1} e *bla*_{CARB-6} (CHOURY *et al*, 1999), *bla*_{CARB-7} (MELANO *et al*, 2002), *bla*_{CARB-9} (PETRONI *et al*, 2004), *bla*_{CTX-M} e *bla*_{PER-2} (PETRONI *et al*, 2002), *bla*_{CTX-M-2} (BISTUÉ *et al*, 2006) e, em *V. harveyi*, *bla*_{VHW-1} e *bla*_{VHH-1} (TEO *et al*, 2000). Apesar de a produção enzimática ser a forma de resistência mais comum em bactérias, NGUYEN *et al* (2009) descreveram dois mecanismos em *V. cholerae* que conferem resistência a ampicilina que independem dessas enzimas. Observando esses dados, podemos afirmar que o número de estudos

sobre a base molecular em *Vibrio* ainda é escassa, pois atualmente há 80 espécies e 2 subespécies descritas pertencentes a esse gênero (<http://www.vibriobiology.net/>, acesso em 02/07/2010), sendo que 12 são consideradas patogênicas ou potencialmente patogênicas ao homem (FARMER III e JANDA, 2005).

A resistência aos aminoglicosídeos, como estreptomicina e gentamicina, foi descrita pela primeira vez em espécies de *Vibrio* isolados em 1992 (WALDOR *et al*, 1996) e se dá, principalmente, pela produção de enzimas. Desde então, foram descritos os seguintes genes em *V. cholerae*: *ant-1a* (ADABI *et al*, 2009), *addB* e *aac(6)* (DALGAARD *et al* 2000) e *aadA1* (EHARA *et al*, 2005). O gene *strA* é geralmente encontrado no ICE SXT (AHMED *et al*, 2005), contudo esse gene não foram detectados neste estudo, o que nos leva a supor que um outro gene capaz de conferir a mesma característica esteja presente, como já foi descrito por AHMED *et al* (2004), ou há envolvimento de um outro mecanismo.

Neste trabalho, relatamos que 15,38% cepas de *V. fluvialis* demonstraram resistência ao ácido nalidíxico, que pode ter ocorrido por mutações nas regiões que determinam resistência às quinolonas (QRDRs, *quinolone region-determining regions*) dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* e/ou presença de bombas de efluxo (BARANWAL *et al*, 2002; SRINIVASAN *et al*, 2006), como as VcaM (HUDA *et al*, 2003), VcrM (PIDDOCK *et al*, 2006) e VcrAB (PUTMAN *et al*, 2000) já descritas em *V. cholerae*, e que também conferiam resistência a outras classes de antimicrobianos. Além disso, alguns produtos do gene *qnr* mostraram proteger a girase e a topoisomerase IV da ação dessa classe de antibióticos. Esses genes são geralmente encontrados em elementos genéticos móveis, como plasmídios e SXT,

porém há relatos de sua presença no cromossomo de algumas espécies de *Vibrio* (KIM *et al*, 2010).

Levando-se em consideração que os microrganismos produtores de antibióticos existentes no meio ambiente apresentam mecanismos de auto-proteção que são codificados geneticamente, admite-se que a transferência de genes de resistência de bactérias não-patogênicas ou de baixa patogenicidade para microrganismos patogênicos provavelmente é um fenômeno comum. Dessa forma, a existência de determinantes de resistência transmissíveis é anterior ao emprego dos antimicrobianos na terapêutica, supondo-se que o meio ambiente possa ser um reservatório de genes de resistência a antibióticos. O uso de antimicrobianos em seres humanos e animais possibilita o aumento da disseminação destes microrganismos quanto mais intenso for seu emprego (ALLEN *et al*, 2010).

Baseado nos resultados fenotípicos de susceptibilidade a antibióticos, concluímos que serão necessários futuros estudos moleculares para se investigar a presença e o papel dos genes na promoção da resistência antimicrobiana, e sua associação com elementos genéticos nesse patógeno emergente.

