



Universidade Eduardo Mondlane
Centro de Biotecnologia
Mestrado em Biotecnologia

**Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae*
de ambientes aquáticos em zonas endémicas na província de
Sofala após o ciclone Idai**

Candidato: Fernando Caetano Nhassengo

Maputo, Abril de 2026



Universidade Eduardo Mondlane
Centro de Biotecnologia
Mestrado em Biotecnologia

**Identificação molecular e perfil de resistência de *V. cholerae* de
ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o
ciclone Idai**

Supervisora: PhD. Elisa Taviani

Maputo, Abril de 2026

DECLARAÇÃO

Eu, **Fernando Caetano Nhassengo**, declaro que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau ou num outro âmbito e que constitui o resultado do meu trabalho individual. Esta dissertação é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na Universidade Eduardo Mondlane.

As contribuições dos outros autores neste trabalho de dissertação foram citadas e referenciadas. Aceito que este trabalho de dissertação seja fotocopiado para distribuição gratuita nas bibliotecas escolares, o título e o resumo podem ser usados por outras organizações que se sintam interessados.

Assinatura



(Fernando Caetano Nhassengo)

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha dissertação do mestrado:

Aos meus pais: Filipe Nhassengo e Maria Laura Miguel

Aos meus padrinhos: Eduardo Samo Gudo Júnior e Charlotte E. Comé Samo Gudo

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Deus pela vida e por me ter guardado em segurança até hoje, particularmente nas longas viagens de Nampula a Maputo de autocarro todas as vezes que precisei assistir às aulas: “Obrigado Senhor, toda Honra e Glória para si”.

Agradeço à minha supervisora, PhD. Elisa Taviani, pela sua inestimável paciência e precisas instruções para materialização deste trabalho e pelo apoio incondicional.

Agradeço à meus co-supervisores, MSc. Amélia Mondlane Milisse, PhD. Fellow. Charlotte Elisabeth Comé e Dr. Jose Paula Langa e pela oportunidade dada, pela compreensão e pelas sugestões dadas para melhoria e materialização deste trabalho.

Aos meus pais pela assistência, educação, encorajamento e afecto dentro de todas as dificuldades que enfrentaram o meu muito Obrigado. À **ESGJ e CECSG** pelo encorajamento, motivação, inspiração e pelo direccionamento na vida académica, profissional e social.

À minha Família “**Nhassengo**” em especial aos meus Irmãos, Filipe Nhassengo, João Nhassengo, Carla Joaquina, Dionísia Nhassengo pelo apoio incondicional, compreensão, encorajamento diante das dificuldades, o meu muito obrigado.

À todos os docentes do curso de mestrado em Biotecnologia e aos colaboradores do Centro de Biotecnologia-UEM o meu muito obrigado.

Ao meu chefe de repartição pela compreensão e apoio: Muito obrigado BSc. Natálio Daúdo.

À equipe do INS que fez parte desta pesquisa, o meu muito obrigado: BSc. Jucunú Chitio, BSc. Ana Duaja, BSc. Carmen Lira, o meu muito obrigado pela dedicação e apoio.

Ao meu amigo, colega e irmão, Jussa Paulo Falique endereço o meu obrigado pela ajuda, encorajamento, simpatia que manifestou em todos os momentos partilhados.

Agradecimentos especiais endereço aos meus colegas do curso Manuel Gimo, Osvaldo Laurindo, Suzana Macuvele, Edna Maculuve, Ernesto Sambo, Diamante Chianica, Igna Augusto, Célia Gimo, Selma Marques, Mário Chiliamba e à todos que directa ou indirectamente contribuíram de forma imensurável na minha formação.

