

Faculdade de Saúde Pública

Universidade de São Paulo

Isolamento e identificação molecular de  
*Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais e  
análise do perfil de suscetibilidade a antibióticos.

Kélvilin Anahí Gonzales Sábio Soler

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde Pública para obtenção do  
título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Glavur Rogério Matté

São Paulo

2011

Isolamento e identificação molecular de  
*Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais e  
análise do perfil de suscetibilidade a antibióticos.

Kélvilin Anahí Gonzales Sábio Soler

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde Pública para obtenção do  
título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Glavur Rogério Matté

São Paulo

2011

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 dissertação.

## DEDICATÓRIA

*À toda  
minha família e  
aos amigos que  
são e se sentem  
como parte dela.*

*Ao Rodrigo e  
ao meu “Pequeno  
Amor” que chegará  
em breve.*

## AGRADECIMENTOS

Esta Dissertação não significa pra mim apenas a conclusão do Mestrado, mas representa muito mais, “a realização de um sonho” que não foi vivido sozinho, contou com a participação de muitos personagens que desempenharam papéis fundamentais e serão para sempre lembrados por mim.

Agradeço ...

A Deus, Jesus, Benfeitores Amigos e ao meu Anjo Guardião, por terem guiado, acompanhado, ajudado em todos os momentos, emanando fluidos de sabedoria, tranquilidade e benevolência; pelo trabalho dispensado para que meus fluidos vitais permanecessem renovados, princípio para a boa saúde do corpo físico e do espírito, tão necessários durante a realização de mais esta prova.

Aos meus pais Aparecida e Valdevir por sempre acreditarem, incentivarem e rezarem para que eu soubesse escolher o melhor caminho, mesmo estando a cerca de 540 km de distância. Aos meus irmãos, Arthur e Marcelo, a todos os cunhados (as), aos meus sogros e sobrinhos lindos, por proporcionarem momentos de alegria e descontração.

Ao meu amor e incansável companheiro, Rodrigo Soler, pela paciência em todos os momentos de chatice, reclamações e choro, por me amar como sou e sempre entender tudo.

Aos Professores Glavur Rogério Matté e Maria Helena Matté por terem proporcionado absolutamente todo o necessário para a realização deste estudo, além da amizade e carinho de “pais” nos momentos oportunos.

Aos Professores Nilton Lincopan, Maria Inês Zanoli Sato e Maria Tereza Pepe Razzolini pelas correções e sugestões oferecidas tão gentilmente, pela atenção e amabilidade com que se dirigiram a mim.

À equipe do Laboratório de Entomologia, em especial o Professor Delsio Natal por ter me recebido e atendido com atenção, gentileza e cordialidade,

proporcionado um ambiente amistoso e contribuindo para minha permanência na instituição até o momento.

Aos Professores Alfredo e Aline Mariath, pela ajuda durante minha preparação para vencer a etapa da prova para o ingresso na Pós-Graduação e só então dar início ao meu sonho.

Às integrantes da equipe do Laboratório de Prática de Saúde Pública, Milena, Lívia e Ronalda pelo apoio e contribuições durante a pesquisa.

Às garotas, que sempre que necessário me ajudaram prontamente, fosse por motivos burocráticos ou com conversas rápidas só pra desestressar um pouco, Cidinha e Lívia - Departamento de Prática de Saúde Pública; Antonia - Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública; Angela Andrade - Seção de Pós-Graduação e Ana - Laboratório de Tisiologia.

A todos os funcionários das portarias em especial ao Sr. Sebastião Lucio, pela alegria e educação empregada em cada “bom dia”, “oi”, “tudo bem” ou “tchau, até amanhã”.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

Às minhas amigas, tão queridas, conquistadas durante esta fase da minha vida, que puderam conviver e entender cada momento vivido desde março de 2008 e que serão lembradas para sempre.

À Luisa por toda a enorme ajuda que me deu sem pedir nada em troca. Pelas extrações de DNA, pelos géis de agarose, pela grande ajuda na escrita e principalmente pelos almoços, cafés, histórias, conselhos, risadas e muito mais, que só nós duas sabemos.

À Licia por ter me acolhido logo que cheguei, pela experiência e conhecimentos transmitidos, a calma, a gentileza, o incentivo em todos os momentos e claro pelas risadas, choros, choops, jantares e com certeza uma amizade única e verdadeira.

À Renata pela alegria, força, incentivo e conselhos, por cuidar de mim como uma irmã e estar sempre disposta a ajudar e claro, pelas comidas maravilhosas e dicas culinárias.

À Sirlei pela simpatia e amizade, pelo apoio e conselhos, fundamentais sempre; pelos almoços, cafés, choops, idas ao shopping e acima de tudo pela doação de energia e otimismo.

À Elisabeth por todo o conhecimento cedido, por toda ajuda dada no mesmo momento que solicitada, pela alegria e disposição contagiantes, pelo companheirismo e acima de tudo pela sinceridade e boas risadas.

À Camila por toda a ajuda nas mais diferentes situações, pelos conselhos, bom humor, explicações científicas e técnicas e outras nem tanto assim, como filmes e cultura geral e claro pela franqueza e estímulo, mostrando que nada é tão difícil que não se possa ensinar ou aprender.

À Patrícia por estar sempre por perto pra ouvir e consolar, pra opinar de um jeito Paty de ser, pra lembrar coisas e datas, sejam relacionadas a pós-graduação ou a infância e claro, pelas dicas de rotas pra qualquer destino na cidade de São Paulo.

À Danielle pela companhia durante as disciplinas, pelos conselhos, informações relevantes, como avisar sobre as ótimas festas do Perseverança, risadas, e claro por me apresentar o Villa Country.

À Helena por ter tido paciência pra me escutar por um ano (e olha que eu reclamava hein, mas ela sabe o porquê), pela graça, gentileza, ajuda e otimismo inesquecíveis e claro pela companhia na pia, no bandeirão e nos bancos do jardim da FSP.

À Miriam por toda a ajuda técnica – bendito Bergey's, pelos conselhos e experiências trocadas, pelos “momentos sobrinhos”, pelos cafés e dicas de restaurantes, feiras, filmes e tudo de bom que uma boa paulistana pode oferecer.

À Cíntia pelos artigos cedidos, pela companhia de pesquisa de espécies do gênero *Vibrio*, pela descontração e paciência para responder algumas dúvidas básicas.

À Martha pela ajuda bem no início, não dá pra esquecer.

À Paola pela ajuda, educação, gentileza e prestatividade constante, e claro pelas conversas e conhecimentos sobre a MiniFazenda.

À Edileni pela ajuda no dia a dia, pelos conselhos e força em momentos importantes e decisivos.

À Márcia pelo carinho com que me acolheu, pelos conselhos de “mãe” e encorajamento, indispensáveis.

Espero que todos se sintam muito importantes, pois é essa a classificação de todos na minha vida. Obrigada por tudo!



## RESUMO

Sábio-Soler KAG. Isolamento e identificação molecular de *Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais e análise do perfil de suscetibilidade a antibióticos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2011.

**Introdução** - *Vibrio metschnikovii* é um bacilo gram-negativo, potencialmente patogênico, amplamente distribuído e isolado de ecossistemas aquáticos e raramente de amostras clínicas de humanos. Na triagem laboratorial para espécies do gênero *Vibrio*, *Vibrio metschnikovii* é descartado por ser oxidase negativa, característica que o diferencia das demais espécies patogênicas. Em relação à pesquisa do perfil de suscetibilidade a antibióticos, esta é pouco realizada com isolados de origem ambiental. **Objetivos** - Isolar e identificar genotipicamente *Vibrio metschnikovii* de amostras ambientais e caracterizar seu perfil de suscetibilidade a antibióticos. **Métodos** - Um total de dez amostras foram obtidas de Março a Agosto de 2009, sendo uma de molusco (vôngole), três de peixe (pescada, sardinha e tainha) e seis de esgoto (três de esgoto bruto e três de esgoto tratado). O isolamento foi inicialmente realizado em meio seletivo para *Vibrio* (ágar TCBS) e a confirmação da espécie foi feita com iniciadores específicos através da PCR utilizando o DNA extraído pela técnica de choque térmico. O antibiograma foi realizado com base no documento M45-A CLSI 2006, seguindo a técnica de disco difusão, empregando quinze antibióticos. Foi realizada a pesquisa de genes de resistência a beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. **Resultados** - De 123 isolados com características típicas para a espécie, 70 foram confirmados como *Vibrio metschnikovii* através da PCR, sendo 43 de amostras de molusco e peixes e 27 de esgoto. Um total de 66 isolados foi resistente a pelo menos um antibiótico, mas nenhum gene de resistência foi detectado. **Conclusões** - Os resultados indicam que *Vibrio metschnikovii* pode ser isolado de diferentes amostras de origem ambiental, demonstrando que esses microrganismos podem ter distribuição mais ampla que o descrito na literatura. A PCR foi uma ferramenta fundamental para superar a fragilidade da identificação da

espécie segundo o método fenotípico. Além disso, a resistência observada mostra que *Vibrio metschnikovii* pode atuar como um reservatório de genes de resistência que podem ser facilmente transferidos entre microrganismos em um mesmo ambiente. O perfil de suscetibilidade a antibióticos pode ser utilizado como referência na caracterização clínica deste patógeno em potencial, auxiliando na conduta terapêutica em casos de ocorrência de doentes acometidos pelo microrganismo em questão.

**Descritores:** *Vibrio metschnikovii*, Identificação Genotípica, Suscetibilidade a Antibióticos, Saúde Pública.

## ABSTRACT

Sábio-Soler KAG. Isolation and molecular identification of *Vibrio metschnikovii* from environmental samples and analysis of antibiotic susceptibility profile [dissertation]. Sao Paulo (BR): School of Public Health USP; 2011.

**Introduction** - *Vibrio metschnikovii* is a gram-negative bacillus, potentially pathogenic, widely distributed and isolated from aquatic ecosystems and rarely from human clinical samples. At laboratorial screening for the species of the *Vibrio* genus, *Vibrio metschnikovii* is discarded for being oxidase negative, characteristic that differentiates it from the others pathogenic species. With regard to the research of antibiotic susceptibility profile, this is seldom done with environmental isolates.

**Objectives** - To isolate and genotypically identify *Vibrio metschnikovii* from environmental samples and characterize the antibiotic susceptibility profile. **Method**

- A total of ten samples were obtained from March to August 2009, with one of them originated from mussel (vongole), tree of fish (whitefish, sardine and mullet) and six from sewage (three from raw sewage and three from treated sewage). The isolation was initially performed in a selective medium for *Vibrio* (TCBS agar) and the specie confirmation was done with specific primers through PCR using DNA extracted by the thermal shock technique. The antibiogram was performed according to the document M45-A from CLSI 2006, following the technique of disk diffusion, using fifteen antibiotics. The research for beta-lactams and aminoglycosides resistance genes was also performed. **Results** – Seventy out of 123 isolates, with typical characteristics for the specie, were confirmed as *Vibrio metschnikovii* by PCR, with 43 originated from mussel and fish and 27 from sewage. A total of 66 isolates were resistant to at least one antibiotic, however no resistance gene was detected.

**Conclusions** – The results indicate that *Vibrio metschnikovii* can be isolated from different samples of ambient origin, demonstrating that these microorganisms can have wider distribution than the described in literature. The PCR was a fundamental tool to overcome the fragility of the specie identification according to the phenotypic

method. Furthermore, the resistance found shows that *Vibrio metschnikovii* can act as a reservoir of resistance genes that can easily be transferred between microorganisms in the same environment. The antibiotic susceptibility profile can be used as reference at the clinical characterization of this potential pathogen, assisting therapeutic management in cases of patients affected by this microorganism.

**Descriptors:** *Vibrio metschnikovii*, Genotypic Identification, Antibiotic Susceptibility, Public Health.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
	1.1 TAXONOMIA	19
	1.1.1 Taxonomia de <i>Vibrio metschnikovii</i>	20
	1.2 VIRULÊNCIA	22
	1.2.1 Atividade Hemolítica	22
	1.3 CASOS CLÍNICOS	23
	1.4 CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS E ALIMENTARES	27
	1.5 RESISTÊNCIA	29
	1.5.1 Testes de Suscetibilidade aos Antibióticos	30
	1.6 ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	32
	1.6.1 Beta-lactâmicos	32
	1.6.1.1 Penicilinas	33
	1.6.1.2 Cefalosporinas	33
	1.6.1.3 Carbapenêmicos e Monobactâmicos	34
	1.6.1.4 Mecanismos de Resistência aos Beta-lactâmicos	35
	1.6.1.4.1 Beta-lactamases	35
	1.6.2 Aminoglicosídeos	40
	1.6.3 Tetraciclinas	42
	1.6.4 Quinolonas	43
	1.6.5 Sulfonamidas e Diaminopirimidinas	44
	1.6.6 Anfencóis	45
	1.7 SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS RELACIONADA À <i>Vibrio metschnikovii</i>	46
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
	3.1 OBJETIVO GERAL	49
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>50</b>
	4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	50

4.2	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	52
4.2.1	Amostras de vôngole e peixes marinhos	52
4.2.2	Amostras de esgoto bruto e tratado	52
4.3	ISOLAMENTO DE COLÔNIAS	53
4.4	MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO	54
4.4.1	Extração do DNA Genômico	54
4.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	55
4.4.3	Eletroforese em Gel de Agarose	56
4.5	IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA	56
4.5.1	Antibiograma	56
4.5.2	Identificação Fenotípica de Produção de ESBL	58
4.5.3	Identificação Fenotípica de Produção de MBL	59
4.5.4	Identificação Fenotípica de Produção de AmpC	59
4.5.5	Detecção de Genes de Resistência a Antibióticos	60
4.6	CARACTERIZAÇÃO COLONIAL DE <i>Vibrio metschnikovii</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>63</b>
5.1	ISOLAMENTO DE <i>Vibrio metschnikovii</i> EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	63
5.2	IDENTIFICAÇÃO PELA PCR	64
5.3	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	65
5.4	DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	69
5.5	CARACTERIZAÇÃO COLONIAL DE <i>Vibrio metschnikovii</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	69
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
6.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Vibrio metschnikovii</i>	71
6.2	SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	77
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>82</b>

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1</b> – Esquema de classificação de beta-lactamases, ampliado de Bush <i>et al.</i> (1995)	38
<b>Quadro 2</b> – Enzimas e respectivos aminoglicosídeos inativados	41
<b>Quadro 3</b> – Tipos de amostras, locais de obtenção e data da coleta	51
<b>Quadro 4</b> – Iniciadores utilizados para confirmação da espécie <i>Vibrio</i> <i>metschnikovii</i>	55
<b>Quadro 5</b> – Lista de antibióticos e as respectivas medidas dos halos de inibição	58
<b>Quadro 6</b> – Lista de iniciadores (5' – 3') utilizados para a pesquisa de genes de resistência em <i>Vibrio metschnikovii</i>	61
<b>Quadro 7</b> - Perfil de suscetibilidade a AMP, GEN e EST por amostra	66
<b>Quadro 8</b> - Resultados do Antibiograma dos 70 isolados de <i>Vibrio</i> <i>metschnikovii</i> provenientes de amostras ambientais	67

## Lista de Figuras

- Figura 1** – Colônias características de *Vibrio metschnikovii* isoladas em Ágar TCBS 63
- Figura 2** – Perfil de eletroforese para identificação de *Vibrio metschnikovii* 65
- Figura 3** – Caracterização colonial de *Vibrio metschnikovii*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em diferentes meios de cultura 70



## Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Número de colônias típicas por amostra, resultado do teste de oxidase e produção de gás e número de isolados positivos para *Vibrio metschnikovii*, São Paulo, 2010. 64
- Tabela 2** - Número e porcentagem de isolados segundo a suscetibilidade aos antibióticos AMP, GEN e EST, São Paulo, 2010. 65

# 1 INTRODUÇÃO

A primeira espécie de *Vibrio* foi descoberta por Fillippo Pacini em 1854, na Itália, durante o estudo de um surto que ocorreu em Florença, sendo denominada *Vibrio cholerae* (THOMPSON *et al.*, 2004).

Em 1893 Kock e sua equipe perceberam que vibrios eram ubiqüitários em ambientes aquáticos e que muitas de suas formas não eram patogênicas para humanos. As primeiras espécies de *Vibrio* descritas como não patogênicas foram *V. fischeri*, *V. splendidus* e *Photobacterium phosphoreum* isoladas de ambiente aquático, descobertas pelo microbiologista holandês Martinus Beijerinck em 1880. (THOMPSON *et al.*, 2004).

No entanto vibrios podem causar diarreia em humanos, infecção em feridas e infecções extra-intestinais. Em animais aquáticos podem causar feridas e infecções generalizadas, pois estão livremente distribuídos nas águas que é a entrada direta para o trato digestivo destes animais (FARMER e JANDA, 2005; AUSTIN, 2010).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, 2007) do qual faz parte o Sistema de Vigilância para Cólera e outras doenças causadas por *Vibrio* (COVIS), a partir de Janeiro de 2007 infecções causadas por outras espécies de *Vibrio* tornaram-se nacionalmente notificáveis. Mesmo assim, muitos casos de vibrioses não são detectados pelos laboratórios clínicos pelo fato destes microrganismos não fazerem parte da rotina laboratorial e não serem facilmente identificados. Enquanto muitas espécies de *Vibrio* são patógenos bem reconhecidos, estudos sobre *Vibrio metschnikovii* são escassos dificultando o reconhecimento desse microrganismo como agente de doenças entéricas ou extra-intestinais.

Gastroenterites causadas por *Vibrio* são auto-limitadas e não necessitam de tratamento com antibióticos, exceto nos casos de contato direto entre água ou animais contaminados (através da manipulação) com tecidos moles, situação em que

a infecção pode evoluir para septicemia em indivíduos imunocomprometidos (YALCINIKAYA *et al.*, 2003).

O ambiente aquático é o reservatório natural destes microrganismos e conseqüentemente os frutos do mar são uma das possíveis vias de transmissão aos humanos. Na verdade, a origem de algumas dessas bactérias pode estar ligada as águas em que os animais aquáticos são encontrados, sendo a transmissão aos seres humanos, inevitável, através de feridas ou lesões cutâneas, quando em contato com águas contaminadas (BAFFONE *et al.*, 2005; AUSTIN, 2010).

Nas últimas duas décadas, vem aumentando o interesse da influência do meio ambiente na dinâmica de doenças infecciosas. Esse interesse científico tem surgido devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos pelos patógenos, emergência e reemergência de doenças infecciosas no mundo, a potencial ameaça do bioterrorismo e o debate sobre as alterações climáticas. A ecologia dos vibrios, naturais no ambiente, pode mudar inclusive sua distribuição geográfica em decorrência das mudanças climáticas que vem ocorrendo, resultando em aumento da exposição e risco de infecção para os seres humanos (LIPP *et al.*, 2002).

## 1.1 TAXONOMIA

Segundo o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (FARMER III e JANDA, 2005) a família *Vibrionaceae* é formada por três gêneros: *Vibrio*, *Photobacteria* e *Salinivibrio*. O gênero *Vibrio* é composto por bacilos gram-negativos, móveis em meio líquido por meio de um flagelo polar. São anaeróbios facultativos, possuindo metabolismo respiratório e fermentativo. São quimiorganotróficos, sendo que a maioria das espécies utiliza a glicose como fonte de carbono e  $\text{NH}^+$  como fonte de nitrogênio. Todas as espécies têm seu crescimento estimulado pela presença de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e são fermentadoras de glicose, produzindo ácido, mas raramente gás. São organismos aquáticos e sua distribuição no meio ambiente varia de acordo com a concentração de  $\text{Na}^+$  e a temperatura. Geralmente

crecem em ágar marinho e em meio seletivo ágar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose).

OKADA *et al.* (2005) pesquisaram a existência de dois cromossomos em 34 espécies do gênero *Vibrio*, sendo esta confirmada através do PFGE (Eletroforese em Campo Pulsado) utilizado para a identificação. Na visualização do gel de agarose é possível identificar duas bandas sendo que a primeira demonstra o grande cromossomo que é de peso relativamente constante entre as espécies de vibrios e a segunda, o pequeno cromossomo que é consideravelmente variável.

Dentre as 84 espécies e 2 subespécies descritas, apenas 12 podem infectar humanos e são consideradas patogênicas ou potencialmente patogênicas, podendo causar diarreia ou infecções extra-intestinais (THOMPSON, 2004; FARMER III *et al.*, 2005; AViB, 2011 disponível em <http://www.vibriobiology.net/>).

### 1.1.1 Taxonomia de *Vibrio metschnikovii*

*Vibrio metschnikovii* foi isolado pela primeira vez por Nikolai Federovitch Gamaleia em 1888 e recebeu este nome em homenagem ao biólogo russo Ilya Ilich Mechnikov. A primeira cepa foi isolada de uma ave que havia morrido de uma doença do tipo colérica. Esta cepa foi posteriormente registrada no primeiro catálogo da Coleção Nacional de Culturas do Laboratório de Saúde Pública Central, Londres, Inglaterra (NCTC - National Collection of Type Cultures) como NCTC 262, em 1922 (LEE *et al.*, 1978; FARMER III e JANDA, 2005). Apenas em 1978 a espécie foi amplamente caracterizada por Lee, Donovan e Furniss e o primeiro caso clínico significativo foi descrito por Jean-Jacques em 1981 (LEE *et al.*, 1978; JEAN-JACQUES *et al.*, 1981).