4.3 PRESENÇA DE SXT E SEUS GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

O *V. cholerae* O139, que emergiu durante 1992 e 1993, demonstrou altos níveis de resistência a cotrimoxazol e estreptomicina. WALDOR *et al* (1996) relataram a presença do elemento SXT que codificava os genes responsáveis por essas características. A integração e excisão desse elemento requer que ele

decodifique um enzima, que está relacionada às integrases dos fagos lambdóides, e que se localiza próxima à extremidade 5' do SXT (BURRUS *et al*, 2006a). Foi encontrada evidência da presença da integrase do SXT pela amplificação por PCR em apenas uma cepa. O tamanho desse gene de SXT em *V. fluvialis* descrito no trabalho de AHMED *et al* (2005) é de 1242pb, e parece que é uma variante do encontrado nas espécies de *V. cholerae*. Porém, no presente trabalho, a integrase apresentou um tamanho semelhante ao de *V. cholerae* (1350pb). Além disso, pudemos observar que a sequência difere da de *V. fluvialis* já descrita apesar de elas serem relacionadas (Figura 6).

Os mecanismos de excisão e integração do SXT necessitam da formação de um intermediário circular extra-cromossômico não replicativo, que é constituído pela recombinação de sequências curtas presentes no ICE (*attP*) e no cromossomo do hospedeiro (*attB*). Os resultados da PCR do sítio *attP* mostraram um produto de 641pb, diferente do esperado para *V. cholerae* (785pb), corroborando o estudo de AHMED *et al* (2005). De acordo com os autores, supõe-se que as diferenças de tamanho nesse sítio aconteçam por deleções e mutações durante a integração do SXT no cromossomo de *V. fluvialis*, ou que o elemento deste microrganismo seja uma variante não-derivada de *V. cholerae*.

Análises genômicas e funcionais do SXT de *V. cholerae* revelaram que este elemento parece ser uma quimera composta por genes de resistência associados a transposons, uma variedade de genes relacionados a fagos e plasmídios, assim como vários outros genes de funções ainda desconhecidas (HOCHHUT *et al*, 2001; BEABER *et al*, 2002).

O SXT codifica diferentes tipos de genes de resistência a antibióticos (WALDOR *et al*, 1996; BHANUMATHI *et al*, 2003). O exame molecular desses genes em *V. cholerae* O1 e O139 observou que eles estão localizados em uma estrutura próxima a extremidade 5' do SXT (HOCHHUT *et al*, 2001). Resultados da PCR revelaram que *V. fluvialis* do presente estudo não continha todos os genes típicos de resistência a antibióticos. Utilizando os iniciadores para amplificar *sulIII*, detectamos um fragmento com alto peso molecular e que não apresentou homologia com outro já descrito; acrescentado a esse fato não houve expressão fenotípica quanto à resistência ao cotrimoxazol. Há pesquisas apontando a existência de deleções (HOCHHUT *et al*, 2001) e ausência do cassete gênico em isolados de *V. cholerae* O139 (IWANAGA *et al*, 2004; BURRUS *et al*, 2006b). A falta de homogeneidade quanto à presença e ao tipo de genes de resistência aos antibióticos em SXT mostram que essa não é uma característica intrínseca e que, provavelmente, esse elemento deve conferir outras vantagens aos seus hospedeiros (BURRUS *et al*, 2006a). Em 2010, BORDELEAU *et al* propuseram que o grupo de ICEs SXT/R391 permite que *V. cholerae* altere seu metabolismo elevando os níveis de c-di-GMP, o que aumenta a sobrevivência de vibrios, tornando-os persistentes no ambiente aquático.

ICEs relacionados ao SXT já foram detectados no continente africano (DALSGAARD *et al*, 2000; KIIRU *et al*, 2009), asiático (EHARA *et al*, 2004; IWANAGA *et al*, 2004), na Espanha (JUIZ-RIO *et al*, 2005) e no México (BURRUS *et al*, 2006b). Até o momento não há relatos sobre a presença de SXT na América do Sul, sendo este o primeiro.