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE GRAFICOS	15
LISTA DE ANEXOS	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJECTIVOS	20
3.1. Objectivo Geral	20
3.2. Objectivos Específicos	20
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1. Cólera	21
4.2. Epidemiologia da Cólera	21
4.3. Etiologia	22
4.4. Ecologia	24
4.4.1. Patogenicidade e adaptabilidade ao ambiente	25
4.4.2. Genoma	25
4.4.3. Factores de virulência do <i>V. cholerae</i>	27
4.4.3.1. Ilha de patogenicidade em <i>Vibrio cholerae</i>	28
4.4.3.2. Profago CTX ϕ	29
4.5. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos do <i>V. cholerae</i>	31
4.5.1. Modificação do local do alvo do antibiótico	32
4.5.2. Resistência devido a redução da permeabilidade ou ejeção activa de antibióticos	33
4.5.3. Bomba de efluxo	33
4.5.4. Inactivação do antibiótico por hidrólise ou modificação química	35
4.5.5. Importância transferência gênica horizontal do <i>Vibrio cholerae</i>	36
4.6. Genes de Resistência aos antibióticos	37

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endémicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

4.6.1.	Elementos integrativos e conjugativos	37
4.6.2.	Integrans	38
4.6.3.	Plasmídeos	39
5.	METODOLOGIA	41
5.1.	Tipo de Estudo	41
5.2.	Área de estudo	41
5.3.	Plano experimental e etapas da pesquisa	43
5.4.	Amostragem	44
5.5.	Testagem Microbiológica	45
5.5.1.	Isolamento e Identificação	45
5.5.2.	Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana	46
5.6.	Identificação Molecular	46
5.6.1.	Extracção de DNA e Detecção de <i>V. cholerae</i>	46
5.6.1.1.	Quantificação de DNA	46
5.6.2.	Descrições de PCR	47
5.6.3.	PCR para detecção de genes de <i>Vibrio cholerae</i>	48
5.7.	Sequenciamento genómico (WGS)	48
5.8.	Análise de Multi Locus Sequence Typing (MLST)	49
5.9.	Análises de Genes de Virulência	50
5.10.	Análises de Genes de Resistência aos Antibióticos	50
5.11.	Análise filogenética	50
6.	LIMITAÇÕES	52
7.	RESULTADOS	53
7.1.	Amostragem	53
7.2.	Análise Microbiológica	53
7.2.1.	Isolamento de <i>Vibrio cholerae</i>	53
7.2.2.	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana	56
7.3.	Identificação molecular	57
7.4.	Sequenciamento	58
7.4.1	Análise de Multi Locus Sequence Typing (MLST)	58

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

7.4.2	Análise de Genes de Virulência	58
7.4.3	Análise de Genes de Resistência Antimicrobiana (AMR) e Fenótipos de Resistência aos Antibióticos	58
7.4.4	Análise Filogenética	60
8.	DISCUSSÃO	62
9.	CONCLUSÕES	67
10.	RECOMENDAÇÕES	69
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	ANEXOS	81

RESUMO

Introdução:

Vibrio cholerae é uma bactéria Gram-negativa responsável por causar cólera em humanos, faz parte da flora natural do ambiente aquático de regiões temperadas e tropicais do mundo. O serogrupo O1 é responsável por provocar surtos epidémicos de cólera, doença transmitida principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminada. Em Moçambique a cólera é endémica.

Objectivos: Este estudo teve como objectivo, avaliar a presença de *V. cholerae* O1 no ambiente aquático na província de Sofala e determinar o perfil de resistência antimicrobiana (RAM) numa área fortemente afectada por uma epidemia de cólera após o ciclone Idai.

Metodologia: A presente pesquisa é um estudo observacional transversal prospectivo, onde um total de 77 amostras de água colhidas de valas de drenagem, poços e rio dos distritos de Dondo, Nhamatanda e Cidade da Beira foram analisadas. Isolados suspeitos de *V. cholerae* foram identificados fenotipicamente e confirmados por testes bioquímicos *Kliger Iron Agar* (KIA), *Simmons Citrate Agar*, *Ureia Agar base*, *Sulphate Indol Motility* (SIM). Foram realizados testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* pelo método de difusão em disco (Kirby-Bauer) para a determinação do perfil de resistência antimicrobiana e a para confirmação da presença de genes de virulência e resistência antimicrobiana foi usado o PCR convencional e sequenciamento. Posteriormente foram realizadas análises filogenéticas dos isolados e comparados com isolados criopreservados provenientes de amostras clínicas do período anterior ao ciclone Idai.