*Vibrio metschnikovii* está amplamente distribuído no meio aquático, especialmente em rios, mares, estuários e águas residuárias. Esta espécie de *Vibrio* é frequentemente isolada do meio ambiente, mas raramente de amostras clínicas de humanos, o que não significa que ela não possa ser relacionada com doenças em

animais e humanos. É juntamente com *Vibrio gazogenes*, uma das duas únicas espécies de *Vibrio* as quais são nitrato e oxidase negativos; é halofílica, apresenta-se sob a forma de uma haste curvada, móvel em meio líquido por meio de um único flagelo polar. Possui dois cromossomos, visualizados em gel de agarose sob a forma de duas bandas sendo que a primeira demonstra o grande cromossomo (3,0 Mb) e a segunda o pequeno cromossomo (0,9 Mb). Cresce em meio seletivo ágar TCBS e preferencialmente na presença de cloreto de sódio. Entretanto cepas foram isoladas de amostras de água doce, mostrando sua capacidade de habitar ambientes de baixa concentração de NaCl. Em ágar sangue cresce abundantemente produzindo colônias acinzentadas e opacas de 2-3 mm de diâmetro com hemólise completa. Pode ainda ser isolada do intestino em animais e humanos, de esgoto e de alimentos, como peixes, frutos do mar, dentre outros (FARMER III *et al.*, 1988; VENKATESWARAN *et al.*, 1989; HARDARDOTTIR *et al.*, 1994; OKADA *et al.*, 2005; PRASAD E KHARIDEHAL, 2006; AUSTIN, 2010).

LEE *et al.* (1978) foram os primeiros a realizarem um estudo taxonômico com cepas oxidase negativas e diante dos resultados propuseram um novo gênero, mas as evidências foram insuficientes e o organismo foi mantido dentro do gênero *Vibrio*.

*Vibrio metschnikovii* apresenta como características bioquímicas sacarose positiva, com formação de colônias amarelas de 2-3 mm de diâmetro em ágar TCBS; não produz H<sub>2</sub>S (sulfeto de hidrogênio) em ágar ferro kligler; arginina dehidrolase positiva, ornitina e lisina descarboxilase negativas; fermenta a glicose, mas não produz gás, arabinose negativa; manitol positivo; produção de acetoína (Voges-Proskauer) positivo; o crescimento é viável em concentrações de 1%, 3%, 6%, 7%, 8%, 10% e 12% de NaCl e em temperaturas de 20 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C (ALSINA, 1994; DALSGAARD *et al.*, 1996; FARMER *et al.*, 2005; MATTÉ *et al.*, 2007).

## 1.2 VIRULÊNCIA

### 1.2.1 Atividade Hemolítica

MIYAKE *et al.* (1988) relataram pela primeira vez a atividade hemolítica detectada em cepa de *Vibrio metschnikovii* isolada de fezes diarréicas. Revelaram que a citolisina é de difícil purificação pela tendência a agregar com outras proteínas coexistentes. *Vibrio metschnikovii* não produz outras hemolisinas diferentes da relatada e nenhuma semelhança imunológica foi encontrada com outras hemolisinas produzidas por outros vibrios. De acordo com o experimento desenvolvido os autores propuseram que esta citolisina ocasionasse diarréia, atuando então como uma enterotoxina. Embora os dados tenham sido insuficientes para confirmação desse fato, este foi o primeiro relato de purificação e caracterização de uma citolisina produzida por *Vibrio metschnikovii*.

A atividade citotóxica foi testada em cepas isoladas de uma ferida pós cirúrgica identificadas como *Vibrio metschnikovii*. A mesma foi comprovada pela lise de células Vero após 5 horas de incubação da amostra líquida em meio TSB (caldo soja-tripticase) a 37 °C (LINDE *et al.*, 2004).

MATTÉ *et al.* (2007) realizaram um estudo com cepas de *Vibrio metschnikovii* isoladas de peixes no Brasil com o objetivo de detectar os possíveis fatores de virulência desta espécie. Um total de 48 cepas foram recuperadas e testadas quanto aos fatores de virulência, nos quais a atividade beta-hemolítica foi observada em 100% das placas de ágar sangue humano e 84,6% de ágar sangue de coelho. Todos os isolados tiveram atividade citotóxica e lisaram no mínimo 25% das células Vero. Em relação ao teste de permeabilidade vascular 76,9% das cepas demonstraram aumento, resultando em zona endurecida após 10 h.

### 1.3 CASOS CLÍNICOS

JEAN-JACQUES *et al.* (1981) relataram o caso de uma paciente com 82 anos de idade admitida no Hospital do Condado de Cook, Chicago, em 1978. A paciente apresentava sintomas como vômito, fraqueza e calafrios. Seu histórico médico incluía diabetes mellitus e hipertensão. Ao exame físico o abdômen estava distendido, mais acentuadamente no quadrante superior direito o qual foi radiografado e apresentava densidades calcificadas. Duas culturas de sangue foram realizadas no dia da admissão e um dia após foi dado início ao tratamento com Tobramicina e Clindamicina. Ao suspeitar de uma perfuração da vesícula biliar, foi realizada uma cirurgia na qual foi observada a presença de líquido peritoneal turvo indicando uma inflamação vesicular aguda com presença de cálculos biliares. Em uma das culturas de sangue foi detectada uma cepa de *Vibrio metschnikovii*, sendo esta a provável fonte de infecção à vesícula biliar. As anomalias de coagulação sanguínea detectadas na paciente foram compatíveis com septicemia. Não se sabe ao certo em que momento a paciente foi infectada pela bactéria em questão, podendo esta ter sido adquirida anos antes da paciente ter mantido qualquer contato com água salgada ou frutos do mar, que propiciaram um ambiente favorável para seu crescimento. Este relato é o primeiro a sugerir que *Vibrio metschnikovii* pode causar doenças em humanos.

Em 1988, MIYAKE *et al.* isolaram *Vibrio metschnikovii* das fezes de uma paciente com diarreia. Tratava-se de uma senhora de 60 anos de idade, admitida no hospital em Junho de 1985, apresentando apatia geral; era portadora de diabetes mellitus e de um hepatoma. Durante o tratamento com insulina apresentou quadro de diarreia seguida de febre, ocasião em que *Vibrio metschnikovii* foi isolado das fezes diarreicas em colônia pura e nenhum outro enteropatógeno foi encontrado. Quando a paciente recuperou-se da diarreia e da febre a bactéria não foi mais encontrada em suas fezes.

HANSEN *et al.* (1993) descreveram dois casos de infecção ocasionada por *Vibrio metschnikovii*, o primeiro ocorreu em Bruxelas, Bélgica e o segundo em

Villefranche-sur-Saône, França. No primeiro caso um paciente de 70 anos foi admitido no Hospital Universitário de St. Luc com sintomas de dispnéia tipo III, fraqueza, dores abdominais, diarreia, vômitos, náuseas, vertigens e cefaléia. Seu histórico médico incluía tabagismo, alcoolismo, diabetes insulino-dependente, insuficiência renal, cirrose alcoólica, anormalidades da coagulação sanguínea e uma úlcera duodenal. Ao exame físico ele estava desidratado, sua temperatura era de 36,5 °C e sua pressão arterial oscilava entre 180/70 e 150/70 mmHg. Sua radiografia de tórax revelou uma infecção pulmonar. Foi iniciado, então, o tratamento com Ampicilina endovenosa e diurético. Após quatro dias de tratamento o paciente permanecia dispnéico e febril e em todas as culturas de sangue foi identificado *Vibrio metschnikovii*. O estado geral do paciente se deteriorou rapidamente e o mesmo foi a óbito cinco dias após sua admissão por um infarto do miocárdio.

O segundo caso foi uma paciente com 82 anos, admitida no Hospital Municipal Geral, com severa dispnéia, fraqueza excessiva e sérias lesões cutâneas nas pernas. Seu histórico médico incluía enfisema, asma, úlceras cutâneas, insuficiência cardíaca e hipertensão. No exame físico estava dispnéica com sinais de cianose. Seu raio-x de tórax revelou derrame pleural direito. A paciente foi prontamente tratada com Amoxicilina-clavulanato intravenosa (2 g a cada 8 h) e Tobramicina (75 mg a cada 8 h). A necrose das feridas das pernas foi curada cirurgicamente. Das três amostras de sangue coletadas na admissão apenas a terceira foi positiva para *Vibrio metschnikovii*. Suas lesões cicatrizaram lentamente e ela recebeu alta do hospital no final da terceira semana.

Em 1994, HARDARDOTTIR *et al.* relataram um caso de bacteremia, no qual foi isolado *Vibrio metschnikovii* em uma senhora de 83 anos em 1992. A mesma mostrou sinais de infarto do miocárdio e logo após a internação, a paciente evoluiu com febre alta e calafrios. Duas culturas de sangue foram coletadas com 1,5 h de intervalo e também uma amostra de urina. O tratamento com Ampicilina intravenosa foi iniciado a partir do qual a condição da paciente melhorou rapidamente. *Vibrio metschnikovii* foi isolado nas duas amostras de sangue nas quais também foi isolada uma cepa de *Staphylococcus* spp. e em uma delas *Escherichia coli*. O pesquisador concluiu que *Vibrio metschnikovii* pode causar sérias infecções em humanos.



DALSGAARD *et al.* (1996) relataram possivelmente o primeiro surto de *Vibrio metschnikovii*, no qual foram descritos cinco casos provenientes de dois hospitais em Arequipa, Peru, onde funcionava um Sistema de Vigilância para cólera, em 1994. As cepas foram isoladas de amostras de fezes obtidas de todos os pacientes que tinham idade variando entre onze a vinte meses. Os pacientes apresentavam sintomas de diarreia aguda, apresentando fezes líquidas e semilíquidas. Não foi possível identificar a fonte de transmissão, mas foi possível evidenciar que *Vibrio metschnikovii* pode ser um patógeno potencial para causar diarreia em humanos.

HLADY e KLONTZ (1996) realizaram um estudo epidemiológico de infecções ocasionadas por vibrios, na Flórida, de 1981 a 1993. Foram relatados 675 casos, dentre estes, 159 provieram de infecções de feridas cutâneas. Todas as espécies de *Vibrio*, exceto *V. cholerae* O1, foram relacionadas e *Vibrio metschnikovii* foi responsável por apenas um caso de infecção.

MAGALHÃES *et al.* (1996) descreveram a presença de seis cepas de *Vibrio metschnikovii* durante uma epidemia de cólera que ocorreu em Recife/PE, Brasil, em 1992. Neste estudo foram analisadas 4000 amostras de fezes diarreicas, entre Março e Dezembro de 1992 e o mesmo período de 1993. Das 73 cepas identificadas como vibrios não-cólera, seis (8,2%) foram classificadas como *Vibrio metschnikovii*.

Uma pesquisa desenvolvida em Jacarta, Indonésia, entre Fevereiro de 1996 e Maio de 1998, obteve 4820 amostras de pacientes com diarreia aguda, dentre elas 1024 positivas para *Vibrio* spp. De 938 pacientes, dos quais foi isolada apenas uma espécie de *Vibrio*, *Vibrio metschnikovii* foi responsável por três infecções. Em 86 pacientes foram isoladas duas espécies de *Vibrio* por infecção, sendo que *Vibrio metschnikovii* foi encontrado em apenas uma, juntamente com *V. cholerae* não-O1. Dentre as infecções causadas por *Vibrio metschnikovii*, uma acometeu um paciente do sexo masculino com idade superior a 45 anos, e três acometeram mulheres com idade entre 20 e 45 anos. Os sintomas apresentados pelos pacientes infectados por *Vibrio metschnikovii* revelaram 10 ou mais eventos de diarreia dentro de 24 h, vômitos, dores abdominais e desidratação (LESMANA *et al.*, 2002).

LINDE *et al.* (2004) relataram o primeiro caso de isolamento de *Vibrio*

*metschnikovii* de uma infecção de ferida pós cirúrgica levando o retardamento da cicatrização. O microrganismo foi isolado da ferida localizada na perna direita de um paciente de 64 anos, submetido à safenectomia nas duas pernas. Uma provável fonte de infecção seria o manuseio e contato durante o abate de animais (bezerros, suínos e veados) já que o paciente trabalhava neste ofício e retornou ao trabalho logo após a alta hospitalar. A identificação de *Vibrio metschnikovii* se deu pelo sistema automatizado Vitek 2 (cartão Vitek ID-GNB, software versão WSVT2-R03.01). Também foi realizada PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) do gene 16S rDNA e sequenciamento direto que foi 100% similar a cepa X74712.1 do GenBank.

WALLET *et al.* (2005) relataram o primeiro caso de *Vibrio metschnikovii* isolado de aspirado brônquico de paciente com pneumonia. O paciente com 63 anos de idade foi admitido na unidade de terapia intensiva de um hospital em Lille, França, com insuficiência respiratória aguda relacionada à pneumonia. O paciente apresentava histórico de doença pulmonar crônica. O tratamento empregado com Salmeterol oral, Terbutalina e Prednisolona (40 mg/dia) não foram suficientes para recuperação do quadro sendo necessário o início de novo tratamento com Amoxicilina+Ácido clavulânico e Ciprofloxacina. A cepa foi identificada pelo sistema automatizado Vitek 2 ID GNB (bioMérieux) e submetida ao sequenciamento do gene 16S rDNA para confirmar a identificação. A fonte de infecção não foi identificada.

PRASAD e KHARIDEHAL (2006) relataram o primeiro caso de septicemia secundária em um neonato de cinco dias de vida causada por *Vibrio metschnikovii*. A criança apresentava sangramento umbilical e letargia. Uma cultura de sangue foi realizada e após 48 h de incubação houve o crescimento de *Vibrio metschnikovii*. Para identificar a fonte de infecção foi realizado um esfregaço do colo de útero materno e de sangue, porém não foi documentado nenhum microrganismo.

MARTIN *et al.* (2008) relataram um caso no qual *Vibrio metschnikovii* foi isolado de uma úlcera em membro inferior esquerdo. A paciente de 49 anos proveniente do Uruguai vivia na Espanha há cinco meses e apresentava histórico de fibromialgia nos últimos sete anos e frequentes úlceras nas pernas. Foi admitida no hospital por sofrer com as dolorosas úlceras nas pernas que haviam se transformado

em um linfedema crônico. O microrganismo foi identificado pelo sistema automatizado Vitek 2 GN e ID 32 E gallery (bioMérieux) e foi confirmado pelo sequenciamento do gene 16S rDNA.

#### 1.4 CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS E ALIMENTARES

VENKATESWARAN *et al.* (1989) caracterizaram vibrios isolados de água doce em Hiroshima, Japão. De 618 cepas isoladas, 361 foram identificadas como *Vibrio* spp. e dentre elas 11% *Vibrio metschnikovii*. As amostras de água foram coletadas de diferentes partes do rio Otha (amostras de água doce) e também de pontos em que o rio entrava em contato com o mar (amostras de água salobra). Todas as cepas de *Vibrio metschnikovii* foram isoladas das amostras de água doce, mostrando sua capacidade de habitar ambientes com baixa concentração de NaCl que era desconhecida até aquela data. É interessante salientar que foram realizados testes para caracterizar vibrios toxigênicos e *Vibrio metschnikovii* não foi incluído dentre eles, pois as cepas não apresentaram atividade hemolítica nem citotóxica.

MOSUPYE e HOLY (2000) realizaram um estudo para identificação dos riscos microbiológicos oferecidos pelas comidas de rua vendidas em Joanesburgo, África do Sul. Foram analisadas 132 amostras de carne, salada e molho de carne, coletadas de dois vendedores de rua por mais de onze vezes, com o objetivo de avaliar a qualidade e segurança microbiológica. As amostras foram coletadas durante a preparação e manuseio. *Vibrio metschnikovii* estava presente em 2% das amostras, sendo detectado em amostras de carne de galinha, uma delas crua e outra cozida. Aparentemente a contaminação se deu pelos vendedores usarem a mesma faca para cortar vários alimentos sem higienizar a mesma entre a manipulação de um alimento e outro, resultando em uma contaminação cruzada.

Em 2001, pela primeira vez uma cepa de *Vibrio metschnikovii* foi isolada de um reservatório de água potável perto da cidade de Vladivostok no Extremo Oriente da Rússia. A bactéria isolada apresentou as características bioquímicas normais para

a espécie e nenhuma atividade hemolítica ou citotóxica foi notada. Neste mesmo estudo foi analisada a composição fosfolipídica da membrana de *Vibrio metschnikovii*, detectando 76,5% de fosfatidiletanolamina, 18,3% de fosfatidilglicerol e 5,2% de difosfatidilglicerol. No entanto, a composição fosfolipídica não é suficiente para realizar a diferenciação entre gênero e espécie, servindo apenas como um recurso adicional (IVANOVA *et al.*, 2001).

YALCINKAYA *et al.* (2003) isolaram 83 cepas de vibrios de uma espécie de caranguejo azul - *Callinectes sapidus*, na cidade de Belek costa turística da Turquia. Do total de cepas, três eram de *Vibrio metschnikovii*, confirmando sua característica de habitar naturalmente em mares e conseqüentemente ser transmitidos por animais marinhos, vetores em potencial.

ELHADI *et al.* (2004) realizaram um estudo para detecção de nove espécies potencialmente patogênicas de *Vibrio* presentes em frutos do mar que foram obtidos em bancas de feiras livres e supermercados de onze bairros de quatro Estados da Malásia entre Julho/1998 e Junho/1999. Foram examinadas 768 amostras que incluíram camarão, lula, caranguejo, berbigão e mexilhão. A incidência de *Vibrio metschnikovii* nestas amostras foi de 9,9%.

Em estudo realizado no Brasil, cepas de *Vibrio metschnikovii* foram isoladas de peixes marinhos, somando 52,9% do total de espécies de *Vibrio* isoladas deste tipo de amostra (MATTÉ *et al.*, 2007).

IGBINOSA *et al.* (2009) realizaram um estudo sobre a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos e a possível associação com organismos planctônicos no efluente final de uma estação de tratamento de águas residuárias em comunidade rural de uma Província do Cabo Oriental da África do Sul. *Vibrio metschnikovii* estava presente em 5,8% das amostras e foi considerado como de vida livre, pois não foi identificado em associação ao planctôn. Este estudo mostra que a concentração de cloro residual (variou de 0,09 mg/L a 1,4 mg/L) empregada no tratamento não foi suficiente para eliminar estes patógenos.

Em 2010, ANTUNES *et al.* realizaram estudo com o objetivo de identificar a predominância bacteriana nos fluidos e muco de *Anodonta cygnea* - espécie de

molusco bivalve de água doce – e avaliar a relação entre a microbiota ambiental e as bactérias indígenas encontradas no molusco. Das cinco espécies presentes nos fluidos e muco, *Vibrio metschnikovii* correspondeu a 29,2% dos isolados do fluido extrapalial, 50% da hemolinfa e 60% do muco, somando 46,1% do total das espécies microbianas isoladas. Os resultados demonstraram que *Vibrio metschnikovii* estabelece uma relação comensal com o molusco estudado, não causando doenças nem morte ao mesmo.

## 1.5 RESISTÊNCIA

De acordo com a Academia Americana de Microbiologia (AAM, 2009), diariamente lutamos contra a resistência aos antimicrobianos, a cada nova cepa que se mostra resistente. Os microrganismos, assim como todos os seres vivos, são regidos pela evolução e a cada instante adquirem novos mecanismos para sua sobrevivência frente às novas drogas que querem suprimi-los. O meio ambiente é um grande reservatório de genes, e muitas mutações podem resultar em resistência. Como o fim deste fenômeno é improvável, é importante o desenvolvimento de novas estratégias para que se evite a propagação de novas resistências. Segundo HENRIQUES *et al.* (2006), determinantes genéticos de resistência detectados em comunidades microbianas de ambientes naturais fazem aumentar a preocupação com o risco que reservatórios naturais de resistência a antibióticos conferem a saúde humana.

A resistência pode ser expressa através de mecanismos intrínsecos ou de forma adquirida. Os genes de resistência podem ser encontrados em regiões cromossômicas e extracromossômicas dos microrganismos. Os mecanismos de resistência intrínsecos ocorrem naturalmente e são codificados por genes cromossômicos. Os mecanismos adquiridos envolvem mutações nos genes alvo dos antibióticos, e a transferência da resistência fica a cargo de plasmídios, transposons e integrons. O mecanismo primário pelo qual bactérias adquirem resistência a antibióticos é a transferência horizontal de genes. A falta de higiene e saneamento

adequado são fatores importantes que favorecem a disseminação de resistência bacteriana, contribuindo para uma rápida proliferação dos patógenos. Este fenômeno pode também ser ampliado pelo uso adequado ou não, de antibióticos. O resultado é visto meses ou anos após com o surgimento de infecções que não podem mais ser tratadas com os antibióticos que eram usados comumente (ALEKSHUN e LEVY, 2007; AAM, 2009).

No aspecto clínico a resistência a antibióticos trata-se da capacidade de um microrganismo resistir a concentrações de antibióticos que eram capazes de matá-lo. Quando uma cepa sensível ganha habilidade de resistir a determinado antibiótico ela é então denominada como resistente. No âmbito da genética um microrganismo é resistente quando possui um gene que expressa resistência a determinada droga, estes genes estão amplamente distribuídos, pois o fluxo que percorrem no ambiente e intestino humano é extenso, desta forma eles podem ser passados de um organismo para outro facilmente (AAM, 2009).