5 CONCLUSÕES

- O método molecular de identificação em espécies altamente relacionadas mostrou ser uma ferramenta importante empregada na rotina laboratorial e pode ser útil estudo epidemiológico de *Vibrio fluvialis* e *Vibrio furnisii*.
- Houve um grande número de cepas resistentes aos fármacos utilizados, sendo que a porcentagem de multiresistência também foi elevada.
- A detecção do elemento SXT sem a presença dos genes de resistência já descritos e existência de um gene desconhecido corroboram as afirmações de que os genes de resistência não são uma característica intrínseca, e que esse ICE possui um valor adaptativo que vai além da seleção e da disseminação de bactérias multiresistentes a antimicrobianos. Além disso, esse é o primeiro relato da presença desse elemento na América do Sul.
- Os resultados mostram que são necessários mais estudos moleculares para se determinar quais são os fatores envolvidos na resistência aos antibióticos.

6 REFERÊNCIAS

Adabi M, Bakhshi B, Goudarzi H, Zahraei SM, Pourshafie MR. Distribution of class I integron and sulfamethoxazole trimethoprim constin in *Vibrio cholerae* isolated from patients in Iran. *Microb Drug Resist.* 2009; 15(3):179-184.

Ahmed AM, Nakagawa T, Arakawa E, Ramamurthy T, Shinoda S, Shimamoto T. New aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Id*, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53(6):947-951.

Ahmed AM, Shinoda S, Shimamoto T. A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242(2):241-247.

Ahn SH, Han JH, Lee JH, Park KJ, Kong IS. Identification of an iron-regulated hemin-binding outer membrane protein, HupO, in *Vibrio fluvialis*: effects on hemolytic activity and the oxidative stress response. *Infection and Immunity.* 2005; 73(2): 722-729.

Ahsan CR, Sanyal SC, Zaman A, Neogy PK, Huq MI. Immunobiological relationships between *Vibrio fluvialis* and *Vibrio cholerae* enterotoxins. *Immunol Cell Biol* 1988; 66:251-252.

Alekshun M, Levy S. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell.* 2007; 128(6):1037-1050.

Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(4):251-259.

Allton DR, Forgione MA Jr, Gros SP Cholera-like presentation in *Vibrio fluvialis* enteritis. South Med J. 2006; 99(7):765-767.

Altekruse SF, Bishop RD, Baldy LM, Thompson SG, Wilson SA, Ray BJ, Griffin PM. *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. Epidemiol Infect. 2000; 124(3):489-495.

Amann RI, Ludwig W; Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 1995; 59 (1): 143-169.

Andrus CR, Walter M, Crosa JH, Payne SM. Synthesis of siderophores by pathogenic *Vibrio* species. Curr Microbiol. 1983; 9: 209-214.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Toranzo AE, Beaz R, Romalde JL. Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. Dis Aquat Organ. 2004; 62(1-2):75-83.

Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Biotechnol. 2008;19(3):260-265.

Baranwal S, Dey K, Ramamurthy T, Nair GB, Kundu M. Role of active efflux in association with target gene mutations in fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(8):2676-2678.

Barboni, SAV. Ocorrência de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos em moluscos bivalves comestíveis comercializados nos anos 2000 a 2002 nos municípios da área de influência da Baía de Todos os Santos e Valença, Bahia - Brasil.- São Paulo; 2003. 171p. Tese apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Prática de Saúde Pública para obtenção do grau de Doutor.

Bauer A, Rørvik LM. A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Lett Appl Microbiol*. 2007; 45(4):371-375.

Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. 2002; 184(15):4259-4269.

Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 2008; 153:S347-357.

Bhanumathi R, Sabeena F, Isac SR, Shukla BN, Singh DV. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O139 bengal isolated from water and the aquatic plant *Eichhornia crassipes* in the River Ganga, Varanasi, India. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(4):2389-2394.

Bistué AJ Soler, Martín FA, Petroni A, Faccone D, Galas M, Tolmasky ME, Zorreguieta A. *Vibrio cholerae* InV117, a class 1 integron harboring aac(6)-Ib and blaCTX-M-2, is linked to transposition genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(5):1903-1907.

Blake PA, Weaver RE, Hollis DG. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annu Rev Microbiol*. 1980; 34:341-367.

Bordeleau E, Brouillette E, Robichaud N, Burrus V. Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol*. 2010; 12(2):510-523.

Brenner DJ, Hichman-Brenner FW, Lee JV, Steigerwalt AG, Fanning GR, Hollis DG, Farmer III JJ, Weaver RE, Joseph SW, Seidler RJ. *Vibrio furnissii* (Formerly

Aerogenic Biogroup of *Vibrio fluvialis*), a New Species Isolated from Human Feces and the Environment. J Clin Microbiol. 1983; 18(4):816-824.

Brown NF, Wickham ME, Coombes BK, Finlay BB. Crossing the line: selection and evolution of virulence traits. PLoS Pathog. 2006; 2(5):e42.

Burrus V, Marrero J, Waldor MK. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. Plasmid. 2006; 55(3):173-183.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3):969-976.

Butt AA, Aldridge KE, Sanders CV. Infections related to the ingestions of seafood, Part I: viral and bacterial infections. Lancet Infect Dis. 2004; 4: 201-212.

Cabrera LE, Castro G, Ramírez M, Llop A, Llanes R, Castañeda N, *et al.* Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales em Cuba. Ver Chil Infect. 2007; 24(3): 204-208.

Carvalho IT, Magalhães V, Leal NC, Melo V, Magalhães M. *Vibrio fluvialis* attaches to but does not enter HeLa cell monolayers. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89(2):221-223.

Chakraborty R, Chakraborty S, De K, Sinha S, Mukhopadhyay AK, Khanam J, *et al.* Cytotoxic and cell vacuolating activity of *Vibrio fluvialis* isolated from paediatric patients with diarrhea. J Med Microbiol. 2005; 54:707-716.

Chakraborty R, Sinha S, Mukhopadhyay AK, Asakura M, Yamasaki S, Bhattacharya SK, Nair GB, Ramamurthy T. Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *toxR* gene. J Med Microbiol. 2006; 55(Pt 6):805-808.

Choury D, Aubert G, Szajnert MF, Azibi K, Delpech M, Paul G. Characterization and nucleotide sequence of CARB-6, a new carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase from *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(2):297-301.

Clinical and Laboratory Standards/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th International Supplement. CLSI/NCCLS document M100 – S19. Wayne, 2009.

Coulthurst SJ, Barnard AM, Salmond GP. Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(4):295-306.

Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(5):363-378.

Dalsgaard A, Glerup P, Høybye LL, Paarup AM, Meza R, Bernal M, Shimada T, Taylor DN. *Vibrio furnissii* isolated from humans in Peru: a possible human pathogen? *Epidemiol Infect*. 1997 ;119(2):143-9.

Dalsgaard A, Forslund A, Serichantalergs O, Sandvang D. Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(5):1315-1321.

.

Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997; 61(3):377-392.

Dryselius R, Kurokawa K, Iida T. Vibrionaceae, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Res Microbiol*. 2007; 158(6):479-486.

Dumontet S, Krovacek K, Svenson SB, Pasquale V, Baloda SB, Figliuolo SB. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio spp.* in coastal waters of Southern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2000; 23(1): 53-72.

Ehara M, Nguyen BM, Nguyen DT, Toma C, Higa N, Iwanaga M. Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam. *Epidemiol Infect.* 2004; 132(4):595-600.

Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 2009; 73(4):345-354. Review.

Farmer III JJ, Janda JM. Vibrionales. In: Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Michigan: Springer. 2005; 2:491-546.

Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; 18(11):761-770.

Fuchs TM. Molecular mechanisms of bacterial pathogenicity. *Naturwissenschaften.* 1998; 85(3):99-108.

Furniss AL, Lee JV, Donovan TJ. Group F, a new *Vibrio*? *Lancet.* 1977; 10 (2): 565-566.

García-Martínez J, Acinas SG, Antón AI, Rodríguez-Valera F. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods.* 1999; 36(1-2):55-64.

Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(2):277-301.

Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat.* 1998;1(2):109-119.

Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser. 1999; 41:95-98.

Han JH, Lee JH, Choi YH, Park JH, Choi TJ, Kong IS. Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. Biochim Biophys Acta. 2002; 23;1599(1-2):106-114.

Hazen TH, Wu D, Eisen JA, Sobecky PA. Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio spp.* Appl Environ Microbiol. 2007; 73(23):7703-7710.

Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, *et al.* DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature. 2000; 406(6795):477-483.

Helms SD, Oliver JD, Travis JC. Role of heme compounds and haptoglobin in *Vibrio vulnificus* pathogenicity. Infect Immun. 1984; 45(2):345-349.

Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pillot A, Fournier JM, Pommepuy M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. J Appl Microbiol. 2002; 92(6):1123-1135.

Hickman-Brenner FW, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Schreiber M, Holmberg SD, Baldy LM, Lewis CS, Pickens NM, Farmer JJ. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient. J Clin Microbiol. 1984; 20(1):125-127.

Hochhut B, Waldor MK. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. Mol Microbiol. 1999; 32(1):99-110.

Hochhut B, Marrero J, Waldor MK Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139. J Bacteriol. 2000; 182(7):2043-2047.

Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(11):2991-3000.

Howe RA, Spencer RC. Cotrimoxazole. Rationale for re-examining its indications for use. Drug Saf. 1996; 14(4):213-218.

Huang K, Hsu RW. *Vibrio fluvialis* hemorrhagic cellulitis and cerebritis. Clin Infect Dis. 2005; 40(9):e75-77.

Huda N, Lee EW, Chen J, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in Non-O1 *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(8):2413-2417.

Huq A, Grim C, Colwell RR, Nair GB Detection, isolation, and identification of *Vibrio cholerae* from the environment. Curr Protoc Microbiol. 2006; Chapter 6:Unit 6A.

Huq MI, Alam KMJ, Brenner DJ, Morris GK. Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea. J Clin Microbiol. 1980; 11(6): 621-624.

Huq, MI; Aziz, KMS; Colwell, RR. Enterotoxigenic properties of *Vibrio fluvialis* (group F *Vibrio*) isolated from clinical and environmental sources. J Diar Dis Res. 1985; 3(2): 96-99.

Iwanaga M, Toma C, Miyazato T, Insiengmay S, Nakasone N, Ehara M. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(7):2364-2369.

Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio spp.* Clin Microbiol Rev. 1988; 1(3):245-267.

Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic *Vibrios*. Crit Rev Microbiol. 1982; 10(1):77-124.

Judson N, Mekalanos JJ. Transposon-based approaches to identify essential bacterial genes. Trends Microbiol. 2000; 8(11):521-526.

Kim HB, Wang M, Ahmed S, Park CH, LaRocque RC, Faruque AS, Salam MA, Khan WA, Qadri F, Calderwood SB, Jacoby GA, Hooper DC. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(2):799-803.

Kothary MH, Lowman H, McCardell BA, Tall BD. Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. Infect Immun. 2003; 71(6):3213-3220.

Kovalevskaya NP. Mobile Gene Cassettes and Integrons .Mol Biol. 2002; 36(2):261-267.

Kwok AY, Wilson JT, Coulthart M, Ng LK, Mutharia L, Chow AW. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp60* gene sequences. Can J Microbiol. 2002; 48(10):903-910.

Lago EP, Nieto TP, Farto Seguí R. Fast detection of *Vibrio* species potentially pathogenic for mollusc. Vet Microbiol. 2009; 139(3-4):339-346..

Lai CH, Hwang CK, Chin C, Lin HH, Wong WW, Liu CY. Severe watery diarrhoea and bacteraemia caused by *Vibrio fluvialis*. J Infect. 2006; 52(3):e95-98.

Lee JV, Shread P, Furniss AL, Bryant TN. Taxonomy and Description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (Synonym Group F Vibrios, Group EF6). J Appl Microbiol. 1981; 50(1): 73-94.

Lee JY, Park JS, Oh SH, Kim HR, Lee JN, Shin JH. Acute infectious peritonitis caused by *Vibrio fluvialis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 62(2):216-218.

Lee SKY, Wang HZ, Law SHW, Wu RSS, Kong RYC. Analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. Mar. Pollut. Bull. 2002; 44: 412-420.

Lesmana M, Subekti DS, Tjaniadi P, Simanjuntak CH, Punjabi NH, Campbell JR; Oyofa BA. Spectrum of *Vibrio* species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 43(2):91-97.

Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med. 2004; 10:S122-129.

Lockwood DE, Kreger AS, Richardson SH. Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*. Infect Immun. 1982; 35(2): 702-708.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002a. DNA Recombinante e Genômico (Cap. 7); 207-254.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002b. Estrutura Molecular de Genes e Cromossomos (Cap. 9); 294-340.

Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol Rev. 1994; 58(3):563-602.

Macián MC, Garay E, Grimont PA, Pujalte MJ. *Vibrio ponticus* sp. nov., a neighbour of *V. fluvialis*-*V. furnissii* clade, isolated from gilthead sea bream, mussels and seawater. *Syst Appl Microbiol.* 2004; 27(5):535-540.

Maeda T, Takada N, Furushita M, Shiba T. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 1;192(1):73-7.

Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science.* 2008; 321(5887):365-367.

Matté GR, Matté MH, Sato MI, Sanchez PS, Rivera IG, Martins MT. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. *J Appl Bacteriol.* 1994; 77(3):281-287.

Matté GR. Isolamento de vibrios potencialmente patogênicos em moluscos bivalves. São Paulo;1993. 192 p. Tese apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Saúde Ambiental para obtenção do grau de Doutor.

Maugeri TL, Caccamo D, Gugliandolo C. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 89: 261-266.

Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* 1998; 280(5363):605-608.

Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4(8):608-620.

Melano R, Petroni A, Garutti A, Saka HA, Mange L, Pasterán F, Rapoport M, Rossi A, Galas M. New carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-7) from *Vibrio*

cholerae non-O1, non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(7):2162-2168.

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(1):147-179.

McGowan SJ, Bycroft BW, Salmond GP. Bacterial production of carbapenems and clavams: evolution of beta-lactam antibiotic pathways. Trends Microbiol. 1998; 6(5):203-208.

Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol Mol Biol Rev. 2007; 71(3):413-451.

Miller RV. Environmental bacteriophage-host interactions: factors contribution to natural transduction. Antonie Van Leeuwenhoek. 2001; 79(2):141-147.

Mira-Gutiérrez J, García-Martos P. *Vibrios* de origen marino en patología humana. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1997; 15(7):383-388.

Miyoshi S, Shinoda S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes Infect. 2000; 2(1):91-98.

Miyoshi S, Sonoda Y, Wakiyama H, Rahman MM, Tomochika K, Shinoda S, Yamamoto S, Tobe K. An exocellular thermolysin-like metalloprotease produced by *Vibrio fluvialis*: purification, characterization, and gene cloning. Microb Pathog. 2002; 33(3): 127-134.

Mohapatra H, Mohapatra SS, Mantri CK, Colwell RR, Singh DV. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains isolated before 1992 from Varanasi, India are multiple drug resistant, contain intSXT, *dfr18* and *aadA5* genes. Environ Microbiol. 2008; 10(4):866-873.

Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980; 8(19):4321-4325.

Myatt DC, Davis GHG. Extracellular and surface-bound biological activities of *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii* and related species. *Med Microbiol Immunol.* 1989; 78:279-287.

Nandi B, Nandy RK, Mukhopadhyay S, Nair GB, Shimada T, Ghose AC. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(11):4145-4151.

Nemergut DR, Robeson MS, Kysela RF, Martin AP, Schmidt SK, Knight R. Insights and inferences about integron evolution from genomic data. *BMC Genomics.* 2008; 9:261.

Nguyen DT, Ngo TC, Tran HH, Nguyen TP, Nguyen BM, Morita K, Ehara M. Two different mechanisms of ampicillin resistance operating in strains of *Vibrio cholerae* O1 independent of resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 298(1):37-43.

Nishibuchi M, Seidler RJ, Rollins DM, Joseph SW. *Vibrio* factors cause rapid fluid accumulation in suckling mice. *Infect Immun.* 1983; 40(3):1083-1091.

Nishibuchi M, Seidler RJ. Medium-dependent production of extracellular enterotoxins by non-O-1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*. *Appl Environ Microbiol.* 1983; 45(1):228-231.

Nishiguchi MK, Nair VS. Evolution of symbiosis in the Vibrionaceae: a combined approach using molecules and physiology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53:2019-2026.

Oakey HJ, Levy N, Bourne DG, Cullen B, Thomas A. The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. J Appl Microbiol. 2003; 95(6):1293-1303.

O'Hara CM, Sowers EG, Bopp CA, Duda SB, Strockbine NA. Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae. J Clin Microbiol. 2003; 41(12):5654-5659.