### 1.5.1 Testes de Suscetibilidade aos Antibióticos

Diagnósticos rápidos que determinem o agente infeccioso causador da doença e o antibiograma são cada vez mais necessários, para que possa ser evitado o uso indiscriminado de antibióticos. Entretanto não se deve subestimar a importância da precisão do antibiograma e deve ser clara a idéia de que um erro que exagera a resistência é mais aceitável do que um erro que classifica o organismo como falsamente suscetível. Em muitos países fora dos EUA e da Europa Ocidental os testes não estão adequadamente padronizados, o que interfere na forma de interpretação e terapêutica adotadas em cada localidade (AAM, 2009).

A suscetibilidade aos antibióticos pode ser medida através de diferentes metodologias tais como: o antibiograma que pode ser quantitativo (Diluição em Caldo e E-teste) ou qualitativo (Disco-Difusão) e métodos automatizados. O teste de Diluição em Caldo (micro ou macrodiluição) mede a concentração mínima necessária para um antibiótico inibir o crescimento de um microrganismo, sendo

específica para cada microrganismo e antibiótico relacionado. O E-test se apresenta sob a forma de uma fina fita contendo diferentes gradientes de concentração do antibiótico impregnado; o resultado será exibido através da formação de um halo que pode ser medido pela própria marcação impressa na fita. O teste de Disco-Difusão é o mais utilizado devido à facilidade e rapidez (resultado em 24h); sua interpretação se dá através da medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, sendo esta específica para cada antibiótico e microrganismo. Diversos métodos automatizados vêm sendo utilizados na rotina laboratorial, com distintas metodologias que permitem a obtenção de resultados em prazos curtos de três a seis horas, são exemplos: Bactec<sup>®</sup>, Bio Argos<sup>®</sup>, Vitek<sup>®</sup> e outros. Todos os testes têm por objetivo caracterizar o microrganismo como sensível, intermediário ou resistente dependendo do resultado observado, que deve então ser comparado com os padrões estabelecidos pelos órgãos competentes através das normas publicadas e atualizadas anualmente (JORGENSEN e FERRARO, 2009; TAVARES, 2009a).

A edição da Norma publicada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003) que padroniza o teste de Disco-Difusão foi traduzida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2003. Entretanto anualmente são publicadas atualizações pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), e o mais recente, CLSI 2010, preconiza a utilização do documento M45-A (Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, CLSI, 2006) para microrganismos como a espécie alvo do presente estudo. Este documento traz as interpretações dos termos utilizados para a classificação dos microrganismos diante da atuação dos antibióticos, considerando sensível o isolado inibido pela dosagem ideal de um antibiótico recomendado para a infecção em questão; intermediário o isolado que é suprimido por uma dosagem mais alta do que a habitual ou quando a infecção causada pode ser tratada em locais do corpo onde as drogas se concentrem fisiologicamente; e como resistente o isolado que não é inibido pelas concentrações normalmente prescritas em tratamentos habituais ou pela ocorrência de mecanismos de resistência específicos.

## 1.6 ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Antimicrobianos são constituídos por moléculas que interrompem o crescimento microbiano (efeito bacteriostático) ou, matam imediatamente (efeito bactericida), entretanto estes efeitos podem ser acionados por um mesmo antibiótico frente aos diferentes tipos de exposição (WALSH, 2003).

Os antibióticos utilizados nos dias de hoje tiveram sua origem em compostos antibacterianos produzidos por outros organismos como formas de proteger seus territórios. Essas bactérias não apenas sobreviveram, mas sofreram adaptações e colonizaram algumas das partes menos habitáveis do planeta, provando seu poder de adaptação (BENNETT, 2008).

A era moderna da quimioterapia antibacteriana teve início em 1935 quando Gerhard Domagk demonstrou a atividade das sulfonamidas, e no decorrer dos anos seguintes foram descobertas as principais famílias de antibióticos (BRYSKIER, 2005).

Os antibióticos indicados para o tratamento de infecções bacterianas podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação. A escolha dos discos de antibióticos a serem usados durante o teste de Disco-Difusão no antibiograma deve ser específica para determinado patógeno no caso de pesquisa direcionada (ANVISA, 2003). Segundo TAVARES (2009b) os principais antibióticos utilizados contra bacilos gram-negativos são: aminoglicosídeos; carbapenêmicos; cefalosporinas; monobactâmicos; piperacilina, quinolonas e sulfonamidas.

### 1.6.1 Beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos são antibióticos de amplo espectro que recebem este nome por possuírem um anel beta-lactâmico (grupo químico heterocíclico azetidina), cujo rompimento resulta na perda da ação antimicrobiana. Todos têm ação bactericida que inibe a síntese da parede celular. São os antibióticos mais



comumente utilizados no tratamento de doenças infecciosas em humanos, sendo suas principais classes as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (BABIC, 2006; BALSALOBRE, 2009; TAVARES, 2009c).

#### 1.6.1.1 Penicilinas

As penicilinas possuem como núcleo central o anel beta-lactâmico ligado a um anel tiazolidínico que dá origem ao ácido penicilânico, que pode se ligar a radicais variáveis, originando os diferentes tipos de penicilinas. A ação desta classe é principalmente contra as bactérias que não produzem beta-lactamases, e esta se dá na superfície externa da membrana citoplasmática, onde ocorre a ligação do antibiótico a uma PBP (proteína ligadora de penicilina) impedindo a biossíntese do peptidoglicano, formador essencial da parede celular bacteriana (BRYSKIER, 2005; TAVARES, 2009c).

#### 1.6.1.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas apresentam um grupo cefém como núcleo central formado por um anel beta-lactâmico ligado a um anel hexacíclico não saturado (dihidrotiazina). Apresentam um amplo espectro de ação, que diferem entre si devido a modificações introduzidas no núcleo central, gerando as cefalosporinas de **primeira, segunda, terceira e quarta gerações**. Todas têm mecanismo de ação similar às penicilinas, inibindo a síntese da parede celular através da ligação às PBPs. Entre as de **primeira geração** destaca-se a Cefalotina - o primeiro antibiótico de uso clínico apresentado em 1962, que nos dias de hoje não é mais indicado para o tratamento de infecções graves causadas por bacilos gram-negativos, devido à resistência desenvolvida por estes microrganismos. Já as de **segunda geração** apresentam espectro mais amplo sobre cocos gram-negativos, mas não totalmente resistentes à inativação por beta-lactamases. As cefalosporinas de **terceira geração** apresentam

maior potência contra bactérias gram-negativas e demonstram maior resistência à inativação por beta-lactamases, mas são importantes indutoras destas enzimas. As de **quarta geração** são altamente eficazes contra gram-negativos e ativas sobre microrganismos produtores de beta-lactamases de origem plasmidial e cromossômica, e são representadas no Brasil pelo Cefepime. As **cefamicinas** que são consideradas cefalosporinas de **segunda geração**, diferem das mesmas apenas por possuírem um grupamento metoxílico no núcleo cefém. Pertence a esta classe a Cefoxitina, antibiótico resistente à inativação por algumas beta-lactamases, o qual induz a produção destas enzimas, de origem cromossômica, em bacilos gram-negativos. Desta forma o uso deste antibiótico é preocupante, pois pode determinar o surgimento de microrganismos resistentes a beta-lactâmicos variados (TAVARES, 2009d).

#### 1.6.1.3 Carbapenêmicos e Monobactâmicos

Os carbapenêmicos apresentam um anel pentagonal não saturado ligado ao anel beta-lactâmico o que lhes confere elevada potência contra gram-positivos e negativos e grande estabilidade na presença de beta-lactamases, devido a presença de uma cadeia hidroxietila. Um representante desta classe, o Imipenem, é o antibiótico com mais amplo espectro de ação, agindo contra cocos e bacilos gram-positivos e negativos, aeróbios e anaeróbios de importância clínica; é resistente à degradação por quase todas as beta-lactamases, mas sensível a inativação por metalo-beta-lactamases. Está disponível para uso no Brasil em associação a Cilastatina, por provocar nefrotoxicidade quando usado isoladamente. Outros carbapenêmicos como o Meropenem e o Ertapenem, têm ações similares ao Imipenem, sendo o primeiro mais potente contra bacilos gram-negativos e anaeróbios e o segundo contra bactérias gram-positivas, hemófilos e enterobactérias, incluindo também estirpes de bacilos gram-negativos produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (TAVARES, 2009e).

Os monobactâmicos são caracterizados pela presença de um anel monocíclico em sua estrutura. Apresentam pequena importância prática devido à baixa potência antimicrobiana. O Aztreonam é o primeiro antibiótico monobactâmico liberado para uso clínico e seu espectro de ação se dá contra bactérias gram-negativas; o mesmo apresenta alta resistência à inativação por beta-lactamases, sendo ativo contra microrganismos gram-negativos resistentes às cefalosporinas de terceira geração, mas é inativado por beta-lactamases de espectro estendido (LE NOC, 2005; TAVARES, 2009e).

#### 1.6.1.4 Mecanismos de Resistência aos Beta-Lactâmicos

As bactérias possuem diversos mecanismos para produzirem resistência a esta classe de antibióticos, como a alteração das PBPs que resulta em baixa afinidade aos beta-lactâmicos; a falta ou diminuição da expressão de proteínas de membrana externa (OMPs) que restringe a entrada de beta-lactâmicos no espaço periplasmático, conseqüentemente não acessando as PBPs; e a produção de beta-lactamases, sendo este o mecanismo de resistência mais importante em bactérias gram-negativas (BABIC, 2006; HENRIQUES, 2006).

##### 1.6.1.4.1 Beta-lactamases

As beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico dos antibióticos por hidroxilação irreversível da ligação amida, impedindo a ligação do anel às PBPs tornando possível a síntese da parede celular bacteriana. Sua classificação é feita com base em sua estrutura primária (classificação molecular de Ambler), pertencendo às classes A, C e D as beta-lactamases que possuem um resíduo de serina em seu centro ativo e a classe B aquelas que possuem um íon de metal, como zinco ( $Zn^{2+}$ ), que são necessários no ataque e quebra da ligação amida presente no anel. Os genes codificadores destas enzimas podem estar localizados no

cromossomo bacteriano, em plasmídios ou transposons (BABIC, 2006; TAVARES, 2009f).

As beta-lactamases cromossômicas são produzidas de forma indutiva, quando a bactéria sofre exposição a vários antibióticos, ou constitutiva, quando sua produção é natural, em níveis baixos, provavelmente exercendo alguma função no metabolismo da parede celular. Algumas bactérias gram-negativas possuem o gene *AmpC* codificador para a produção de beta-lactamases situado em seu cromossomo. Entretanto, para a maioria dos gram-negativos, a produção de beta-lactamases é mediada por plasmídios e transposons, devido ao fenômeno de transposição, que permite a troca e inserção de genes cromossômicos e plasmidiais (BABIC, 2006; TAVARES, 2009f).

As classificações comumente adotadas para beta-lactamases podem estar baseadas nas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas como proposto por Ambler, em 1980, como uma classificação molecular das enzimas de A-D, ou podem ser baseadas nas propriedades bioquímicas, classificação funcional, proposta por Bush *et al.*, em 1995, atualizado em 2010 por Bush e Jacoby, como mostra o Quadro 1. Para melhor compreensão as beta-lactamases estão divididas em três grandes grupos, ESBLs, MBLs e AmpCs (DROPA, 2006; BALSALOBRE, 2009; BUSH e JACOBY, 2010).

As ESBLs (beta-lactamases de espectro estendido) são enzimas que apresentam um aminoácido serina em seu centro ativo, sendo este seu principal resíduo catalítico. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda (exceto cefamicinas) e terceira geração, e Aztreonam, apresentando suscetibilidade a inibição por Ácido clavulânico, Sulbactam e/ou Tazobactam. As principais ESBLs estão distribuídas nos grupos TEM, SHV e CTX-M que no total apresentam 179, 134 e 103 variantes, respectivamente, e são mais comumente isolados em amostras clínicas (BUSH e JACOBY – 2003, 2010; NAAS *et al.*, 2008).

As MBLs (metalo-beta-lactamases) são enzimas capazes de hidrolisar todos os beta-lactâmicos disponíveis comercialmente com exceção do Aztreonam. Estas enzimas necessitam de pelo menos um íon  $Zn^{2+}$  ou outro cátion divalente, para atuar

como cofator da sua atividade catalítica, facilitando a hidrólise do anel beta-lactâmico bicíclico; são resistentes ao Ácido clavulânico e Tazobactam e sensíveis ao EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e ácido dipicolínico. Estão incluídas nesta classe de enzimas as seguintes subclasses: IMP (29 variantes), VIM (23), SPM (1), GIM (1) e SIM (1), entre outras. As subclasses IMP e VIM estão distribuídas globalmente, mais frequentemente em bactérias não fermentadoras e também nas enterobactérias. A MBL SPM-1 foi descoberta no Brasil, em uma cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* e desde então tem se mantido restrita a esta espécie e ao Brasil, onde já foi detectada em diversas localizações (TOLEMAN *et al.*, 2002; BABIC, 2006; MENDES *et al.*, 2006; BERTONCHELI e HÖRNER, 2008; BUSH e JACOBY, 2010).

As MBLs adquiridas são codificadas por genes contidos em integrons, que podem associar-se a plasmídios ou transposons, e fazer a transferência a outras bactérias. Apenas SPM-1, possui genes que fazem parte de uma estrutura móvel diferenciada (QUEENAN e BUSH, 2007).

As AmpC beta-lactamases possuem um aminoácido serina em seu centro ativo e são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas incluindo as cefamicinas e monobactâmicos em baixa escala. A maioria dessas enzimas não é inibida por Ácido clavulânico, Sulbactam e Tazobactam, e seus principais inibidores são Cloxacilina, Oxacilina, Aztreonam e ácidos borônicos. Em geral, são mediadas por genes cromossômicos, mas também podem ser codificadas por genes plasmidiais, principalmente nas espécies que não possuem as AmpCs cromossômicas. Os principais grupos descritos são: CMY (62 variantes), MIR (5), MOX (8), LAT (1), FOX (8), DHA (7), ACT (8), ACC (4) e CFE (1) (BUSH e JACOBY - 2003, 2010; JACOBY, 2009)

**Quadro 1** - Esquema de classificação de beta-lactamases, ampliado de Bush *et al.* (1995).

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe Molecular	Antibióticos	Inibição por		Características	Enzimas Representativas
				AC <sup>a</sup>	EDTA <sup>b</sup>		
1	1	C	cefalosporinas	não	não	Melhor hidrólise de cefalosporinas do que benzilpenicilina. Hidrolisa Cefamicina	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI <sup>c</sup>	C	cefalosporinas	não	não	Hidrólise de Ceftazidima aumentada e outros oximino-beta-lactâmicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	penicilinas	sim	não	Melhor hidrólise de benzilpenicilinas do que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	penicilinas, cefalosporinas 3 <sup>a</sup> geração	sim	não	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	sim	não	Hidrólise de oximino-beta-clactâmicos aumentada (Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxome, Cefepime, Aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	penicilinas	não	não	Resistência a Ácido clavulânico, Sulbactam e Tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	não	não	Hidrólise de oximino-beta-lactâmicos aumentada combinada com resistência a Ácido clavulânico, Sulbactam e Tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbanicilina	sim	não	Hidrólise de Carbanicilina aumentada	PSE-1, CARB-3

<sup>a</sup>AC, Ácido clavulânico; <sup>b</sup>EDTA, ácido etilenodiaminotetracético; <sup>c</sup>NI, não incluso; <sup>d</sup>v, variável. Fonte: BUSH e JACOBY (2010).

**Quadro 1** - Esquema de classificação de beta-lactamases, ampliado de Bush *et al.*(1995) (continuação)

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe Molecular	Antibióticos	Inibição por		Características	Enzimas Representativas
				AC <sup>a</sup>	EDTA <sup>b</sup>		
2ce	NI	A	Carbanicilina, Cefepime	sim	não	Hidrólise de Carbanicilina, Cefepime e Cefpirona aumentada	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	v <sup>d</sup>	não	Hidrólise de Cloxacilina ou Oxacilina aumentada	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	cefalosporinas de espectro estendido	v	não	Hidrólise de Cloxacilina ou Oxacilina e oximino-beta-lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	carbapenêmicos	v	não	Hidrólise de Cloxacilina ou Oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	cefalosporinas de espectro estendido	sim	não	Hidrólise de cefalosporinas. Inibidas por Ácido clavulânico, mas não por Aztreonam	CepA
2f	2f	A	carbapenêmicos	v	não	Hidrólise de carbapenêmicos, oximino-beta-lactâmicos, cefamicinas aumentada	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (Subclasse B1) (Subclasse B3)	carbapenêmicos	não	sim	Hidrólise de amplo espectro, incluindo carbapenêmicos mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3B	3	B (Subclasse B2)	carbapenêmicos	não	sim	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos,	CphA, Sfh-1
NI	4	desconhecido					

<sup>a</sup>AC, Ácido clavulânico; <sup>b</sup>EDTA, ácido etilenodiaminotetracético; <sup>c</sup>NI, não incluso; <sup>d</sup>v, variável. Fonte: BUSH e JACOBY (2010).

## 1.6.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos ativos principalmente contra bacilos gram-negativos, solúveis em água, constituídos por uma estrutura polar de cátions que impede sua absorção por via oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular; assim, estes antibióticos dependem de energia e oxigênio para adentrarem ao meio intracelular e só então se ligam irreversivelmente a subunidade 30S ribossômica, o que pode resultar na formação de proteínas defeituosas que alteram o funcionamento da membrana celular, gerando a morte bacteriana ou, inibindo a síntese protéica, por impedir a ligação do RNA mensageiro ao ribossomo. No Brasil estão disponíveis para uso a Amicacina, Aminosidina, Espectinomicina, Estreptomicina, Framicetina, Gentamicina, Neomicina, Netilmicina e Tobramicina. Os microrganismos podem exibir vários mecanismos de resistência contra aminoglicosídeos que podem atuar simultaneamente numa mesma célula, tais como: diminuição da permeabilidade (modificação da membrana externa ou diminuição do transporte na membrana interna), modificação do alvo ribossomal (por mutação cromossômica), bomba de efluxo e modificação enzimática. Pode ocorrer ainda a resistência adquirida que pode ter origem cromossômica ou plasmidial, principalmente pelo processo de aquisição de plasmídios conjugativos contendo genes de resistência. O principal mecanismo de resistência é a produção de enzimas que inativam o antibiótico. Três famílias de enzimas têm demonstrado este papel e são classificadas como aminoglicosídeos fosfotransferases (APHs), acetiltransferases (AACs) e nucleotidiltransferases (ANTs). Desta forma, enzimas individuais pertencentes à mesma classe, que produzem o mesmo fenótipo de resistência, mas são codificadas por genes diferentes, são designadas por uma letra minúscula como, por exemplo, AAC(6')-Ia, sendo 6' a posição que o antibiótico foi modificado, e os respectivos genes (*aac(6')-Ia*) são designados por letras minúsculas em itálico idênticos às enzimas por eles codificadas. A enzima ANT(3'')-Ia foi identificada em *Vibrio cholerae*, bem como AAC(3)-Id em *Vibrio fluvialis*. Os genes codificadores de APH(6)-Id e APH(3'')-Ib referenciados na literatura como (*strA* e *strB*, ou *aph(3'')-Ib* e *aph(6)-Id*) têm sido relatados em associação com microrganismos



patogênicos e ambientais e foram encontrados em um transposon de *Vibrio cholerae*. AAC(6')-Ib é provavelmente a enzima de maior relevância clínica, comumente encontrada em gram-negativos inclusive em *Vibrio*. O Quadro 2 apresenta a lista de enzimas que conferem resistência aos aminoglicosídeos (VAKULENKO e MOBASHERY, 2003; TAVARES, 2009g; RAMIREZ e TOLMASKY, 2010).

**Quadro 2** - Enzimas e respectivos aminoglicosídeos inativados.

<b>Fosfotransferases</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>APH (3')</b>	
I	Canamicina, Lividomicina, Neomicina, Paromomicina, Ribostamicina
II	Butirosina, Canamicina, Neomicina, Paromomicina, Ribostamicina
III	Amicacina, Butirosina, Canamicina, Isepamicina, Lividomicina, Neomicina, Paromomicina, Ribostamicina
IV	Butirosina, Canamicina, Neomicina, Paromomicina, Ribostamicina
V	Neomicina, Paromomicina, Ribostamicina
VI	Amicacina, Butirosina, Canamicina, Isepamicina, Neomicina, Paromomicina, Ribostamicina
VII	Canamicina, Neomicina
<b>APH(2'')</b>	
Ia (enzima bifuncional)	Canamicina, Dibecacina, Gentamicina, Sisomicina, Tobramicina
Ib, Id	Canamicina, Dibecacina, Gentamicina, Netilmicina, Tobramicina
Ic	Canamicina, Gentamicina, Tobramicina
<b>APH(3'')</b> -Ia, -Ib	Estreptomicina
<b>APH(7'')</b> -Ia	Higromicina
<b>APH(4)</b> -Ia, -Ib	Higromicina
<b>APH(6)</b> -Ia, -Ib, -Ic, -Id	Estreptomicina
<b>APH(9)</b> -Ia, -Ib	Espectinomicina
<b>Acetiltransferases</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>AAC(6')</b>	
I (no mínimo 24 enzimas diferentes)	Amicacina, Canamicina, Dibecacina, Isepamicina, Netilmicina, Sisomicina, Tobramicina
II	Canamicina, Dibecacina, Gentamicina, Netilmicina, Sisomicina, Tobramicina

**Quadro 2** - Enzimas e respectivos aminoglicosídeos inativados (continuação).

<b>Acetiltransferases</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>AAC(3)</b>	
Ia, Ib	Fortimicina, Gentamicina, Sisomicina,
IIa, IIb, IIc	Dibecacina, Gentamicina, Netilmicina, Sisomicina, Tobramicina,
IIIa, IIIb, IIIc	Canamicina, Dibecacina, Gentamicina, Lividomicina, Neomicina, Paromomicina, Sisomicina, Tobramicina
IV	Apramicina, Dibecacina, Gentamicina, Netilmicina, Sisomicina, Tobramicina
VII	Gentamicina
<b>AAC(1)</b>	Apramicina, Lividomicina, Paromomicina, Ribostamicina
<b>AAC(2')-Ia</b>	Dibecacina, Gentamicina, Neomicina, Netilmicina, Tobramicina
<b>Nucleotidiltransferases</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>ANT(2'')-I</b>	Canamicina, Dibecacina, Gentamicina, Sisomicina, Tobramicina
<b>ANT(3')-I</b>	Espectinomicina, Estreptomicina
<b>ANT(4')-Ia</b>	Amicacina, Canamicina, Dibecacina, Isepamicina, Tobramicina
<b>ANT(4')-IIa</b>	Amicacina, Canamicina, Isepamicina, Tobramicina
<b>ANT(6')-I</b>	Estreptomicina
<b>ANT(9)-I</b>	Espectinomicina

Fonte: VAKULENKO e MOBASHERY, 2003.