Ogawa A, Takeda T. The gene encoding the heat-stable enterotoxin of *Vibrio cholerae* is flanked by 123-base pair direct repeats. Microbiol Immunol. 1993; 37(8):607-616.

Okada K, Iida T, Kita-Tsukamoto K, Honda T. Vibrios commonly possess two chromosomes. J Bacteriol. 2005; 187(2):752-757.

Oliver JD. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiol Lett. 1995; 133(3):203-208.

Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E, Pujalte MJ. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. Int J Syst Evol Microbiol. 2010; 60(Pt 1):154-65. Epub 2009 Jul 31.

Pérez-Trallero E, Iglesias L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21(9):520-528.

Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, Galas M. Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. Antimicrob Agents Chemother. 2002 May;46(5):1462-1468.

Petroni A, Melano RG, Saka HA, Garutti A, Mange L, Pasterán F, Rapoport M, Miranda M, Faccone D, Rossi A, Hoffman PS, Galas MF. CARB-9, a carbenicillinase encoded in the VCR region of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139

belongs to a family of cassette-encoded beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(10):4042-4046.

Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(2):382-402.

Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(4):672-693.

Rahim Z, Aziz K. Enterotoxigenity of *Vibrio fluvialis* strains isolated from fresh water environment. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1994; 12(4): 290-291.

Rajpara N, Patel A, Tiwari N, Bahuguna J, Antony A, Choudhury I, Ghosh A, Jain R, Ghosh A, Bhardwaj AK. Mechanism of drug resistance in a clinical isolate of *Vibrio fluvialis*: involvement of multiple plasmids and integrons. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(3):220-225.

Rameshkumar N, Fukui Y, Sawabe T, Nair S. *Vibrio porteresiae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a mangrove-associated wild Rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58:1608-1615.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* Rio De Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. *Princípios Básicos de Quimioterapia* (Cap. 43); 576-594.

Ratnaraja N, Blackmore T, Byrne J, Shi S.. *Vibrio fluvialis* peritonitis in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1):514-515.

Rengpipat S, Pusiririt S, Rukpratanporn S. Differentiating between isolates of *Vibrio vulnificus* with monoclonal antibodies. *J Microbiol Methods.* 2008; 75(3):398-404.

Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM, Fanelli I, Caprioli A, Luzzi I. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytillus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *Int J Food Microbiol.* 1999; 49(1-2):43-48.

Rodicio Mdel R, Mendoza Mdel C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22(4):238-245.

Rodríguez LEC, Monroy SP, Morier L, Alvarez MMR, Abreu AF, Escarpulli GC *et al.* Severe otitis due to *Vibrio fluvialis* in a patient with AIDS: first report in the world. *Rev Cubana Med Trop.* 2005; 57(2): 154-155.

Rowe-Magnus DA, Guérout AM, Mazel D. Super-integrans. *Res Microbiol.* 1999; 150(9-10):641-651.

Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(2):652-657.

Rowe-Magnus DA, Mazel D. Integrans: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol.* 2001; 4(5):565-569.

Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol Microbiol.* 2002; 43(6):1657-1669.

Sabaté M, Prats G. Estructura y función de los integrones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002; 20(7):341-345.

Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. *Lancet.* 2004; 363(9404):223-233.

Saulnier D, Avarre JC, Le Moullac G, Ansquer D, Levy P, Vonau V. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia. *Dis Aquat Organ*. 2000; 40(2):109-115.

Schandevyl P, Dyck EV, Piot P. Halophilic *Vibrio* species from seafish in Senegal. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 48(1): 236-238.

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev*. 2004; 28(5):519-542.

Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev*. 1996;60(1):167-215.

Seidler RJ, Allen DA, Colwell RR, Joseph SW, Daily OP. Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States. *Appl Environ Microbiol*. 1980; 40(4): 715-720.

Serratore P, Turtura GC, Rinaldini E, Milandri S, Presepi D. Phenotypic characterization of some bacterial populations belonging to the genus *Vibrio*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 1999; 49:89-99.

Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria - a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci*. 2008; 15(1):5-14.

Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*. 2001; 32(3-4):261-273.