### 1.6.3 Tetraciclínas

São antibióticos de amplo espectro de ação, constituídos por uma família de produtos naturais e semi-sintéticos, derivados de diferentes espécies de *Streptomyces*. Apresentam uma estrutura tetracíclica, formada pela fusão de quatro anéis, e são divididas em três gerações de acordo com a ordem de seu descobrimento. Sua ação se dá através da ligação a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a fixação do RNA transportador e assim, inibindo a síntese de proteínas. Esses antibióticos são eficientes no combate a microrganismos que não apresentam parede celular, como micoplasmas e são a principal indicação na terapêutica da cólera. No Brasil, está disponível para o uso clínico, a Tetraciclina, a Oxitetraciclina, a

Doxiciclina e a Minociclina. Os microrganismos apresentam mecanismos de resistência natural e adquirida, tais como, diminuição do acúmulo intracelular através de bombas de efluxo, síntese de proteínas que protegem o ribossomo permitindo a ligação ao RNA transportador e inativação enzimática. Os genes do grupo *tet* e *otr*, expressam resistência a tetraciclinas e principalmente os do grupo *tet*, se associam a elementos móveis como plasmídios, transposons e integrons, disseminando resistência a diversas espécies bacterianas (PÉREZ-TRALLERO e IGLESIAS, 2003; BALASSIANO *et al.*, 2007; TAVARES, 2009h).

#### 1.6.4 Quinolonas

A estrutura central das verdadeiras quinolonas é composta por um conjunto bicíclico aromático, cujo anel A é constituído por uma piridinona-4, contendo uma função ácida livre ligada ao carbono 3, e o anel B é um anel benzeno. Entretanto, o termo quinolona é usado para grupos de antibióticos análogos ao ácido nalidíxico, que não contém exatamente uma estrutura quinolônica. Atualmente, devido às descobertas de novas quinolonas diferentes entre si por propriedades antimicrobianas e farmacocinéticas, este grupo de antibióticos tem sido classificado por gerações, embora não exista um consenso na classificação, diferindo de autor para autor. As fluoroquinolonas, em sua maioria, agem inibindo a ação das proteínas GyrA (DNA-girase) e ParC (topoisomerase IV) que desempenham a função de ligação do DNA, permitindo que o mesmo ocupe um espaço maior que o contido nos limites bacterianos, provocando a morte celular, e além disso as extremidades livres do DNA induzem a síntese de RNA mensageiro e proteínas de maneira descontrolada, causando a produção de exonucleases e a degradação cromossomal. O representante mais potente contra bacilos gram-negativos é a Ciprofloxacina, uma fluoroquinolona de segunda geração, que teve seu espectro de ação aumentado pela adição de um átomo de flúor ao anel quinolônico. Em bactérias gram-negativas, o mecanismo de resistência contra essas drogas se dá por mutações em genes cromossômicos alvo, que produzem DNA-girase e topoisomerase IV modificadas, que ficam então

impedidas de ligarem-se aos antibióticos. A resistência também pode ocorrer devido a modificações nos canais porínicos da membrana externa bacteriana, diminuindo a entrada do antibiótico para o interior da célula e também por bomba de efluxo que age de maneira contrária retirando a droga do interior da célula bacteriana. Em geral, as mutações que dão origem à resistência as fluoroquinolonas são encontradas predominantemente na QRDR (região que determina resistência a quinolona) situadas em GyrA e ParC (TAVARES, 2001, 2009i; ALEKSHUN e LEVY, 2007).

### 1.6.5 Sulfonamidas e Diaminopirimidinas

As **sulfonamidas** formam a primeira classe de agentes antibacterianos que se mostraram eficazes no tratamento de infecções em humanos. São derivados do enxofre e apresentam estrutura básica derivada da sulfanilamida que ao ser acrescida por diversos radicais, dá origem a vários derivados sulfonamídicos, conhecidos como sulfamidas ou sulfas dos quais são utilizados no Brasil a Sulfadiazina, o Sulfametoxazol e a Sulfadoxina. **Diaminopirimidinas** são antibióticos derivados pirimidínicos com ação antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária, constituídas pela Pirimetamina e a Trimetoprima. As sulfonamidas têm sua ação potencializada quando em associação as diaminopirimidinas, e ambas têm como mecanismo de ação o impedimento da síntese do ácido folínico (tetraidrofolatos), o qual é necessário para que haja a síntese de purinas e pirimidinas, fundamentais para a formação dos ácidos nucleicos. Durante a atividade de impedimento da síntese do ácido folínico, as **sulfas** atuam inibindo a ação das sintetases que transformam o ácido paraaminobenzoico em ácido fólico, enquanto as **diaminopirimidinas** agem inibindo as diidrofólico-redutases, enzimas que reduzem o ácido fólico em folínico. Bactérias podem apresentar diversas formas de resistência a estes antibióticos, como diminuição da permeabilidade, bomba de efluxo e alterações enzimáticas, sendo o mecanismo mais importante em enterobactérias a síntese de uma via metabólica alternativa, com a produção de dois tipos de diidrofólico-redutases (enzima necessária para redução do ácido fólico em folínico), uma das quais não é inativada

pela Trimetoprima. Os genes de resistência as sulfonamidas pertencem ao grupo *sul*, e os que conferem resistência a Trimetoprima pertencem ao grupo *dfr*, ambos podem ser de origem cromossômica ou adquirida através de elementos móveis (PÉREZ-TRALLERO e IGLESIAS, 2003; TAVARES, 2009j).

### 1.6.6 Anfenicóis

O Cloranfenicol foi isolado pela primeira vez de *Streptomyces venezuelae* em 1947 e recebeu o nome de Cloromicetina, se tornando o primeiro antibiótico a conter naturalmente um grupo nitrogenado (NO<sub>2</sub>). Atualmente, devido o conhecimento de sua fórmula química, relativamente simples, é obtido por síntese laboratorial, e desde então recebeu o nome de Cloranfenicol. Atua especificamente inibindo a síntese protéica através da ligação ao centro peptidil transferase, presente na subunidade 50S ribossômica, impedindo o alongamento da cadeia polipeptídica. O mecanismo mais comum de resistência é a inativação enzimática, através da acetilação enzimática do antibiótico, mediada pelas acetiltransferases (CATs). Estas enzimas catalisam a acetilação, levando à formação de metabólitos inativos. Existe a necessidade de uma nomenclatura unificada para os genes de resistência que são atualmente divididos em grupos de acordo com o tipo de acetiltransferase codificadora, grupo A (A1-A16) e B (B1-B5) e um tipo de transportador específico, grupo E (E1-E8). O grupo B5 codificador do gene *catB9*, foi encontrado em genes cromossômicos de *Vibrio cholerae* como parte de um super-integron e o grupo E-3 codificador do gene *floR* e outros, foi identificado no elemento cromossômico SXT (elemento responsável por resistência a múltiplos antibióticos) de *Vibrio cholerae* (SCHWARZ *et al.*, 2004; TAVARES, 2009k).

## 1.7 SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS RELACIONADA À *Vibrio metschnikovii*

FARMER III *et al.* (1988, 2005), realizaram teste de suscetibilidade a antibióticos em 22 cepas de *Vibrio metschnikovii* tendo como resultados as seguintes porcentagens de suscetibilidade: 100% a Cefalotina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg) e Ácido nalidíxico (30 µg), 91% a Colistina (10 µg), 73% a Tetraciclina (30 µg), 32% a Estreptomicina (10 µg), 31% a Ampicilina (10 µg), 27% a Carbenicilina (100 µg), 14% a Canamicina (30 µg), 9% a Penicilina (10 U) e 5% a Sulfadiazina (250 µg).

No caso de bacteremia relatado por HARDARDOTTIR *et al.* (1994), *Vibrio metschnikovii* se mostrou suscetível a Ampicilina, cefalosporinas, fluoroquinolonas e Netilmicina.

Em 1996, DALSGAARD *et al.* relataram, possivelmente, o primeiro surto de *Vibrio metschnikovii*, que se deu em dois hospitais em Arequipa/Peru e acometeu 5 crianças entre 11 a 20 meses. Todos os isolados clínicos mostraram-se resistentes a Ampicilina, Eritromicina e Estreptomicina. Um dos isolados mostrou resistência intermediária a Polimixina B, Sulfametoxazol+Trimetoprima e Ácido nalidíxico. Pela primeira vez um estudo determinou o perfil plasmidial de isolados clínicos de *Vibrio metschnikovii*, revelando um plasmídio grande de 200 kb em todos os isolados e em três deles visualizou-se mais um plasmídio de 2,7 kb.

Em três cepas de *Vibrio metschnikovii* isoladas de pacientes com diarreia em Jacarta na Indonésia, os testes de suscetibilidade *in vitro* realizados mostraram que esta espécie foi suscetível a todos os antibióticos testados, entre eles: Ampicilina, Sulfametoxazol+Trimetoprima, Cloranfenicol, Tetraciclina, Cefalotina, Colistina, Neomicina, Ceftraxone, Ciprofloxacina, Norfloxacina e Ácido nalidíxico (LESMANA *et al.*, 2002).

A pesquisa de suscetibilidade antimicrobiana de vibrios isolados de caranguejo azul (*Callinectes sapidus*), na cidade de Belek, costa turística da Turquia, foi realizada através do teste de Diluição em Caldo e adotou a concentração inibitória

mínima (MIC) como medida da atividade antimicrobiana do patógeno em questão e revelou que *Vibrio metschnikovii* é sensível a Doxiciclina, Tetraciclina e Ciprofloxacina (YALCINKAYA *et al.*, 2003).

Diante do isolamento de uma cepa de *Vibrio metschnikovii* de uma infecção de ferida pós cirúrgica, LINDE *et al.* (2004) realizaram o teste de suscetibilidade a antibióticos no qual a espécie demonstrou ser suscetível a Mezlocilina, Piperacilina, Piperacilina+Sulbactam, carbapenêmicos, cefalosporinas de amplo espectro, Aztreonam, fluoroquinolonas, Trimetoprima, Fosfomicina, Tetraciclina e aminoglicosídeos e resistente a Ampicilina e Sulfametoxazol.

WALLET *et al.* (2005) relataram o primeiro caso de *Vibrio metschnikovii* isolado de aspirado brônquico de paciente com pneumonia e um teste *in vitro* com o AST-N032 Vitek 2 para suscetibilidade mostrou que o organismo foi resistente a Ampicilina, Ticarcilina, Piperacilina e aminoglicosídeos.

Em um caso de septicemia secundária em um neonato de cinco dias de vida, uma cultura de sangue foi realizada e após 48h de incubação houve o crescimento de *Vibrio metschnikovii* que se mostrou sensível aos quatro antibióticos administrados: Cefotaxima, Amicacina, Piperacilina+Tazobactam e Tobramicina (PRASAD e KHARIDEHAL, 2006).

MARTIN *et al.* (2008) relataram um caso no qual *Vibrio metschnikovii* foi isolado de uma úlcera em membro inferior esquerdo e nesta ocasião foram realizados testes de suscetibilidade a antibióticos onde o organismo se mostrou resistente a Amoxicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Gentamicina e Tobramicina, e sensível a Amicacina, Cefoxitina, Amoxicilina+Ácido clavulânico, Imipenem, Ciprofloxacina e Sulfametoxazol+Trimetoprima. O teste para detecção de beta-lactamases de espectro estendido foi positivo. O fato de a cepa isolada ter sido resistente a Cefalotina, Cefotaxime e Gentamicina, é relevante, já que este evento não é comum para esta espécie.

Em 2010, OKOH e IGBINOSA publicaram a continuação do estudo iniciado em 2009 (IGBINOSA *et al.*, 2009) onde realizaram pela primeira vez uma pesquisa do perfil de suscetibilidade a antibióticos em isolados de *Vibrio* originários do

efluente final de uma estação de tratamento de águas residuárias em comunidade rural de uma Província do Cabo Oriental da África do Sul. De um total de 52 isolados, três foram identificados como *Vibrio metschnikovii*. O antibiograma demonstrou que 100% dos isolados identificados como *Vibrio metschnikovii* foram resistentes à Ampicilina, Sulfametoxazol e Cefalotina; e sensíveis a Imipenem, Meropenem e Norfloxacin. O estudo testou a suscetibilidade a 21 tipos diferentes de antibióticos, mas os dados não foram publicados.

Também em 2010, REBOUÇAS *et al.* publicaram estudo onde apresentam a pesquisa do perfil de resistência antimicrobiana em espécies de *Vibrio* isoladas do ambiente de cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) no Ceará, Brasil. Do total de 31 isolados de *Vibrio*, 13 foram isolados a partir das águas provenientes das fazendas incubadoras dos camarões e 18 foram isolados do hepatopâncreas dos camarões (glândula pertencente ao intestino médio com função de metabolizar produtos de reserva energética). Dos 18 isolados, três foram identificados como *Vibrio metschnikovii* (HP71, HP77 e HP120). Os isolados denominados HP71 e HP77 foram resistentes a Ampicilina e Cefoxitina, e apenas o primeiro foi resistente a Tetraciclina e intermediário ao Aztreonam. Ambos apresentaram sensibilidade aos demais antibióticos testados. O isolado denominado HP120 foi sensível aos 11 antibióticos testados, citados a seguir: Ampicilina, Aztreonam, Cefoxitina, Florfenicol, Gentamicina, Imipenem, Ácido nalidíxico, Nitrofurantoína, Oxitetraciclina, Sulfametoxazol+Trimetoprima e Tetraciclina.

## 2 JUSTIFICATIVA

A pesquisa de patógenos emergentes, incluindo *Vibrio metschnikovii*, não faz parte da rotina laboratorial. Contudo, quando a busca por vibrios é realizada, a espécie alvo deste estudo é inicialmente descartada por ser oxidase negativa. Entretanto, embora esta espécie seja isolada esporadicamente de amostras clínicas, a mesma causa severos sintomas comparáveis aos causados por *Vibrio cholerae*, o que sugere seu potencial patogênico (LESMANA *et al.*, 2002; WALLET *et al.*, 2005).



Segundo BLAKE *et al.* (1980) muitos casos de gastroenterites causados por vibrios passam despercebidos pelos laboratórios de bacteriologia porque são utilizados apenas meios de isolamento primário para agentes entéricos, que não diferenciam vibrios, sendo necessário para este gênero o uso de meio seletivo.

Muitos estudos sobre os aspectos patogênicos de *Vibrio* são realizados exclusivamente com cepas clínicas, enquanto poucos são direcionados às cepas ambientais. Desta forma, torna-se necessária a realização de estudos mais detalhados sobre o potencial patogênico de cepas ambientais de *Vibrio* para o melhor entendimento das propriedades patogênicas destas bactérias e a relação que elas estabelecem com doenças em humanos (BAFFONE *et al.*, 2005).

Segundo a Academia Americana de Microbiologia (2009), o uso indiscriminado e o destino inconsciente dado a antimicrobianos é um problema pouco explorado e não atendido por nenhum guia ou legislação vigente. As bactérias podem adquirir resistência em qualquer lugar, especialmente no meio ambiente, esgotos e sedimentos de águas de superfície, e conseqüentemente transferir essa resistência a outras bactérias patogênicas.

Diante deste fato, a pesquisa do perfil de suscetibilidade a antibióticos em cepas ambientais de *Vibrio metschnikovii* tem a intenção de esclarecer e ampliar dados científicos que possam direcionar o tratamento de doentes, em vias de surto ou em casos de bacteremia.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Isolar e identificar *Vibrio metschnikovii* de amostras ambientais e caracterizar o perfil de suscetibilidade a antibióticos.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar e identificar *Vibrio metschnikovii* de amostras ambientais.
2. Identificar genotipicamente, através da PCR, a presença de *Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais.
3. Identificar fenotipicamente o perfil de suscetibilidade a diferentes classes de antibióticos.
3. Pesquisar a existência de genes responsáveis pela expressão da resistência.
4. Discutir a importância dos resultados obtidos para a saúde pública.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Um total de 10 amostras (esgoto, vôngole e peixes marinhos) foi obtido no período de Março a Agosto de 2009.

As amostras de esgoto foram obtidas de duas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) em parceria com a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – Secretaria de Estado do Meio Ambiente/SP) dentro do projeto “Detecção e genotipagem de *Aeromonas*, *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais”, e compreenderam três amostras de esgoto bruto e três de esgoto tratado. As amostras de vôngole e de peixes marinhos, dentre eles, pescada branca, sardinha e tainha, provenientes de Mercado, foram utilizadas no presente estudo com a finalidade de enriquecer os resultados tornando-os mais robustos.

As amostras de vôngole e peixes marinhos foram nomeadas de A1 a A4 e as de esgoto de EB1 a EB3 e ET1 a ET3, como mostra o Quadro 3.

**Quadro 3** - Tipos de amostras, locais de obtenção e data da coleta.

<b>Amostra</b>	<b>Tipo</b>	<b>Data</b>	<b>Local</b>
A1	Sardinha	03/2009	Mercado*
A2	Vôngole	05/2009	
A3	Pescada branca	06/2009	
A4	Tainha	07/2009	
EB1	Esgoto Bruto	06/2009	ETE 1*
ET1	Esgoto Tratado	06/2009	
EB2	Esgoto Bruto	08/2009	
ET2	Esgoto Tratado	08/2009	
EB3	Esgoto Bruto	08/2009	ETE 2*
ET3	Esgoto Tratado	08/2009	

\*A identificação da unidade de coleta foi preservada.

Algumas características dos locais de coleta das amostras de esgoto estão relacionadas abaixo:

- **ETE 1**

Localizada em região metropolitana desde 5 de Junho de 1998, quando teve o início das atividades. Atualmente beneficia 1,4 milhão de habitantes. A vazão atual é de 1,6 mil litros por segundo. Utiliza como processo de tratamento o lodo ativado convencional, filtração e desinfecção (dados fornecidos por comunicação pessoal da assessoria da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - Sabesp), sendo 90% o grau de eficiência de remoção de carga orgânica. Os esgotos são transportados até a estação através de um sistema de esgotamento sanitário que compreende aproximadamente 161 km de extensão.

- **ETE 2**

Localizada em município com aproximadamente 252 mil habitantes, atende o tratamento de esgoto de nove municípios vizinhos, apresentando vazão atual de sete mil litros por segundo, beneficiando um total de 4,4 milhões de habitantes. O processo de tratamento adotado é apenas o de lodo ativado convencional (dados fornecidos por comunicação pessoal da assessoria da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - Sabesp) e o grau de eficiência de remoção de carga orgânica é de 90%. O sistema de esgotamento sanitário é formado por 73 km de extensão.

## 4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

### 4.2.1 Amostras de vôngole e peixes marinhos

As amostras, que incluíram três peixes marinhos (pescada branca, sardinha e tainha) e uma de vôngole, foram processadas em ambiente estéril de fluxo laminar. A amostra na íntegra - filé dos peixes e vôngole descascado - foi colocada em copo de liquidificador estéril para que fosse triturada; facas, garfos e tesouras estéreis foram usados para auxiliar no manuseio da amostra. Já triturada, 25 g da amostra, devidamente pesada, foi adicionada em frasco contendo 225 mL APA 1% (água peptonada alcalina com 1% de NaCl, pH = 8,6) - meio de enriquecimento - sendo este incubado a 35 °C por 18 a 24 horas.

### 4.2.2 Amostras de esgoto bruto e tratado

As amostras de esgoto foram coletadas pela CETESB e fornecidas em frascos plásticos estéreis de 1 L, devidamente identificados com etiquetas contendo o local e

data da coleta. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Prática de Saúde Pública onde foram processadas no prazo máximo de 24 h após terem sido coletadas.

A amostra de esgoto bruto foi homogeneizada manualmente e adicionada em tubo de fundo cônico (tipo Falcon) que foi posteriormente pesado em balança eletrônica de precisão, com o objetivo de obter o peso de 25 g de solução desconsiderado o peso do tubo. A amostra pesada foi adicionada em frasco contendo 225 mL de APA 1% (meio de enriquecimento) e incubada a 35 °C por 18 a 24 horas.

A amostra de esgoto tratado foi filtrada pelo método de filtração a vácuo. O volume filtrado foi de 500 mL, através de uma membrana filtrante de celulose (Millipore® 0,45 micra de porosidade, 47 mm, lisa). Para o volume filtrado foram utilizadas em média duas membranas, sendo que as mesmas foram adicionadas em frasco contendo 250 mL de APA 1% e então incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas.

#### 4.3 ISOLAMENTO DE COLÔNIAS

Após 18 a 24 horas de incubação a 35 °C, o frasco de APA 1% foi retirado cuidadosamente, evitando agitar, e uma alíquota da película formada na superfície foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo para *Vibrio*, ágar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose). Para cada frasco contendo a amostra enriquecida foram semeadas 10 placas seguindo o método de esgotamento. As placas foram incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas.

Diante do crescimento de colônias típicas (amarelas de 2-3 mm de diâmetro), cerca de duas a cinco colônias, por placa, foram selecionadas para inoculação em meio de triagem - ágar ferro Kligler - com a ajuda de uma agulha de platina e novamente incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas.

A leitura da prova de Kligler foi feita entre 18 e 24 horas após a realização do procedimento acima. Foram observadas fermentação de glicose e lactose, produção de H<sub>2</sub>S (sulfureto de hidrogênio) e gás. Os tubos onde foi observada a produção de gás e/ou H<sub>2</sub>S foram descartados, já que estas não eram características diferenciais

para a identificação da espécie. Em todos os outros foi realizado o teste de oxidase e as amostras que revelaram resultado negativo seguiram para identificação molecular.

#### 4.4 MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO

##### 4.4.1 Extração do DNA Genômico

Para extração do DNA genômico dos isolados de *Vibrio metschnikovii* foi realizado o método de extração por choque térmico descrito por CHAPMAN *et al.* (2001).

Os isolados triados em ágar ferro Kligler, negativos para o teste de oxidase, foram semeados em caldo lúria 1% de NaCl (5 mL) e incubados a 35 °C por 18 a 24 horas.

O conteúdo de 5 mL de cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 24 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com 1 mL de água MilliQ<sup>®</sup> estéril. O material homogeneizado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL que foi submetido à nova centrifugação a 12.000 rpm a 24 °C por 5 minutos. Já descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuscitado com 200 µL de água MilliQ<sup>®</sup> estéril. Os microtubos foram então vedados e colocados em um suporte para fervura a 95 °C por 10 minutos. Imediatamente após a fervura, os tubos foram incubados a 20°C negativos, por 30 minutos, para o rompimento das células bacterianas e liberação do DNA. Em seguida permaneceram em temperatura ambiente (24 °C) para que o conteúdo voltasse à fase líquida e fosse novamente centrifugado a 12.000 rpm a 24 °C por 10 minutos. Um volume de 200 µL foi retirado do sobrenadante e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL posteriormente armazenado a 20 °C negativos, até a realização da PCR.

#### 4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para confirmação genotípica dos isolados de *Vibrio metschnikovii* foi realizada uma Multiplex-PCR para identificação de duas regiões situadas no gene 16S rDNA produzindo dois fragmentos de tamanhos diferentes. No preparo da reação foram adicionados 25 ng de DNA total de *Vibrio metschnikovii* e em seguida 20 µL da mistura preparada com os seguintes reagentes (volume por número de amostras): tampão 10x; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de dNTP; 300 µM de cada um dos iniciadores; 1,25 U de Taq-DNA-polimerase e água MilliQ<sup>®</sup> suficiente para completar o volume de 25 µL. Os iniciadores que foram utilizados estão listados no Quadro 4.

**Quadro 4** - Iniciadores utilizados para confirmação da espécie *Vibrio metschnikovii*

Iniciador	Sequência (5'- 3')	Localização	Produto (pb)
134-VMT16S-F	GTTTATAATGAACAGGGACCAAAG	214 – 233	306
135-VMT16S-	AAAGAATACCGCTATTAACGATAC	536 – 517	
144-VMTA-F	AGTTGCATTTGAAACTGGCAG	685 – 705	388
145-VMTA-R	GTCTCCGCAGGATCCTGTAGA	1077 - 1057	

Fonte: MATTÉ, MH (dados não publicados)

Para a realização da reação foi utilizado um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf<sup>®</sup>), e a mesma seguiu o seguinte curso: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 48 °C por 1 minuto, e extensão a 72 °C por 2 minutos. Após a finalização dos ciclos houve um ciclo de extensão a 72 °C por 5 minutos, sendo a seguir resfriado a 4 °C e mantido nesta temperatura até o momento de sua retirada. Como controle negativo foi utilizado o isolado FSP 382/08 (*Aeromonas hydrophila*) presente na coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública.

#### 4.4.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Para visualização dos produtos originados da reação da Multiplex-PCR, um gel de agarose (Amersham Biosciences) a 1,8%, preparado com o tampão tris-acetato-EDTA (TAE 1x) e corado com brometo de etídio (1 µg/mL) foi submetido a eletroforese com a intensidade de corrente elétrica de 6 V/cm, por 1 hora. Em cada poço do gel foram adicionados 5 µL das amostras previamente coradas com tampão carregador de amostra (glicerina e azul de bromofenol) em proporção 1:5 (corante:amostra), e foi utilizado 2 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (MassRuler™ DNA Ladder, Fermentas). O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm, por meio de um transiluminador e as imagens foram capturadas pelo sistema Epi Chemi II Darkroom (UVP) e Software Labworks.

A identificação da espécie se deu pela visualização de uma banda de 388 pb ou de duas bandas simultâneas, uma de 388 pb e outra de 306 pb (Quadro 4).

### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE RESISTÊNCIA

#### 4.5.1 Antibiograma

Para identificação fenotípica de resistência foi realizado antibiograma pelo método de Disco-Difusão de acordo com CLSI M45-A (2006) para espécies de *Vibrio* outras que não *Vibrio cholerae*, e para a interpretação dos resultados referentes aos antibióticos que não constavam no mesmo, foi utilizado o CLSI para *Enterobacteriaceae* (2010). Foram utilizadas placas de ágar Müller-Hinton de 140x15 mm e 15 antibióticos descritos a seguir: Amoxicilina+Ácido clavulânico (20/10 µg), Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Cefepime (30 µg), Ertapenem (10 µg), Imipenem (10 µg), Estreptomicina (10 µg), Gentamicina (10 µg), Doxiciclina (30 µg), Tetraciclina (30 µg),



Ciprofloxacina (05 µg), Sulfametoxazol+Trimetoprima (1,25/23,75 µg), Cloranfenicol (30 µg).

Para a preparação do inóculo, o isolado, previamente identificado como *Vibrio metschnikovii* que permanecia armazenado a – 70 °C em microtubo contendo glicerol 70%, foi semeado em caldo lúria 1% NaCl e em seguida incubado a 35 °C por 18 a 24 horas. Deste ponto, a cultura foi semeada em placas de Petri contendo ágar lúria 1% NaCl que foram incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas. Foi então selecionada uma colônia isolada que foi inoculada em solução salina (2 mL) seguindo o padrão de turvação de 0,5 da escala de McFarland, disponível no Laboratório de Prática de Saúde Pública. Preparado o inóculo, este foi transferido para a placa de ágar Müeller-Hinton com a ajuda de um swab estéril embebido da solução, e em seguida, foram colocados os discos de antibióticos. As placas foram incubadas a 35 °C por 16 a 18 horas período máximo para realização da leitura, segundo padrões do CLSI M45-A 2006.

Para leitura e interpretação foi utilizada uma régua milimetrada. Os halos de inibição foram medidos a partir do disco de antibiótico e o resultado classificou o microrganismo em sensível, intermediário e resistente de acordo com os valores estabelecidos para cada antibiótico, como descrito no Quadro 5.

Assim que a leitura foi concluída, o processo de inoculação foi refeito, sendo o inóculo obtido a partir do crescimento mais próximo ao disco de antibiótico contido na placa de Müeller-Hinton recentemente lida. O processo foi repetido por duas vezes tendo ao total três leituras. Ao final das leituras foram observadas possíveis diminuições nos halos de inibição e de acordo com o resultado obtido seriam feitos os testes fenotípicos para produção de ESBL, MBL e AmpC enzimático.

**Quadro 5** - Lista de antibióticos e as respectivas medidas dos halos de inibição.

Antibióticos	Zonas de inibição em mm		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Amoxicilina+Ác. Clavulânico (AMC)	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Ampicilina (AMP)	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Cefalotina (CFL)	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefoxitina (CFO)	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Ceftazidima (CAZ)	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefepime (CPM)	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Ertapenem (ERT)	≤ 15	16 - 18	≥ 19
Imipenem (IMP)	≤ 13	14 - 15	≥ 16
Estreptomicina (EST)	≤ 11	12 - 14	≥ 15
Gentamicina (GEN)	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Doxiciclina (DOX)	≤ 10	11 - 13	≥ 14
Tetraciclina (TET)	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Sulfametoxazol+Trimetoprima (SUT)	≤ 10	11 - 15	≥ 16
Cloranfenicol (CLO)	≤ 12	13 - 17	≥ 18

Fonte: CLSI M45-A (2006) e CLSI (2010).

#### 4.5.2 Identificação Fenotípica de Produção de ESBL

A observação da produção de ESBL foi feita através do método de aproximação de disco-duplo descrito por BRADFORD, 2001. Os antibióticos

combinados foram Ceftazidima (CAZ) (30 µg), Cefotaxima (CTX) (30 µg), Cefepime (CPM) (30 µg) e Aztreonam ATM (30 µg), e ao centro um disco de Amoxicilina+Ácido clavulânico (AMC) (20/10 µg). Todos os discos foram dispostos em uma placa de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton. O teste foi considerado positivo apenas quando ocorreu um aumento na zona de inibição de qualquer um dos antibióticos utilizados sozinhos.

#### 4.5.3 Identificação Fenotípica de Produção de MBL

Para identificação da produção de MBL foi utilizada a técnica de combinação de discos, onde foram combinados discos de Imipenem (IMP) (10 µg), Meropenem (MER) (10 µg) e Ertapenem (ERT) (10 µg) e os mesmos antibióticos contendo inibidor - EDTA 0,5 M (930 µg ou 5 µL) (PITOUT *et al.*, 2005). Os discos foram dispostos em placa de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton, mantendo uma distância de 20 a 30 mm entre os discos de IMP, MER e ERT que não continham EDTA dos que continham o inibidor. Se foi observado um aumento maior ou igual a 7 mm na zona de inibição dos discos associados ao inibidor EDTA 0,5 M o teste foi considerado positivo para a produção de metalo-beta-lactamase (PITOUT *et al.*, 2005).

#### 4.5.4 Identificação Fenotípica de Produção de AmpC

Para detecção de produção de AmpC foi empregada a metodologia de combinação de discos, onde discos de Cefoxitina (CFO) (30 µg) e Cefotetan (CTT) (30 µg) foram dispostos em placa de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton a uma distância de 20 a 30 mm dos mesmos discos contendo 20 µL de ácido fenilborônico (BA) (120 mg de ácido fenilborônico em 3 mL de dimetil-sufóxido e 3 mL de água destilada estéril). Se um aumento maior ou igual a 5 mm na zona de inibição de um

dos antibióticos associado ao inibidor (BA) for notado o teste foi considerado positivo (COUDRON *et al.*, 2000).

#### 4.5.5 Detecção de Genes de Resistência a Antibióticos

A pesquisa de genes de resistência foi realizada nas cepas que apresentaram testes fenotípicos sugestivos. A partir do DNA genômico extraído pelo método de choque térmico, submetido a PCR, foram pesquisados os genes de resistência, utilizando os respectivos iniciadores listados no Quadro 6. As reações foram realizadas em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf<sup>®</sup>), e para cada microtubo um volume final de 25 µL foi esperado, contendo os seguintes reagentes: 5 µL de DNA (50 µg/µL); 2,5 µL de tampão 10x (Promega) 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µL de solução dNTP 25 mM; 0,4 µM de cada iniciador, 1,25 U de polimerase termoestável (GoTaq<sup>®</sup> Promega) e água MilliQ<sup>®</sup> suficiente para completar o volume de 25 µL.

**Quadro 6** - Lista de iniciadores (5' – 3') utilizados para a pesquisa de genes de resistência em *Vibrio metschnikovii*.

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Alvo	Anelamento (°C)	Produto (pb)	Referência
IMP F IMP R	GGAATAGRRTGGCTTAAAYT GGTTTAAAYAAARCAMCCACC	Grupo <i>bla</i> <sub>IMP</sub>	55	232	a
VIM F VIM R	GTTTGGTTCGCATATCGCAAC GAGCAAKTCYAGACCGCCC	Grupo <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	55	590	a
SPM-1 F SPM-1 R	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	Gene <i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	55	648	g
TEM F TEM R	TCGGGGAAATGTGCGCG TGCTTAATCAGTGAGGCACC	Grupo <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	52	972	f
SHV F SHV R	TTATCTCCCTGTTAGGCACC GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	Grupo <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	52	795	b
CTX-M F CTX-M R	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	Grupo <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	52	543	b
MOX F MOX R	AGCACAGGATCCCGGGCA CATGACGAYGCCGATCC	Grupo <i>bla</i> <sub>MOX</sub> / <i>bla</i> <sub>CMY</sub> / <i>bla</i> <sub>CepH</sub> e <i>bla</i> <sub>cepS</sub>	55	947	c
CMY F CMY R	ATGATGAAAAAATCGTTATGC GCTTTTCAAGAATGCGCCA	Outros <i>bla</i> <sub>CMY</sub> e Grupo <i>bla</i> <sub>LAT-1</sub>	55	1149	c
MIR F MIR R	TAAGCTGTGCCCTGCTGC CCGCCTCAACGCGTGC	Grupo <i>bla</i> <sub>MIR</sub>	55	1106	c
EBC F EBC R	TTTGCTGCGCCCTGCTGC CCGCCTCAACGCGTGC	Grupo <i>bla</i> <sub>EBC</sub> e <i>bla</i> <sub>ACT</sub>	55	1106	c
DHA F DHA R	ATGGCGGTTGCCGTCTCC CCAGCGGTGCCAGGATCC	Grupo <i>bla</i> <sub>DHA</sub>	55	568	c
ACC F ACC R	ATGCGTAAAAAATGCAGA ATGCCATGCTGGCACAGG	Grupo <i>bla</i> <sub>ACC</sub>	55	1270	c
FOX F FOX R	GCTGGGTAGCCTGCTG TCACTCGGCCAACTGACTC	Grupo <i>bla</i> <sub>FOX</sub>	55	1119	c
AAD-A F AAD-A R	GTGGATGGCGCCTGAAGCC ATTGCCAGTCGGCAGCG	Gene <i>aadA</i>	62	526	d
AAD-B F AAD-B R	TCCAGAACCTTGACCGAAC GCAAGACCTCAACCTTTTCC	Gene <i>aadB</i>	54	699	d
AAD-A-1 F AAD-A-1 R	CGC CGA AGT ATC GAC TCA AC GAC TAC CTT GGT GAT CTC GC	Gene <i>aadA-1</i>	52	766	e
AAC(6) F AAC(6) R	ATG ACT GGC TAA ATC CCC GCC TTC TCG TAG CA	Gene <i>aac(6)</i>	52	482	e

<sup>a</sup>BALSALOBRE, 2009; <sup>b</sup>CAO *et al.*, 2002; <sup>c</sup>MOURA, 2010; <sup>d</sup>POPPE *et al.*, 2006; <sup>e</sup>RIBEIRO *et al.*, 2007; <sup>f</sup>ROJAS *et al.*, 2010; <sup>g</sup>ZAVASCK *et al.*, 2005.

A reação da PCR empregada para amplificação dos genes de resistência teve uma desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos, com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento (de acordo com Quadro 6) por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C, sendo mantida a temperatura de 4 °C até a retirada das amostras.

Os controles positivos utilizados para a pesquisa dos genes de resistência pertencem à coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública/FSP-USP: cepa FCF/USP Kp-IMP para o gene *bla*<sub>IMP</sub>; cepa FCF/USP Ecl 75-10433 VIM-1 para o gene *bla*<sub>VIM</sub>; cepa FCF/USP PA 4811997 SPM-1 para o gene *bla*<sub>SPM1</sub>; cepa FSP 179/08 para o gene *bla*<sub>TEM</sub>; cepa FCF/USP KP-SHV-18 para o gene *bla*<sub>SHV</sub>; e cepa FCF/USP Ec-CTX-M para o gene *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Já para a pesquisa dos genes de resistência *bla*<sub>MOX</sub> e *bla*<sub>CMY</sub>, foi utilizado como controle o isolado FSP 135/08; para os genes *bla*<sub>CMY</sub> (outros) e *bla*<sub>LAT-1</sub> o controle FSP 11/10; para o gene *bla*<sub>MIR</sub>, o controle FSP 15/10; para os genes *bla*<sub>EBC</sub> e *bla*<sub>ACT</sub> foi utilizado o controle FSP 15/10; para o gene *bla*<sub>DHA</sub>, o controle FSP 08/10; para o gene *bla*<sub>ACC</sub>, o controle FSP 10/10; e para o gene *bla*<sub>FOX</sub>, o controle FSP 09/10. Todos os controles citados acima foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Nilton Lincopan, docente e pesquisador do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1,8% preparado com o tampão tris-acetato-EDTA (TAE 1x) e corado com brometo de etídio (1 µg/mL) que foi submetido a eletroforese com a intensidade de corrente elétrica de 6 V/cm, por 40 minutos a 1 hora.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO COLONIAL DE *Vibrio metschnikovii* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

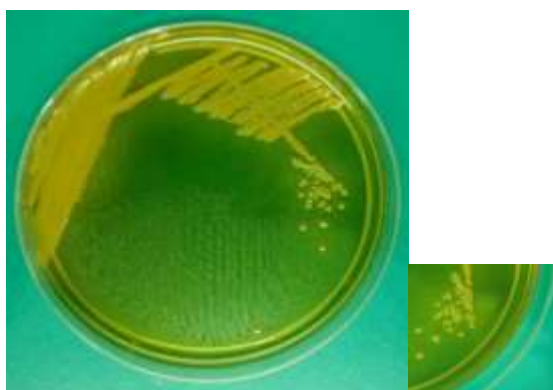
Foram realizados testes de reisolamento a partir de culturas puras de *Vibrio metschnikovii* em alguns meios de cultura empregados na rotina laboratorial para

isolamento de microrganismos presentes em amostras de origem ambiental, alimentar e clínica. Os meios de cultura utilizados foram: Ágar MacConkey, Ágar Salmonella-Shigella (SS), Ágar Sulfito de Bismuto (BS) e Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). As amostras foram incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas. Os resultados foram comparados a ilustrações de isolados de *Salmonella* spp e *Escherichia coli*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ISOLAMENTO DE *Vibrio metschnikovii* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Para cada amostra enriquecida em APA 1% foram semeadas 10 placas de meio seletivo para o gênero *Vibrio* (TCBS), nas quais foi observada a formação de colônias típicas, assim caracterizadas por serem amarelas com 2-3 mm de diâmetro, regulares, lisas, com centro opaco e bordas brilhantes, como mostra a Figura 1. Essas colônias foram triadas em ágar ferro Kligler, onde pôde ser observado que 123 (77,3%) apresentaram reação negativa para a produção de enzima citocromo oxidase, sendo que dessas, 123 (100,0%) eram fermentadoras de glicose, 80 (65,0%) utilizaram a lactose produzindo ácido e 26 (21,1%) apresentaram pouca produção de gás e nenhum dos isolados apresentou formação de H<sub>2</sub>S.



**Figura 1** - Colônias características de *Vibrio metschnikovii* isoladas em Ágar TCBS.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO PELA PCR

Dos 123 isolados com características típicas para *Vibrio metschnikovii* (citadas acima), 70 foram confirmados através da PCR com a utilização de iniciadores específicos para a identificação da espécie pesquisada (Figura 2), sendo que destes, 16 apresentaram pouca produção de gás. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a triagem e confirmação de colônias típicas sugestivas a serem *Vibrio metschnikovii* provenientes de diferentes amostras.

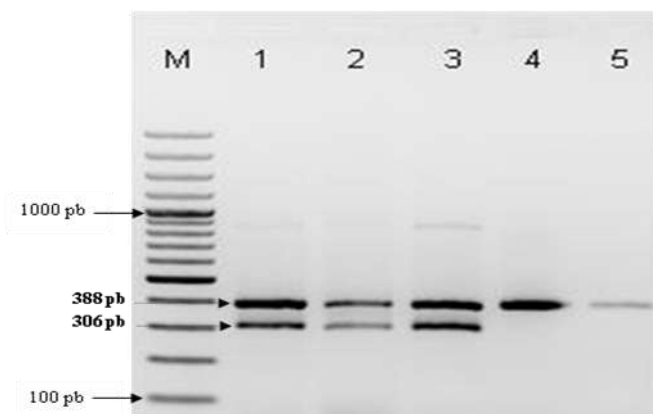
**Tabela 1** - Número de colônias típicas por amostra, resultado do teste de oxidase e produção de gás e número de isolados positivos para *Vibrio metschnikovii*, São Paulo, 2010.

Amostra	Colônias típicas sugestivas *	Isolados oxidase +	Isolados oxidase -	Isolados gás + **	Isolados confirmados pela PCR como <i>Vibrio metschnikovii</i>
A1	4	2	2	0	2
A2	18	7	11	0	5
A3	28	5	23	4	22
A4	19	3	16	1	14
EB1	10	-	10	10	10
ET1	5	5	-	-	-
EB2	11	1	10	1	1
ET2	10	6	4	-	-
EB3	22	6	16	0	12
ET3	32	1	31	0	4
<b>TOTAL</b>	<b>159</b>	<b>36</b>	<b>123</b>	<b>16</b>	<b>70</b>

\* Característica colonial em meio seletivo Ágar TCBS, a 35 °C de 18 a 24 horas.