Srifuengfung S, Komolpis P, Yungyuen T, Techachaiwiwat W, Tribuddharat C. Prevalence of *Vibrio* species isolated from fecal specimens of patients with diarrhea

in Sirijaj hospital during 1994-2001. J Infect Dis Antimicrob Agents. 2004; 21(3): 83-88.

Srinivasan VB, Virk RK, Kaundal A, Chakraborty R, Datta B, Ramamurthy T, Mukhopadhyay AK, Ghosh A. Mechanism of drug resistance in clonally related clinical isolates of *Vibrio fluvialis* isolated in Kolkata, India. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(7):2428-2432.

Strahilevitz J, Hooper DC. Dual targeting of topoisomerase IV and gyrase to reduce mutant selection: direct testing of the paradigm by using WCK-1734, a new fluoroquinolone, and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(5):1949-1956.

Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009; 58(Pt 9):1133-1148.

Strom MS, Paranjpye RN. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Microbes Infect. 2000; 2(2):177-188.

Tacket CO, Hickman F, Pierce GV, Mendoza LF. Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* in the United States. J Clin Microbiol. 1982;16 (5):991-992.

Taddei CR, Fasano A, Ferreira AJ, Trabulsi LR, Martinez MB. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. FEMS Microbiol Lett. 2005; 250(2):263-239.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007; 24(8): 1596-1599.

Tantillo GM, Fontanarosa M, Di Pinto A, Musti M. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Lett Appl Microbiol.* 2004; 39(2):117-126.

Taviani E, Ceccarelli D, Lazaro N, Bani S, Cappuccinelli P, Colwell RR, Colombo MM. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 64(1):45-54.

Teo JW, Suwanto A, Poh CL. Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(5):1309-1314.

Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(4):1019-1025.

Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol.* 2001; 24(4):520-538.

Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(3):403-431.

Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB, Swings J. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:5107-5115.

Thompson FL, Gomez-Gil B, Ribeiro-Vasconcelos AT, Sawabe T. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *Vibrio campbellii* form distinct species. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 4279-4285.

Tracz DM, Backhouse PG, Olson AB, McCrea JK, Walsh JA, Ng LK, Gilmour MW. Rapid detection of *Vibrio* species using liquid microsphere arrays and real-time PCR targeting the *ftsZ* locus. *J Med Microbiol.* 2007; 56:56-65.

Tsai YH, Hsu RW, Huang KC, Chen CH, Cheng CC, Peng KT, Huang TJ. Systemic vibrio infection presenting as necrotizing fasciitis and sepsis. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86-A(11):2497-502.

Uehara FI. Concordância entre perfil de restrição do fragmento 16S rDNA e testes fenotípicos para determinação do posicionamento taxonômico de cepas de *Aeromonas*. São Paulo; 2008. 65p. Tese apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Serviços de Saúde Pública para obtenção do grau de Mestre.

Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57:2823-2829.

Van Dongen WMAM, Van Vlerken MMA, De Graaf FK. Nucleotide sequence of a DNA fragment encoding a *Vibrio cholerae* haemagglutinin. *Mol Gen (Life Sci Adv)* 1987; 6:85-91.

Venkateswaran K, Kiiyukia C, Takaki M, Nakano H, Matsuda H, Kawakami H, Hashimoto H. Characterization of toxigenic vibrios isolated from the freshwater environment of Hiroshima, Japan. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55(10):2613-2618.

Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(2):122-130.

Waldor MK, Tschäpe H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol.* 1996; 178(14):4157-4165.

Wall VW, Kreger AS, Richardson SH. Production of partial characterization of a *Vibrio fluvialis* cytotoxin. *Infect Immun*. 1984; 46(3): 773-777.

Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(12):4217-4224.

Wilkins BM, Thomas AT. DNA-independent transport of plasmid primase protein between bacteria by the II conjugation system. *Mol Microbiol*. 2000; 38(3):650-657.

Yamamoto S, Okujo N, Fujita Y, Saito M, Yoshida T, Shinoda S. Structures of two polyamine-containing catecholate siderophores from *Vibrio fluvialis*. *J Biochem*. 1993; 113(5):538-544.

Yamamoto T, Nair GB, Albert MJ, Parodi CC, Takeda Y. Survey of in vitro susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 and O139 to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39(1):241-244.