\*\* Pouca produção de gás.





**Figura 2** - Perfil de eletroforese para identificação de *Vibrio metschnikovii* (bandas de 306 pb e 388 pb) **M**: marcador molecular 100 pb; **1 a 5**: fragmentos obtidos da reação de PCR de diferentes isolados provenientes de amostras ambientais confirmando a identificação. **1** - FSP 1091/09 (EB1); **2** - FSP 1005/09 (A3); **3** - FSP 23/10 (A4); **4** - FSP 1393/09 (EB3); **5** - FSP 1253/09 (ET3).

### 5.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Do total de 70 isolados, 66 (94,3%) apresentaram perfil de suscetibilidade intermediário ou resistente a pelo menos um dos seguintes antibióticos: Ampicilina (AMP), Gentamicina (GEN) e Estreptomicina (EST) como mostra a Tabela 2. Para os demais antibióticos testados, todos os isolados apresentaram-se sensíveis (Quadro 8)

**Tabela 2** - Número e porcentagem de isolados segundo a suscetibilidade aos antibióticos AMP, GEN e EST, São Paulo, 2010.

Suscetibilidade	ANTIBIÓTICOS		
	AMP	GEN	EST
Sensível	41 (58,6%)	56 (80,0%)	9 (12,9%)
Intermediário	8 (11,4%)	6 (8,6%)	30 (42,8%)
Resistente	21 (30,0%)	8 (11,4%)	31 (44,3%)
<b>Total</b>	<b>70 (100,0%)</b>	<b>70 (100,0%)</b>	<b>70 (100,0%)</b>

Os resultados decorrentes do antibiograma revelaram que 100% dos isolados mostraram-se sensíveis as cefalosporinas de 1<sup>a</sup> (CFL), 2<sup>a</sup> (CFO), 3<sup>a</sup> (CAZ) e 4<sup>a</sup> (CPM) gerações, a Amoxicilina+Ácido clavulânico (AMC), aos carbapenêmicos (ERT, IMP), as tetraciclinas (DOX, TET), a fluoroquinolona (CIP), ao Sulfametoxazol+Trimetoprima (SUT) e ao Cloranfenicol (CLO).

Do total de 21 isolados resistentes a AMP, 9 (42,9%) pertenciam às amostras de pescada branca e tainha e 12 (57,1%) às de esgoto; em relação aos intermediários, 3 (37,5%) pertenciam às amostras de pescada branca e 5 (62,5%) às amostras de esgoto. Do total de 8 isolados resistentes a GEN, 7 (87,5%) eram de vôngole e tainha e apenas 1 (12,5%) de esgoto, já em relação ao total de 6 intermediários, 4 (66,7%) compreendiam amostras de vôngole, pescada branca e tainha e 2 (33,3%) amostras de esgoto. Em relação aos 31 isolados resistentes a EST, 23 (74,2%) pertenciam às amostras de vôngole, pescada branca e tainha e 16 (53,3%) isolados intermediários pertenciam às mesmas amostras. Um total de 8 (25,8%) isolados resistentes a EST foram provenientes das amostras de esgoto, bem como 14 (46,7%) isolados intermediários (Quadro 7).

**Quadro 7** - Perfil de suscetibilidade a AMP, GEN e EST por amostra.

Amostras / Nº isolados	AMP			GEN			EST		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
A1 / 2	0	0	2	0	0	2	0	0	2
A2 / 5	0	0	5	3	1	1	2	1	2
A3 / 22	6	3	13	0	1	21	12	10	0
A4 / 14	3	0	11	4	2	8	9	5	0
EB1 / 10	7	0	3	1	1	8	7	3	0
EB2 / 1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
EB3 / 12	5	4	3	0	1	11	1	7	4
ET3 / 4	0	0	4	0	0	4	0	3	1

**Quadro 8 - Resultados do Antibiograma dos 70 isolados de *Vibrio metschnikovii* provenientes de amostras ambientais.**

Numeração	Medidas dos halos de inibição (mm)														
	AMC	AMP	CFL	CFO	CAZ	CPM	ERT	IMP	EST	GEN	DOX	TET	CIP	SUT	CLO
FSP 847/09	(24)S	(34)S	(36)S	(22)S	(26)S	(22)S	(42)S	(40)S	(16)S	<b>(12)R</b>	(22)S	(30)S	(42)S	(26)S	(38)S
FSP 848/09	(26)S	(38)S	(36)S	(22)S	(30)S	(26)S	(42)S	(42)S	<b>(12)I</b>	<b>(12)R</b>	(24)S	(34)S	(42)S	(30)S	(24)S
FSP 1093/09	(24)S	(26)S	(30)S	(22)S	(20)S	(20)S	(30)S	(40)S	(16)S	<b>(14)I</b>	(22)S	(20)S	(36)S	(30)S	(36)S
FSP 852/09	(28)S	(38)S	(38)S	(26)S	(36)S	(24)S	(42)S	(42)S	<b>(10)R</b>	(26)S	(26)S	(34)S	(42)S	(36)S	(40)S
FSP 853/09	(18)S	(40)S	(38)S	(26)S	(36)S	(24)S	(42)S	(42)S	<b>(10)R</b>	<b>(12)R</b>	(22)S	(34)S	(42)S	(38)S	(42)S
FSP 1089/09	(28)S	<b>(12)R</b>	(26)S	(22)S	(22)S	(22)S	(30)S	(32)S	<b>(10)R</b>	(16)S	(28)S	(20)S	(26)S	(26)S	(40)S
FSP 1090/09	(20)S	<b>(0)R</b>	(20)S	(18)S	(20)S	(18)S	(32)S	(32)S	<b>(10)R</b>	<b>(10)R</b>	(24)S	(18)S	(24)S	(26)S	(18)S
FSP 1091/09	(24)S	<b>(0)R</b>	(24)S	(20)S	(26)S	(20)S	(32)S	(30)S	<b>(10)R</b>	(18)S	(24)S	(20)S	(24)S	(22)S	(24)S
FSP 1094/09	(24)S	<b>(0)R</b>	(24)S	(24)S	(20)S	(22)S	(26)S	(30)S	<b>(10)R</b>	(16)S	(24)S	(20)S	(26)S	(24)S	(26)S
FSP 1092/09	(24)S	<b>(8)R</b>	(26)S	(24)S	(22)S	(22)S	(34)S	(34)S	<b>(14)I</b>	(18)S	(24)S	(26)S	(28)S	(24)S	(28)S
FSP 938/09	(24)S	(28)S	(26)S	(20)S	(20)S	(20)S	(30)S	(34)S	<b>(10)R</b>	(16)S	(28)S	(24)S	(26)S	(26)S	(26)S
FSP 939/09	(28)S	<b>(0)R</b>	(24)S	(20)S	(26)S	(22)S	(30)S	(34)S	<b>(10)R</b>	(22)S	(28)S	(22)S	(28)S	(24)S	(24)S
FSP 940/09	(26)S	(22)S	(26)S	(22)S	(22)S	(24)S	(32)S	(34)S	<b>(12)I</b>	(16)S	(22)S	(20)S	(28)S	(24)S	(26)S
FSP 1095/09	(24)S	<b>(0)R</b>	(26)S	(20)S	(22)S	(22)S	(34)S	(34)S	<b>(12)I</b>	<b>(14)I</b>	(24)S	(22)S	(32)S	(28)S	(26)S
FSP 942/09	(32)S	(26)S	(24)S	(18)S	(22)S	(24)S	(30)S	(32)S	<b>(8)R</b>	(20)S	(30)S	(24)S	(22)S	(26)S	(22)S
FSP 1005/09	(28)S	(22)S	(30)S	(20)S	(26)S	(24)S	(38)S	(36)S	<b>(10)R</b>	(18)S	(26)S	(28)S	(30)S	(30)S	(32)S
FSP 1299/09	(28)S	(18)S	(22)S	(18)S	(20)S	(22)S	(40)S	(26)S	<b>(14)I</b>	(16)S	(24)S	(20)S	(38)S	(20)S	(20)S
FSP 1282/09	(26)S	<b>(16)I</b>	(24)S	(18)S	(18)S	(20)S	(26)S	(20)S	<b>(14)I</b>	(16)S	(22)S	(20)S	(22)S	(20)S	(24)S
FSP 1008/09	(26)S	(22)S	(32)S	(22)S	(26)S	(26)S	(34)S	(32)S	<b>(10)R</b>	(16)S	(24)S	(24)S	(32)S	(28)S	(30)S
FSP 1283/09	(30)S	<b>(16)I</b>	(22)S	(20)S	(24)S	(22)S	(26)S	(28)S	<b>(14)I</b>	(20)S	(28)S	(22)S	(22)S	(18)S	(24)S
FSP 1010/09	(28)S	(18)S	(28)S	(20)S	(18)S	(20)S	(34)S	(30)S	<b>(12)I</b>	(18)S	(24)S	(28)S	(34)S	(28)S	(28)S
FSP 1011/09	(28)S	(28)S	(30)S	(24)S	(38)S	(30)S	(38)S	(36)S	<b>(10)R</b>	(24)S	(24)S	(28)S	(32)S	(40)S	(42)S
FSP 1012/09	(26)S	(26)S	(26)S	(22)S	(22)S	(24)S	(34)S	(30)S	<b>(12)I</b>	(18)S	(24)S	(26)S	(30)S	(30)S	(28)S
FSP 1013/09	(22)S	(18)S	(22)S	(20)S	(20)S	(22)S	(30)S	(28)S	<b>(10)R</b>	(18)S	(26)S	(26)S	(26)S	(28)S	(26)S
FSP 1279/09	(18)S	<b>(0)R</b>	(32)S	(28)S	(26)S	(26)S	(40)S	(34)S	<b>(14)I</b>	(22)S	(24)S	(34)S	(42)S	(32)S	(30)S
FSP 1280/09	(28)S	<b>(0)R</b>	(24)S	(24)S	(24)S	(28)S	(34)S	(28)S	<b>(10)R</b>	(20)S	(24)S	(32)S	(28)S	(26)S	(30)S
FSP 1284/09	(36)S	<b>(16)I</b>	(22)S	(18)S	(28)S	(20)S	(38)S	(26)S	<b>(12)I</b>	(16)S	(28)S	(20)S	(20)S	(16)S	(20)S
FSP 1017/09	(18)S	(26)S	(26)S	(22)S	(24)S	(24)S	(38)S	(34)S	<b>(8)R</b>	(16)S	(24)S	(26)S	(32)S	(24)S	(28)S
FSP 1285/09	(20)S	<b>(0)R</b>	(28)S	(20)S	(24)S	(28)S	(30)S	(30)S	<b>(10)R</b>	(18)S	(24)S	(26)S	(22)S	(18)S	(28)S
FSP 1019/09	(30)S	(32)S	(26)S	(24)S	(28)S	(28)S	(42)S	(34)S	<b>(10)R</b>	(16)S	(30)S	(28)S	(36)S	(28)S	(38)S
FSP 1020/09	(34)S	(34)S	(30)S	(26)S	(26)S	(32)S	(38)S	(40)S	<b>(8)R</b>	(18)S	(28)S	(38)S	(36)S	(32)S	(36)S
FSP 1281/09	(30)S	<b>(0)R</b>	(26)S	(24)S	(24)S	(26)S	(36)S	(32)S	<b>(12)I</b>	<b>(14)I</b>	(26)S	(30)S	(30)S	(18)S	(32)S
FSP 19/10	(28)S	(28)S	(28)S	(26)S	(26)S	(24)S	(38)S	(34)S	<b>(10)R</b>	<b>(10)R</b>	(28)S	(26)S	(38)S	(30)S	(32)S
FSP 20/10	(30)S	(30)S	(30)S	(24)S	(28)S	(28)S	(38)S	(34)S	<b>(12)I</b>	<b>(14)I</b>	(28)S	(28)S	(40)S	(32)S	(34)S
FSP 16/10	(30)S	<b>(0)R</b>	(26)S	(22)S	(18)S	(20)S	(32)S	(34)S	<b>(14)I</b>	(16)S	(32)S	(22)S	(26)S	(24)S	(26)S

**Quadro 8 - Resultado do Antibiograma dos 70 isolados de *Vibrio metschnikovii* provenientes de amostras ambientais (continuação)**

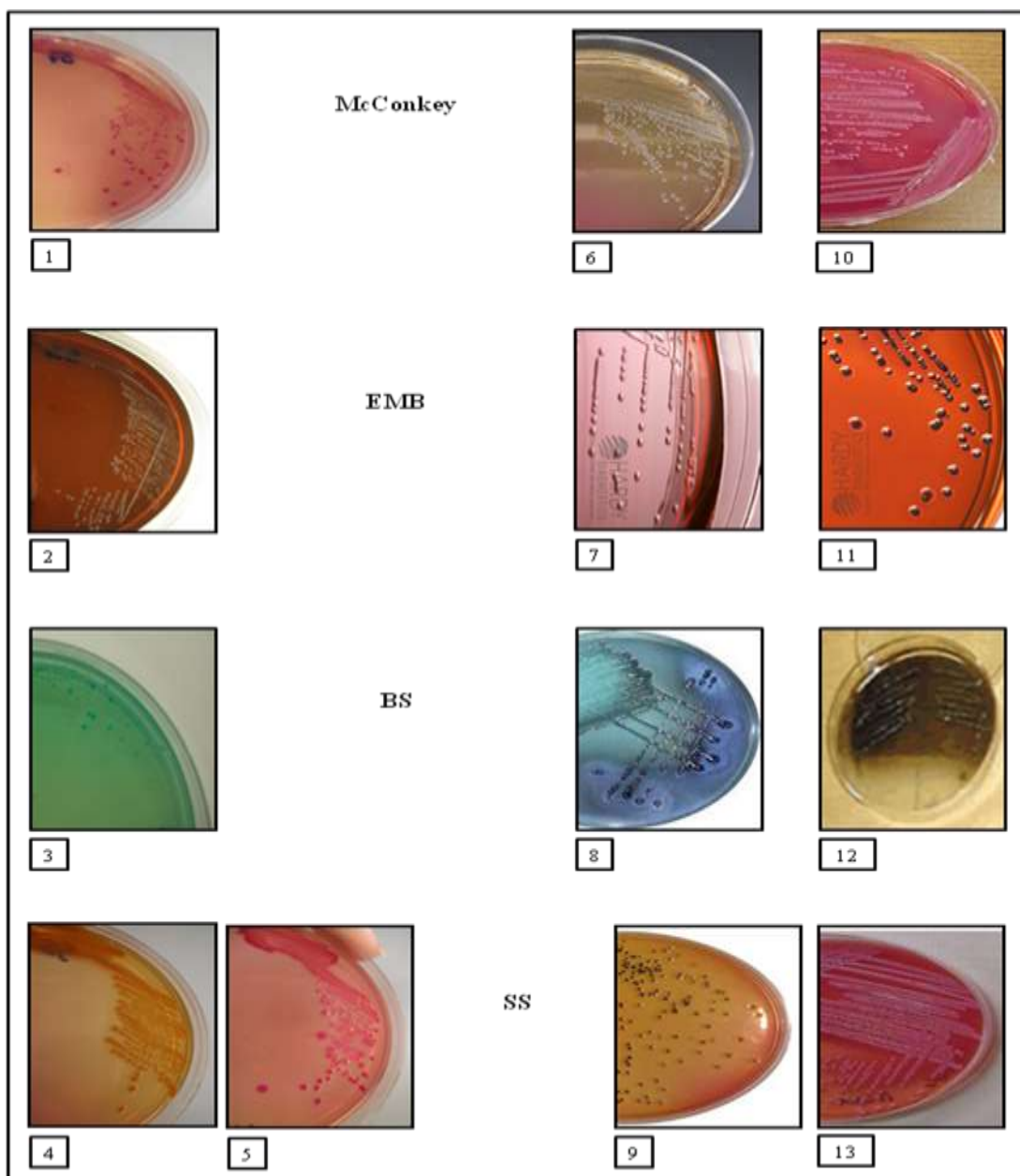
Numeração	Medidas dos halos de inibição (mm)														
	AMC	AMP	CFL	CFO	CAZ	CPM	ERT	IMP	EST	GEN	DOX	TET	CIP	SUT	CLO
FSP 17/10	(28)S	(26)S	(26)S	(22)S	(24)S	(26)S	(36)S	(32)S	<b>(10)R</b>	<b>(10)R</b>	(24)S	(28)S	(36)S	(26)S	(32)S
FSP 21/10	(30)S	(30)S	(30)S	(24)S	(26)S	(26)S	(42)S	(36)S	<b>(0)R</b>	<b>(12)R</b>	(22)S	(28)S	(36)S	(26)S	(32)S
FSP 1109/09	(28)S	(30)S	(30)S	(26)S	(26)S	(28)S	(36)S	(34)S	<b>(8)R</b>	(20)S	(26)S	(26)S	(36)S	(30)S	(32)S
FSP 1110/09	(32)S	(30)S	(28)S	(26)S	(24)S	(26)S	(36)S	(36)S	<b>(12)I</b>	(18)S	(28)S	(30)S	(38)S	(30)S	(32)S
FSP 22/10	(26)S	<b>(12)R</b>	(26)S	(22)S	(22)S	(26)S	(36)S	(36)S	<b>(10)R</b>	<b>(14)I</b>	(26)S	(30)S	(40)S	(30)S	(34)S
FSP 23/10	(32)S	<b>(10)R</b>	(30)S	(26)S	(24)S	(26)S	(42)S	(36)S	<b>(14)I</b>	<b>(12)R</b>	(32)S	(34)S	(40)S	(30)S	(38)S
FSP 1113/09	(30)S	(30)S	(30)S	(26)S	(26)S	(28)S	(36)S	(36)S	<b>(10)R</b>	(20)S	(26)S	(30)S	(38)S	(30)S	(32)S
FSP 1114/09	(30)S	(26)S	(28)S	(24)S	(20)S	(22)S	(30)S	(32)S	<b>(8)R</b>	(18)S	(24)S	(28)S	(32)S	(28)S	(32)S
FSP 1115/09	(24)S	(30)S	(32)S	(24)S	(28)S	(28)S	(42)S	(32)S	<b>(10)R</b>	(20)S	(28)S	(30)S	(38)S	(30)S	(32)S
FSP 1116/09	(34)S	(26)S	(30)S	(24)S	(26)S	(30)S	(36)S	(36)S	<b>(10)R</b>	(22)S	(30)S	(26)S	(36)S	(28)S	(32)S
FSP 1117/09	(28)S	(32)S	(30)S	(26)S	(28)S	(30)S	(42)S	(40)S	<b>(14)I</b>	(18)S	(26)S	(34)S	(42)S	(32)S	(34)S
FSP 1119/09	(34)S	(18)S	(18)S	(24)S	(26)S	(30)S	(22)S	(24)S	(22)S	(20)S	(30)S	(22)S	(24)S	(28)S	(18)S
FSP 1120/09	(24)S	(18)S	(20)S	(26)S	(26)S	(30)S	(24)S	(24)S	(18)S	(22)S	(18)S	(26)S	(34)S	(26)S	(22)S
FSP 1125/09	(24)S	(28)S	(28)S	(24)S	(28)S	(30)S	(42)S	(36)S	<b>(10)R</b>	(20)S	(26)S	(32)S	(38)S	(32)S	(36)S
FSP 1126/09	(24)S	(26)S	(28)S	(24)S	(24)S	(28)S	(38)S	(36)S	<b>(14)I</b>	(18)S	(20)S	(28)S	(36)S	(30)S	(32)S
FSP 1337/09	(24)S	<b>(0)R</b>	(30)S	(26)S	(30)S	(32)S	(40)S	(36)S	<b>(12)I</b>	(20)S	(28)S	(32)S	(34)S	(18)S	(34)S
FSP 1338/09	(22)S	<b>(0)R</b>	(28)S	(24)S	(32)S	(26)S	(42)S	(42)S	<b>(10)R</b>	(24)S	(24)S	(32)S	(36)S	(38)S	(36)S
FSP 1129/09	(24)S	(24)S	(32)S	(30)S	(30)S	(34)S	(42)S	(42)S	<b>(0)R</b>	(22)S	(24)S	(32)S	(42)S	(38)S	(36)S
FSP 1385/09	(30)S	<b>(16)I</b>	(22)S	(20)S	(24)S	(20)S	(32)S	(32)S	<b>(12)I</b>	(18)S	(26)S	(26)S	(24)S	(24)S	(30)S
FSP 1232/09	(30)S	(34)S	(32)S	(26)S	(28)S	(26)S	(42)S	(36)S	(18)S	(22)S	(24)S	(30)S	(38)S	(32)S	(34)S
FSP 1234/09	(22)S	(24)S	(26)S	(24)S	(26)S	(32)S	(32)S	(26)S	<b>(12)I</b>	(22)S	(22)S	(30)S	(24)S	(30)S	(32)S
FSP 1393/09	(22)S	<b>(10)R</b>	(28)S	(24)S	(24)S	(24)S	(32)S	(34)S	<b>(10)R</b>	(20)S	(28)S	(28)S	(34)S	(26)S	(32)S
FSP 1386/09	(28)S	<b>(14)I</b>	(26)S	(22)S	(26)S	(24)S	(32)S	(34)S	<b>(12)I</b>	(20)S	(28)S	(28)S	(32)S	(28)S	(30)S
FSP 1238/09	(28)S	(18)S	(30)S	(20)S	(26)S	(24)S	(36)S	(36)S	(16)S	(18)S	(28)S	(28)S	(36)S	(28)S	(30)S
FSP 1239/09	(26)S	(18)S	(24)S	(20)S	(26)S	(24)S	(36)S	(32)S	<b>(14)I</b>	(16)S	(26)S	(26)S	(30)S	(26)S	(30)S
FSP 1387/09	(28)S	<b>(0)R</b>	(26)S	(24)S	(22)S	(20)S	(32)S	(30)S	<b>(14)I</b>	(18)S	(28)S	(26)S	(30)S	(26)S	(30)S
FSP 1388/09	(24)S	<b>(10)R</b>	(26)S	(22)S	(22)S	(26)S	(34)S	(34)S	<b>(14)I</b>	(20)S	(22)S	(28)S	(32)S	(28)S	(32)S
FSP 1394/09	(26)S	<b>(8)R</b>	(28)S	(20)S	(18)S	(24)S	(32)S	(32)S	(16)S	<b>(14)I</b>	(26)S	(26)S	(26)S	(26)S	(28)S
FSP 1395/09	(30)S	<b>(12)R</b>	(30)S	(24)S	(26)S	(26)S	(38)S	(36)S	(16)S	(18)S	(30)S	(30)S	(38)S	(30)S	(34)S
FSP 1389/09	(32)S	<b>(16)I</b>	(24)S	(20)S	(22)S	(22)S	(34)S	(30)S	<b>(14)I</b>	(20)S	(34)S	(28)S	(30)S	(28)S	(30)S
FSP 1390/09	(32)S	<b>(14)I</b>	(26)S	(22)S	(24)S	(26)S	(32)S	(34)S	<b>(14)I</b>	(20)S	(32)S	(28)S	(32)S	(28)S	(32)S
FSP 1246/09	(32)S	(20)S	(30)S	(30)S	(28)S	(30)S	(38)S	(36)S	<b>(14)I</b>	(22)S	(32)S	(28)S	(38)S	(34)S	(34)S
FSP 1392/09	(28)S	<b>(14)I</b>	(24)S	(20)S	(24)S	(26)S	(28)S	(24)S	(16)S	(18)S	(30)S	(26)S	(30)S	(26)S	(28)S
FSP 1251/09	(18)S	(28)S	(24)S	(36)S	(34)S	(26)S	(26)S	(30)S	<b>(12)I</b>	(26)S	(22)S	(30)S	(28)S	(32)S	(34)S
FSP 1253/09	(30)S	(26)S	(24)S	(20)S	(20)S	(20)S	(30)S	(32)S	<b>(12)I</b>	(22)S	(24)S	(28)S	(32)S	(30)S	(32)S

#### 5.4 DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Na pesquisa dos seguintes genes de resistência: *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>LAT-1</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>EBC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *aadA*, *aadB*, *aadA-1* e *aac(6)* realizada através da PCR, nenhum gene foi identificado.

#### 5.5 CARACTERIZAÇÃO COLONIAL DE *Vibrio metschnikovii* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Os isolados de *Vibrio metschnikovii* cresceram em todos os meios de cultura testados demonstrando a possibilidade de isolamento deste microrganismo em meios de cultura utilizados na rotina laboratorial, mas com nítidas diferenças fenotípicas quando comparado a *Salmonella* spp. e *E. coli*. Em Ágar MacConkey apresentou colônias regulares, elevadas, avermelhadas, com centro opaco e bordas translúcidas. Em Ágar EMB apresentou colônias regulares, elevadas, transparentes e brilhantes. Em Ágar BS apresentou colônias regulares, planas, com centro opaco e bordas translúcidas. Em Ágar SS apresentou colônias irregulares, elevadas, brilhantes que diferem na cor entre amarelas e vermelhas (Figura 3).



**Figura 3** - Caracterização colonial de *Vibrio metschnikovii*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli* em diferentes meios de cultura. **1 a 5** – Colônias puras de *Vibrio metschnikovii* em Ágar MacConkey, Ágar EMB, Ágar BS e Ágar SS, respectivamente; **6, 7, 9, 8 e 12** –*Salmonella* spp em Ágar MacConkey, EMB, SS e BS, respectivamente; **10, 11 e 13** –*Escherichia coli* em Ágar MacConkey, EMB e SS, respectivamente.

**Fontes:** **1 a 5** – este estudo.

**6** - <http://www.flickr.com/photos/25395461@N08/2437489844>

**7 e 11** - <http://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/EMBAgarLevine.htm>

**8** - <http://microorganismosemergentes.blogspot.com/>

**9** - [http://www.eolabs.com/pp\\_1100.htm](http://www.eolabs.com/pp_1100.htm)

**10** - <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-02-2007.html>

**12** - [http://www.ispch.cl/lab\\_amb/serv\\_lab/salmonella.html](http://www.ispch.cl/lab_amb/serv_lab/salmonella.html)

**13** - <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-02-2007.html>

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Vibrio metschnikovii*

O isolamento de *Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais obtidas neste estudo corrobora com a literatura quanto a caracterização desta espécie como amplamente distribuída no meio aquático, especialmente em rios, mares, estuários e águas residuárias e também em alimentos, mas, raramente em amostras clínicas de humanos (FARMER III *et al.*, 1988; HARDARDOTIR *et al.*, 1994; MATTÉ *et al.*, 2007).

No presente trabalho foram inicialmente triadas 159 colônias típicas das quais 123 (77,4%) não apresentaram produção da enzima citocromo oxidase – característica fundamental para a diferenciação de *Vibrio metschnikovii* das outras 83 espécies do gênero *Vibrio*, exceto de *Vibrio gazogenes* (AVib, 2011 disponível em [www.vibriobiology.net/](http://www.vibriobiology.net/); FARMER III e JANDA, 2005).

No entanto, esta característica diferencial faz com que *Vibrio metschnikovii* seja inicialmente descartado devido a falta de familiaridade de laboratoristas no estudo do gênero *Vibrio* que pode ser compreendida frente a pouca atenção dada pela comunidade científica a esta espécie, visto o pequeno número de artigos científicos disponíveis na literatura que estudaram esse microrganismo.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que *Vibrio metschnikovii* cresce em diferentes meios de cultura utilizados na rotina laboratorial, tais como ágar BS, SS, MacConkey e EMB. Ainda assim o microrganismo é facilmente descartado quando cultivado em meios de cultura seletivos e diferenciais utilizados para o isolamento primário de agentes causadores de gastroenterites, como os citados acima, por apresentar características fenotípicas diferentes das quais apresentam os microrganismos que fazem parte da busca de rotina microbiológica, como por exemplo, *E. coli* e *Salmonella* spp. (YALCINKAYA *et al.*, 2003).

Mesmo em situações em que o objetivo seja a busca por *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ou outro *Vibrio* potencialmente patogênico o *Vibrio metschnikovii* é descartado, pois a reação de oxidase só é realizada numa etapa posterior ao isolamento, negligenciando a característica típica da colônia em Ágar TCBS, mesmo que o organismo esteja em grande número.

Tais considerações demonstram a fragilidade do método fenotípico em se tratando de identificação da espécie corroborando os resultados do presente estudo nos quais foram identificados fenotipicamente 123 isolados com características típicas para *Vibrio metschnikovii* dos quais 70 foram confirmados através da PCR com a utilização de iniciadores específicos.

Alguns poucos casos clínicos foram descritos na literatura relatando a presença de *Vibrio metschnikovii* como causa de doenças em humanos constatando a dificuldade de identificação da espécie na área clínica. Entretanto, em nenhum dos casos relatados foi elucidada a fonte de infecção comprometendo a elucidação total de sua epidemiologia.

O primeiro relato de caso clínico foi feito por JEAN-JACQUES *et al.*, em 1981, quando em Chicago/EUA no ano de 1978, *Vibrio metschnikovii* foi isolado de uma paciente de 82 anos acometida por septicemia. Em 1988, em Osaka/Japão, MIYAKE *et al.* isolaram *Vibrio metschnikovii* de fezes diarréicas em paciente de 60 anos de idade. HANSEN *et al.*, em 1993, em Bruxelas/Bélgica, isolaram *Vibrio metschnikovii*, de um paciente de 70 anos com quadro de infecção pulmonar e também, em Villefranche-sur-Saône/França de uma paciente de 82 anos que apresentava sérias lesões cutâneas nas pernas. Em 1994, HARDARDOTTIR *et al.*, em Oslo/Noruega, isolaram *Vibrio metschnikovii* de uma paciente de 83 anos internada com quadro de bacteremia.

Em 2005, em Lille/França, WALLET *et al.* relataram o primeiro caso de *Vibrio metschnikovii* isolado de aspirado brônquico em paciente de 63 anos acometido por pneumonia. No ano seguinte, na Índia, PRASAD e KHARIDEHAL, relataram o primeiro caso de septicemia secundária em um neonato de cinco dias de vida causada por *Vibrio metschnikovii*.



Diante dos relatos fica claro que *Vibrio metschnikovii* é um patógeno oportunista e sua ocorrência se dá em pacientes mais suscetíveis a infecções incluindo idosos e crianças, todos em situação de intervenção hospitalar, levando obrigatoriamente a análise microbiológica completa até a identificação da espécie causadora da doença.

Da mesma forma, a necessidade do reconhecimento do agente infeccioso para tratamento específico levou a identificação de *Vibrio metschnikovii* no ano de 2004 em Berlim/Alemanha, por LINDE *et al.*, quando relataram o primeiro caso de isolamento deste microrganismo de uma infecção de ferida pós cirúrgica. Caso semelhante ocorreu em 2008, em Albacete/Espanha, quando MARTIN *et al.* isolaram *Vibrio metschnikovii* em uma úlcera de membro inferior.

Em outros casos, *Vibrio metschnikovii* foi isolado em regiões de reconhecida incidência de cólera, como visto nos relatos abaixo.

DALSGAARD *et al.* (1996) em Arequipa/Peru, isolaram *Vibrio metschnikovii* de cinco crianças que apresentavam sintomas de diarreia aguda. No mesmo ano, MAGALHÃES *et al.* publicaram os resultados de um estudo no qual analisaram fezes diarreicas provenientes de um surto de cólera que ocorreu em Pernambuco/Brasil, identificando seis cepas de *Vibrio metschnikovii*. LESMANA *et al.* (2002) publicaram os resultados de um estudo realizado em Jacarta/Indonésia entre 1996 e 1998, no qual foi detectada a presença de *Vibrio metschnikovii* em fezes diarreicas.

Apenas um estudo específico de infecções ocasionadas por vibrios foi realizado em 1996, na Flórida/EUA, onde *Vibrio metschnikovii* foi responsável por apenas um, dos 159 casos de infecções em feridas, segundo HLADY e KLONTZ.

Diante dos casos descritos, é notável que *Vibrio metschnikovii* seja esporadicamente isolado de amostras clínicas. Os casos foram pontuais e ocorreram em diversas regiões do mundo em diferentes períodos, o que mostra que este microrganismo está amplamente distribuído, mas apenas foi encontrado em casos específicos de infecções onde nenhum outro patógeno foi previamente identificado e só então seu isolamento tornou-se a alternativa para solucionar o caso e apresentar

um diagnóstico eficaz ao paciente acometido. É relevante pontuar que num período de 30 anos *Vibrio metschnikovii* participou de apenas 12 eventos de infecções e em 9 deles acometeu um único paciente.

O presente estudo é o primeiro a buscar especificamente *Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais. Do total de 70 isolados, 43 (61,4%) compreenderam amostras de vôngole e peixes marinhos e 27 (38,6%) amostras de esgoto, como apresentado na Tabela 1.

De forma semelhante aos estudos de casos clínicos, poucas pesquisas tiveram por objetivo isolar espécies do gênero *Vibrio* de amostras ambientais, e nestes, algumas cepas de *Vibrio metschnikovii* foram encontradas.

Em Hiroshima/Japão, estudo realizado por VENKATESWARAN *et al.*, em 1989, relata o isolamento de vibrios de água doce no qual 11% dos isolados foram identificados como *Vibrio metschnikovii*, demonstrando a preocupação com a qualidade da água proveniente do Rio Otha - principal sistema fluvial da área costeira de Hiroshima que abriga 85% da produção de ostras do país que são comumente consumidas cruas, por fazer parte do hábito alimentar da população japonesa.

A ocorrência de epidemias de cólera também é um estímulo para a pesquisa de vibrios potencialmente patogênicos em países caracterizados por litoral amplamente habitado e constituído por pólo comercial de peixes e frutos do mar, como mostra o estudo publicado em 2007, realizado por MATTÉ *et al.*, em São Paulo/Brasil e também estudo realizado por ELHADI *et al.* em 2004, na Malásia.

Alguns estudos identificaram cepas de *Vibrio metschnikovii* em diferentes tipos de amostras ambientais, apresentando como objetivo comum a pesquisa direcionada ao isolamento de organismos do gênero.

Em 2000, MOSUPYE e HOLY realizaram um estudo em Joanesburgo/África do Sul, onde foram analisadas amostras de alimento e dentre os microrganismos detectados, *Vibrio metschnikovii* esteve presente em 2% destas. No ano seguinte, pela primeira vez uma cepa de *Vibrio metschnikovii* foi isolada de um reservatório de água potável, em Vladivostok/Rússia, por IVANOVA *et al.*

Logo em 2003, em Belek/Turquia, um estudo realizado por YALCINKAYA *et al.* isolou três cepas de *Vibrio metschnikovii* em uma espécie de caranguejo azul. No ano de 2009, IGBINOSA *et al.* realizaram um estudo em uma estação de tratamento de águas residuárias situada na Província do Cabo Oriental da África do Sul, identificando a presença de *Vibrio metschnikovii* em 5,8% das amostras.

Os resultados obtidos no presente estudo, quanto à distribuição de *Vibrio metschnikovii* corroboram as observações feitas por MATTÉ *et al.* (2007), onde os autores sugerem que essa espécie de *Vibrio* possa ter distribuição no ambiente, em peixes e frutos do mar e mesmo em amostras clínicas, maior do que se tem relatado na literatura.

O presente estudo obteve 27 isolados provenientes das amostras de esgoto compreendendo 85,2% de esgoto bruto e 14,8% de esgoto tratado. Os dados revelam que o microrganismo está presente em grande escala no esgoto bruto, no entanto nenhum estudo prévio teve por objetivo analisar o trajeto realizado por *Vibrio metschnikovii* desde a origem até a chegada no esgoto. Assim alguns estudos sugerem possíveis meios de transmissão do microrganismo que podem ajudar a elucidar o fato.

BROZA *et al.* (2008) publicaram um estudo onde relataram a associação existente entre *Vibrio cholerae* e quironomídeos (mosquitos que não picam e pertencem a família Chironomidae, ordem Diptera, classe Insecta) que são os insetos mais amplamente distribuídos em habitats aquáticos de água doce, segundo SENDEROVICH *et al.* (2008). O estudo descreve *Vibrio cholerae* como sendo um microrganismo nativo de ecossistemas aquáticos e relata que detalhes da interação deste patógeno com os outros habitantes do meio, permanecem praticamente desconhecidos. Relatam ainda, que atualmente, evidências apontam para uma adaptação de *Vibrio cholerae* como patógeno de insetos aquáticos, sugerindo que esta espécie e outras bactérias associadas podem ser consideradas parasitas naturais de quironomídeos, e estes mosquitos podem servir como vetores mecânicos de transporte de *Vibrio cholerae* sobre a terra, de um corpo de água a outro.

No entanto, HALPERN *et al.* (2008) trazem a hipótese que aves aquáticas migratórias podem atuar como disseminadoras de *Vibrio cholerae* dentro e entre continentes, já que quironomídeos não alcançam longas distâncias, podendo atuar como disseminadores em raios de até 1 km. As aves têm como importantes integrantes de sua dieta alimentar copépodes (microcrustáceos) bem como as larvas de quironomídeos, que passam ilesas no processo digestivo das mesmas, podendo então ser eliminadas nas fezes.

Diante destes estudos, pode ser sugerida a hipótese da ocorrência de *Vibrio metschnikovii* em esgoto bruto, por intermédio do transporte feito através de quironomídeos, aves aquáticas ou mesmo pelo depósito de excretas humanas, que porventura podiam estar contaminadas pelo patógeno.

Em relação aos isolados originários do esgoto tratado, estes foram detectados em apenas uma das três amostras analisadas neste estudo, como apresentado na Tabela 1. Este fato pode ser explicado pelos diferentes tipos de tratamento empregados nas Estações de Tratamento de Esgoto. A Estação de Tratamento de Esgoto 1 adota o tratamento de lodo ativado convencional seguido de filtração e desinfecção, já a Estação de Tratamento de Esgoto 2 utiliza apenas o tratamento de lodo ativado convencional. Desta forma o processo de desinfecção pode ser o responsável pela eliminação do patógeno previamente isolado do esgoto bruto proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto 1 e não encontrado nas amostras ET 1 e ET 2 derivadas da mesma estação de tratamento. Conseqüentemente a não utilização do processo de desinfecção pode ser a causa do isolamento do patógeno da amostra ET 3 oriunda da Estação de Tratamento de Esgoto 2.

No entanto, o presente estudo não teve por objetivo uma análise detalhada destas questões, cabendo a realização de outras pesquisas que elucidem a hipótese aqui sugerida.

## 6.2 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Neste estudo foram utilizados antibióticos de seis diferentes classes dentre elas, os **beta-lactâmicos** representados por Ampicilina, cefalosporinas (Cefalotina, Cefoxitina, Ceftazidima, Cefepime), carbapenêmicos (Ertapenem e Imipenem) e Amoxicilina+Ácido clavulânico (inibidor de  $\beta$ -lactamase); os **aminoglicosídeos** representados pela Gentamicina e Estreptomicina; as **tetraciclina**s representadas pela Doxiciclina e Tetraciclina; as **quinolonas** representadas pela Ciprofloxacina; as **sulfonamidas** representadas pelo Sulfametoxazol+Trimetoprima e os **anfenicóis** representados pelo Cloranfenicol;

Os resultados demonstraram que 100% dos isolados foram sensíveis a Cefalotina (CFL), Cefoxitina (CFO), Ceftazidima (CAZ), Cefepime (CPM), Ertapenem (ERT), Imipenem (IMP), Amoxicilina+Ácido clavulânico (AMC), Doxiciclina (DOX), Tetraciclina (TET), Ciprofloxacina (CIP), Sulfametoxazol+Trimetoprima (SUT) e Cloranfenicol (CLO). Do total de 70 isolados 44,3% foram resistentes a EST (Estreptomicina), 11,4% a GEN (Gentamicina) e 30% a AMP (Ampicilina). Os isolados classificados como intermediários compreenderam 42,8% a EST, 8,6% a GEN e 11,4% a AMP, dessa forma 12,9% foi sensível a EST, 80% a GEN e 58,6% a AMP.

Os dados referentes a 100% de sensibilidade para CFL e CLO corroboram as observações feitas por FARMER III *et al.* (1988, 2005) e LESMANA *et al.* (2002) que também observou 100% de sensibilidade para TET, CIP e SUT.

HARDARDOTTIR *et al.* (1994) e LINDE *et al.* (2004), também obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo quanto à sensibilidade às cefalosporinas e fluoroquinolonas sendo que apenas o segundo autor relata sensibilidade aos carbapenêmicos. No entanto os autores referidos não especificaram quais antibióticos foram utilizados, citando apenas as classes as quais pertenciam.

DALSGAARD *et al.* (1996) relataram o primeiro surto causado por *Vibrio metschnikovii* em Arequipa/Peru, onde o patógeno mostrou-se resistente a EST assim como relatado por este estudo.

WALLET *et al.* (2005) mostraram que *Vibrio metschnikovii* isolado de aspirado brônquico foi resistente a AMP e aminoglicosídeos, não especificando quais antibióticos pertencentes a esta classe foram utilizados, dados estes que corroboram o presente estudo.

Todos os estudos citados acima analisaram isolados ou cepas clínicas de *Vibrio metschnikovii*, diferentemente do presente estudo que teve como alvo a identificação deste patógeno em potencial de amostras ambientais.

É relevante observar que a literatura científica até o momento dispõe de apenas onze trabalhos que citaram a suscetibilidade de *Vibrio metschnikovii* a antibióticos e dentre esses, apenas três estudos utilizaram amostras ambientais. No entanto, nenhum dos onze trabalhos coincidiu quanto à escolha dos antibióticos utilizados na pesquisa.

OKOH e IGBINOSA (2010) analisaram o perfil de suscetibilidade a 21 tipos diferentes de antibióticos em isolados do gênero *Vibrio* originários do efluente final de uma estação de tratamento de águas residuárias na África do Sul. Os resultados mostraram que *Vibrio metschnikovii* foi sensível a IMP e resistente a AMP corroborando os dados apresentados pelo presente estudo.

Ainda em 2010, REBOUÇAS *et al.* pesquisaram o perfil de resistência antimicrobiana em espécies de *Vibrio* isolados de fazendas de camarão situadas no Ceará/Brasil e detectaram três cepas de *Vibrio metschnikovii*, duas das quais eram resistentes a AMP, bem como apresentado pelo presente estudo.

A pesquisa aqui apresentada é para nosso conhecimento, a primeira que teve como um de seus objetivos, o estudo do perfil de suscetibilidade aos antibióticos em isolados de *Vibrio metschnikovii* provenientes de amostras ambientais.

Contudo, a busca através da PCR, pelo reconhecimento de genes de resistência se deu negativa para 100% dos isolados, o que traz a hipótese da resistência estar sendo expressa através de outros mecanismos, tais como retirada ativa do antibiótico do meio intracelular através de bomba de efluxo, alteração da permeabilidade aos antibióticos mediada por perda de porina ou a ocorrência de resistência por outras enzimas (transferases) diferentes das pesquisadas neste estudo.

NGUYEN *et al.* (2009) propuseram dois diferentes mecanismos para resistência a Ampicilina em cepas de *Vibrio cholerae* O1. Ambos os mecanismos estão relacionados com a alteração da permeabilidade, mas foram diferenciados por apresentarem diferentes resultados. A estirpe caracterizada por cepas rugosas, quando exposta ao estresse causado pela supressão do antibiótico, resultou na perda de porina, enquanto a estirpe caracterizada por cepas fimbriadas produziram uma nova proteína. Algum desses mecanismos pode explicar a resistência a Ampicilina obtida neste estudo através do antibiograma, já que nenhum gene de resistência foi encontrado dentre os pesquisados.

Em relação à resistência apresentada aos aminoglicosídeos, TAVARES (2009g) cita que o mecanismo de resistência que altera o alvo receptor do antibiótico (ribossomo) resulta de uma mutação cromossômica que é menos frequente e pouco importante na prática clínica, mas que é observado em relação à Estreptomicina principalmente quando se refere ao enterococo.

Este mecanismo pode estar afetando *Vibrio metschnikovii*, já que neste estudo a resistência a Estreptomicina, foi de 44,3% e nenhum gene de resistência foi encontrado entre os pesquisados. TAVARES (2009g) sugere ainda que habitualmente microrganismos os quais são resistentes a Gentamicina o são também a Estreptomicina, corroborando o presente estudo.

Outros mecanismos também são responsáveis pela resistência antimicrobiana entre aminoglicosídeos como o proposto por GALIMAND *et al.* (2005) quanto a disseminação de resistência a aminoglicosídeos através do gene *armA* (aminoglycoside resistance methyltransferase), que produz resistência a Amicacina, Canamicina, Fortimicina, Gentamicina, Isepamicina, Netilmicina, Sisomicina e Tobramicina e está distribuído em enterobactérias isoladas de vários países da Europa e também da Índia. Este gene expressa a resistência por um mecanismo que envolve a auto defesa pós-transcricional pela metilação do RNA ribossômico. Os resultados indicaram que *armA* formava juntamente com os genes *ant3''9*, *sull* e *dfrXII* (responsáveis pela resistência a Estreptomicina-Espectinomicina, sulfonamidas e Trimetoprima, respectivamente) um transposon denominado Tn1548 que foi disseminado por um plasmídeo conjugativo denominado IncL/M que também

abriga genes que conferem resistência aos beta-lactâmicos (exceto carbapenêmicos) como *bla*<sub>TEM-1</sub> e *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, entre outros.

DOI e ARAKAWA (2007) relataram que a metilação do 16S RNAr ribossômico é um novo mecanismo de resistência contra aminoglicosídeos distribuído por genes associados a elementos genéticos móveis entre patógenos gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter*. Este mecanismo confere um alto nível de resistência a todos os aminoglicosídeos de uso clínico administrados parenteralmente, e sua ocorrência se dá através da ação de metilases, enzimas que se ligam aos nucleotídeos do 16S RNAr impedindo a ligação do antibiótico.

Existe ainda o relato da resistência a aminoglicosídeos estar ocorrendo por um sistema de resistência adaptativa, ou seja, o microrganismo expressa a resistência através de bomba de efluxo apenas quando está exposto ao antibiótico, como observado por HOCQUET *et al.* (2003) e XAVIER *et al.* (2010) em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Quaisquer destes mecanismos podem estar associados à resistência a Estreptomicina e Gentamicina observada neste estudo, já que os genes responsáveis pela expressão dos mecanismos podem ser facilmente transmitidos intra e inter espécies.

Entretanto é necessária a realização de estudos específicos para identificar quais mecanismos foram responsáveis pela resistência observada em isolados de *Vibrio metschnikovii* no presente estudo.

## 7 CONCLUSÕES

O isolamento e a identificação genotípica de *Vibrio metschnikovii* a partir de amostras ambientais demonstrou que esta bactéria, potencialmente patogênica, está mais disseminada no meio ambiente estudado do que o esperado. No entanto, a falta



de estudos específicos sobre a espécie faz transparecer uma indiferença quanto ao seu potencial patogênico.

Diante dos resultados é possível afirmar que maior importância deve ser dada a esta espécie de *Vibrio*, já que a mesma apresentou resistência a alguns antibióticos de uso comum na clínica, como Ampicilina, Gentamicina e Estreptomicina. Considerando que a resistência fenotípica encontrada pode ter ocorrido devido a mecanismos de resistência expressos por genes que podem ser facilmente transferidos entre microrganismos da mesma espécie e também entre espécies diferentes, é possível inferir que o meio ambiente pode ser responsável pela disseminação de resistência entre microrganismos com importância clínica, conferindo risco à saúde pública.

## **8 RECOMENDAÇÕES**

Recomenda-se uma maior atenção junto à rotina laboratorial para que isolados de *Vibrio metschnikovii* não sejam previamente descartados da hipótese diagnóstica.

Aconselha-se que alimentos de origem marinha não sejam consumidos crus ou mal cozidos, bem como um maior cuidado durante a manipulação dos mesmos, prevenindo assim a contaminação direta ou cruzada.

Sugere-se que mais estudos sejam realizados a cerca de identificar os mecanismos de resistência responsáveis pela resistência expressa nos isolados obtidos neste estudo.

## 9 REFERÊNCIAS

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

Alsina M, Blanch AR. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol*. 1994;76:79-85.

AAM – The American Academy of Microbiology [homepage na internet]. Washington - EUA. Antibiotic Resistance: an ecological perspective on an old problem. 2009 Sep. 32p. Disponível em: <http://academy.asm.org/images/stories/documents/antibioticresistance.pdf>

Antunes F, Hinzmann M, Lopes-Lima M, Machado J, Costa PM. Association Between Environmental Microbiota and Indigenous Bacteria Found in Hemolymph, Extrapallial Fluid and Mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Microb Ecol*. 2010;60:304-309.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [homepage na internet] [acesso em 3 dez 2009]. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada [internet] 8 ed. Brasília: ANVISA; 2003 Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_public\\_disco\\_difusao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf)

Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol*. 2010;140:310-317.

AViB – Association of *Vibrio* Biologists [homepage na internet]. [atualizado em 18 jan 2011; acesso em 26 jan 2011]. Disponível em: <http://www.vibriobiology.net/>

Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006;9(3):142-56.

Baffone W, Vittoria E, Campana R, Citterio B, Casaroli A, Pierfelici L. Occurrence and expression of virulence-related properties by environmental halophilic *Vibrio* spp. in in vitro and in vivo systems. *Food Control*. 2005;16:451-457.

Balassiano IT, Bastos MCF, Madureira DJ, Silva IG, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. The involvement of *tetA* and *TetE* tetracycline resistance genes in plasmid and

chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(7):861-866.

Balsalobre, LC. Pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas e beta-lactamases em *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila* provenientes de ambientes aquáticos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2009.

Benett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br J Pharmacol. 2008;153:347-357.

Bertoncheli CM e Hörner R. Uma revisão sobre metalo- $\beta$ -lactamases. Ver Bras Cienc Farm. 2008;44(4):577-599.

Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG. Disease of humans (other than cholera) caused by vibrios. Ann Rev Microbiol. 1980;34:341-367

Bradford, PA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):933-951.

Broza M, Gancz H, Kashi Y. The association between non-biting midges and *Vibrio cholerae*. Environ Microbiol. 2008;10(12):3193-3200.

Bryskier A, editor. Antimicrobial Agents, antibacterials and antifungals. Washington: ASM Press;2005. Antibiotics and Antibacterial Agents: Classifications and Structure-Activity Relationship; p. 13-38.

Bush K, Jacoby GA. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-spectrum and Inhibitor Resistant  $\beta$ -lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet] c2003. [atualizado em 09 nov 2010; acesso em 16 nov 2010]. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies>

Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969-976.

Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, *et al.* Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3739-3743.

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol* 2001;68:11-20.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*; CLSI document M45-A, Wayne, PA, USA. CLSI 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twentieth Informational Supplement*, CLSI document M100-S20, Wayne, PA, USA. CLSI 2010.

Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1791-1796.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention [homepage na internet]. USA: COVIS - Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance System (COVIS) - Summary of human *Vibrio* cases reported to CDC, 2007; c2009 [atualizado em 9 janeiro 2009; acesso em 2 dez 2009]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/CSTEVibrio2007.pdf>

Dalsgaard A, Alarcon A, Lanata F, Jensen T, Hansen HJ, Delgado F, et al. Clinical manifestations and molecular epidemiology of five cases of diarrhoea in children associated with *Vibrio metschnikovii* in Arequipa, Peru. *J Med Microbiol*. 1996;45:494-500.

Doi Y e Arakawa Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 2007;45(1):88-94.

Dropa, M. Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.

Elhadi N, Radu S, Chen C, Nishibuchi M. Prevalence of Potentially Pathogenic *Vibrio* Species in the Seafood Marketed in Malaysia. *J Food Prot.* 2004;67(7):1469-1475.

Farmer III JJ, Hickman-Brenner FW, Fanning GR, Gordon CM. Characterization of *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio gazogenes* by DNA-DNA Hybridization and Phenotype. *J Clin Microbiol.* 1988;26(10):1993-2000.

Farmer III JJ, Janda JM, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM. Genus I. *Vibrio*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editores, Garrity GM, editor chefe. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2. ed. New York: Springer; 2005. v. 2, p. 494-546.

Farmer III JJ, Janda JM. Family I. *Vibrionaceae*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editores, Garrity GM, editor chefe. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2. ed. New York: Springer; 2005. v. 2, p. 491-494.

Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide Disseminated *armA* Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne, by Composite Transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2949-2953.

Halpern M, Senderovich Y, Izhaki I. Waterfowl – The Missing Link in Epidemic and Pandemic Cholera Dissemination? *PLoS Pathogens*;2008;4(10).

Hansen W, Freney J, Benyagoub H, Letouzey MN, Gigi J, Wauters G. Severe Human Infections Caused by *Vibrio metschnikovii*. *J Clin Microbiol.* 1993;31(9):2529-2530.

Hardardottir H, Vikenes K, Digranes A, Lassen J, Halstensen A. Mixed Bacteremia with *Vibrio metschnikovii* in an 83-year-old Female Patient. *Scand J Infect Dis.* 1994;26:493-494.

Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res Microbiol.* 2006;157:938-947.

Hlady WG, Klontz KC. The Epidemiology of *Vibrio* Infections in Florida, 1981-1993. *J Infect Dis.* 1996;173:1176-1183.

Hocquet D, Vogne C, Garch FE, Vejux A, Gotoh N, Lee A, *et al.* MexXY-OprM Efflux Pump Is Necessary for Adaptive Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(4):1371-1375.

Igbinosa EO, Obi LC, Okoh AI. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in final effluents of a wastewater treatment facility in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *Res Microbiol.* 2009;160:531-537.

Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM, Chaikina EL. Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from a drinking water reservoir. *J Appl Microbiol.* 2001;90:919-927.

Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbio Rev.* 2009;22(1):161-182.

Jean-Jacques W, Rajashekaraiyah R, Farmer JJ III, Hickman FW, Morris JG, Kallick CA. *Vibrio metschnikovii* Bacteremia in a Patient with Cholecystitis. *J Clin Microbiol.* 1981;14(6):711-712.

Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1749-1755.

Le Noc P. Monocyclic  $\beta$ -Lactams. In: Bryskier A, editor. *Antimicrobial Agents, antibacterials and antifungals.* Washington: ASM Press;2005. p. 336-347.

Lee JV, Donovan TJ, Furniss AL. Characterization, Taxonomy, and Emended Description of *Vibrio metschnikovii*. *Int J System Bacteriol.* 1978;28(1):99-111.

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

Linde H, Kobuch R, Jayasinghe S, Reisch U, Lehn N, Kaulfuss S, *et al.* *Vibrio metschnikovii*, a Rare Cause of Wound Infection. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4909-4911.

Lipp KE, Huq A, Colwell RR. Effects of Global Climate on Infectious Disease: the Cholera Model. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):757-770

- Magalhães V, Branco A, Lima RA, Magalhães M. *Vibrio metschnikovii* among diarrheal patients during cholera epidemic in Recife, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996;38(1):1-3.
- Martín MP, Garaizábal EE, Sánchez JL, Sánchez MDC. *Vibrio metschnikovii* from a human infected leg ulcer. Rev Inst Med Trop São Paulo. [periódico na internet] 2008 set/out [acesso em 8 jan 2009];50(5):311-312. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v50n5/a12v50n5.pdf>
- Matté MH, Baldassi L, Barbosa ML, Malucelli MIC, Nitrini SMOO, Matté GR. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. Food Control. 2007;18:747-751.
- Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo- $\beta$ -lactamases. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(2):103-113.
- Miyake M, Honda T, Miwatani T. Purification and Characterization of *Vibrio metschnikovii* Cytolysin. Infect Immun. 1988;56(4):954-960.
- Moura, EMM. Análise do perfil de resistência a antibióticos e detecção dos genes de virulência e resistência em *Aeromonas* provenientes de amostras ambientais [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.
- Mosupye FM, Holy A. Microbiological hazard identification and exposure assessment of street food vending in Johannesburg, South Africa. Int J Food Microbiol. 2000;61:137-145.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Infect 2008;14(s1):42-52.
- Nguyen DT, Ngo TC, Tran HH, Nguyen TPL, Nguyen BM, Morita K, *et al.* 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.
- Okada K, Iida T, Kita-Tsukamoto K, Honda T. Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes. J Bacteriol. 2005;187(2):752-757.

Okoh AI e Igbinsosa EO. Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. BMC Microbiol. 2010;10:143.

Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(6):2153-2162.

Pérez-Trallero E, Iglesias L. Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21(9):520-529.

Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005;43(7):3129-3135.

Poppe C, Martin L, Muckle A, Archambault M, McEwn S, Weir E. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella newport* isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. Can J Vet Res. 2006;70(2):105-114.

Prasad RH, Kharidehal N. *Vibrio metschnikovii* Sepsis In A Neonate. The Internet Journal of Pediatrics and Neonatology [periódico na internet] 2006 [acesso em 4 dez 2009];6(1). Disponível em:

[www.ispub.com/journal/the\\_internet\\_journal\\_of\\_pediatrics\\_and\\_neonatology/volume\\_6\\_number\\_1\\_23/article/vibrio\\_metschnikovii\\_sepsis\\_in\\_a\\_neonate.html](http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_pediatrics_and_neonatology/volume_6_number_1_23/article/vibrio_metschnikovii_sepsis_in_a_neonate.html)

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):440-458.

Ramirez MS e Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat. 2010. In press.

Rebouças RH, Sousa OV, Lima AS, Vasconcelos FR, Carvalho PB, Vieira RHSF. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp



farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. Environ Res. 2010. In press.

Ribeiro VB, Lincopan NH, Lazaro NS, Bersot LS, Paes JAN, Landgraf M, *et al.* Characterization of integrons, antimicrobial resistance genes and virulence genes of *Salmonella enterica* isolated from foodstuff and related sources. In: Anais do IAFP (International Association for Food Protection) 94th Annual Meeting; 2007; Lake Buena Vista, FL. Program and Abstract Book; 2007.

Rojas MVR, Matté MH, Dropa M, Silva ML, Matté GR. Molecular characterization of strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in the southern coast of São Paulo, Brazil. Em preparação.

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.

Senderovich Y, Gershtein Y, Halewa E, Halpern M. *Vibrio cholera* and *Aeromonas*: do they share a mutual host? ISME J. 2008;2(3):276-283.

Tavares W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. São Paulo: Atheneu; 2001. Quinolonas; p. 933-988.

Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009a. Teste de Sensibilidade *In Vitro*; p. 17-22.

Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009b. Classificação dos Antibióticos; p. 11-16.

Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009c. Penicilinas e Inibidores de Beta-Lactamases; p. 151-180.

Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009d. Cefalosporinas; p. 181-204.

Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009e. Carbapenemas e Monobactâmicos; p. 205-214.

- Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009f. Resistência Bacteriana; p. 37-54.
- Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009g. Aminoglicosídeos; p. 215-242.
- Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009h. Tetraciclinas e Glicilciclinas; p. 311-320.
- Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009i. Quinolonas; p. 345-366.
- Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009j. Drogas Antifólicas. Sulfonamidas, Sulfonas e Diaminopirimidinas; p. 321-344.
- Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2009k. Cloranfenicol e Tianfenicol; p. 301-310.
- 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;68:403-431.
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, *et al*. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50:673-679.
- Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):430-450.
- Venkateswaran K, Kiiyukia C, Takaki M, Nakano H, Matsuda H, Kawakami H, *et al*. Characterization of Toxigenic Vibrios Isolated from the Freshwater Environment of Hiroshima, Japan. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(10):2613-2618.
- Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LCC, Gales AC. Efflux pumps

expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. BMC Microbiol. 2010;12:210-217.

Wallet F, Tachon M, Nseir S, Courcol RJ, Roussel-Delvallez M. *Vibrio metschnikovii* Pneumonia. Emerg Infect Dis. 2005;11(10):1641-1642.

Walsh C. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington: ASM Press;2003. Antibiotics: Initial Concepts; p.3-9.

Yalcinkaya F, Ergin C, Agalar C, Kaya S, Aksoylar MY. The presence and antimicrobial susceptibilities of human-pathogen *Vibrio* spp. isolated from blue crab (*Callinectes sapidus*) in Belek tourism coast, Turkey. Int J Environ Health Res. 2003;13:95-98.

Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. J Antimicrob Chemother. 2005;56(6):1148-1151.

# Kélvilin Anahí Gonzales Sábio Soler

Curriculum Vitae

---

## Dados Pessoais

**Nome** Kélvilin Anahí Gonzales Sábio Soler  
**Filiação** VALDEVIR ROMEIRA SÁBIO e APARECIDA MENDONÇA GONZALES SÁBIO  
**Nascimento** 28/05/1983 - Votuporanga/SP - Brasil  
**Carteira de Identidade** 439524325 SSP - SP - 01/07/1997  
**CPF** 31005956880

**Endereço residencial** Rua Professor Ferreira Paulino, 233, apto. 105  
Vila Augusta - Guarulhos  
07025-020, SP - Brasil  
Telefone: 11 29376723

**Endereço profissional** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública  
Av. Dr Arnaldo, 715  
Cerqueira César - Sao Paulo  
01246-904, SP - Brasil  
Telefone: 11 30617753

**Endereço eletrônico** e-mail para contato : kelvilin@usp.br  
e-mail alternativo : kelvilin\_anahi@hotmail.com

---

## Formação Acadêmica/Titulação

**2009** Mestrado em Saúde Pública.  
Faculdade de Saúde Pública - USP/SP, Brasil  
Título: Isolamento e identificação molecular de *Vibrio metschnikovii* em amostras ambientais e análise do perfil de suscetibilidade a antibióticos.  
Orientador: Glavur Rogério Matté  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2001 - 2004** Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.  
Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Brasil  
Título: Estudo da Frequência dos Possíveis Criadouros do Vetor do Dengue no Município de Votuporanga/SP  
Orientador: Alessandra Muniz Silva Melo de Carvalho

---

## Formação complementar

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Curso Basico para uso da Biblioteca/CIR.  
Faculdade de Saude Publica, FSP, Brasil

**2004 - 2004** Curso de curta duração em SERPENTES: ASPECTOS BIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS.  
Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Brasil

# Glavur Rogerio Matté

Curriculum Vitae

---

## Dados Pessoais

**Nome** Glavur Rogerio Matté  
**Nome em citações bibliográficas** MATTÉ, G. R.;Matté, G. R;MATTE, G  
**Sexo** masculino

**Filiação** Attilio Matte e Nila Leonor Matte  
**Nascimento** 19/01/1959 - São Paulo/SP - Brasil  
**Carteira de Identidade** 349386353 SSP - SP - 17/05/1996  
**CPF** 33424730963

**Endereço profissional** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública,  
Departamento de Prática de Saúde Pública  
Avenida Doutor Arnaldo, 715  
Cerqueira Cesar - Sao Paulo  
01246904, SP - Brasil  
Telefone: 11 30667769

**Endereço eletrônico** e-mail para contato: grmatte@usp.br

---

## Formação Acadêmica/Titulação

**1996 - 1998** Pós-Doutorado.  
University of Maryland System, U.M.S., Adelphi, Estados Unidos  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
*Áreas do conhecimento : Vibrios,Epidemiologia Molecular, Virulencia*

**2003** Livre Docência.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Estudo de Vibrio spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares, Ano de obtenção: 2003  
*Palavras-chave: Biologia molecular, Vibrio cholerae, Vibrios, Vigilância, Saúde Pública, Fatores de virulência*  
*Áreas do conhecimento : Vigilância Sanitária*  
*Setores de atividade : Saúde Humana, Cuidado À Saúde das Populações Humanas*

**1988 - 1993** Doutorado em Saúde Pública.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Isolamento de Vibrios potencialmente patogênicos em moluscos bivalves, Ano de obtenção: 1993  
Orientador: Maria Therezinha Martins  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
*Palavras-chave: Vibrio, Moluscos bivalves, Taxonomia, Fatores de virulência*  
*Áreas do conhecimento : Microbiologia Aplicada, Microbiologia Ambiental*  
*Setores de atividade : Produtos e Processos Biotecnológicos, Produtos e Serviços Voltados Para A Defesa e Proteção do Meio Ambiente, Incluindo O Desenvolvimento Sustentado, Saúde Humana*

**1983 - 1987** Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Estudo comparativo do desempenho de anticoagulantes, em hemocultivos, no isolamento primário de Trypanosoma cruzi, Ano de obtenção: 1987  
Orientador: Gentilda Kazuko Funayama Takeda