Resultados: De 66 isolados suspeitos, 26 foram confirmados como *V. cholerae* O1 oriundos das amostras da Beira. Destes, 21 (80,8%), 12 (46,2%) e 1 (3,8%) foram resistentes a Ciprofloxacina, Cefotaxime e Gentamicina, respectivamente. Destes, 17 foram seleccionados, sequenciados e re-confirmados como sendo *V. cholerae* O1 e usando o programa Bioinformático ResFinder demonstraram potencial resistência à Estreptomicina, Florfenicol, Cloranfenicol, Sulfametoxazol e Trimetoprina.

Conclusões: Nossos dados demonstraram a importância do ambiente aquático para a saúde pública como reservatório de *V. cholerae* patogénico e sugerem que houve a introdução de estirpes filogeneticamente mais próximas a isolados da Índia antes do ciclone Idai. A monitoria contínua de estirpes ambientais de *V. cholerae* e do perfil de RAM de estirpes epidémicas é crucial para as estratégias de controle da cólera.

Palavras-chave: *V. cholerae* O1, resistência antimicrobiana, ambiente aquático, cólera, ciclone IDAI, análise filogenética.

ABSTRACT

Introduction:

Vibrio cholerae is a Gram-negative bacterium responsible for causing cholera in humans; it is part of the natural flora of aquatic environments in temperate and tropical regions worldwide. Serogroup O1 is responsible for causing epidemic outbreaks of cholera, a disease transmitted primarily through the ingestion of contaminated food or water. In Mozambique, cholera is endemic.

Objectives: Characterize isolates of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment and determine the genetic relationship and transmission dynamics of cholera outbreaks in Sofala province.

Methodology: The present study is a prospective, cross-sectional, observational study in which a total of 77 water samples collected from drainage ditches, wells, and rivers in the districts of Dondo, Nhamatanda, and Cidade da Beira were analysed. Isolates suspected of being *V. cholerae* were identified phenotypically and confirmed by biochemical tests: *Kliger Iron Agar* (KIA), *Simmons Citrate Agar*, *Urea Agar*, and *Sulphate Indol Motility* (SIM). *In vitro* antimicrobial susceptibility testing was performed using the disk diffusion method (Kirby-Bauer) to determine the antimicrobial resistance profile, and conventional PCR and sequencing were used to confirm the presence of virulence and antimicrobial resistance genes. Subsequently, phylogenetic analyses of the isolates were performed and compared with cryopreserved isolates from clinical samples collected prior to Cyclone Idai.

Results: Of 66 suspected isolates, 26 were confirmed as *V. cholerae* O1 from samples collected in Beira. Of these, 21 (80.8%), 12 (46.2%), and 1 (3.8%) were resistant to ciprofloxacin, cefotaxime, and gentamicin, respectively. Of these, 17 were selected, sequenced, and reconfirmed as *V. cholerae* O1; using the bioinformatics program ResFinder, they demonstrated potential resistance to Streptomycin, Florfenicol, Chloramphenicol, Sulfamethoxazole, and Trimethoprim.

Conclusions: Our data demonstrated the importance of the aquatic environment for public health as a reservoir of pathogenic *V. cholerae* and suggest that strains phylogenetically closer to isolates from India were introduced prior to Cyclone Idai. Continuous monitoring of environmental *V. cholerae* strains and the AMR profile of epidemic strains is crucial for cholera control strategies.

Keywords: *V. cholerae* O1, antimicrobial resistance, aquatic environment, cholera, Cyclone Idai, phylogenetic analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF – *Accessory colonization factor*/ factor de colonização acessório

APA – Água Peptonada Alcalina

ARG – *Antibiotic resistance genes* / genes de resistência a antibióticos

bp/pb – Base pairs / Pares de bases

CARD – *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* -

CB-UEM – Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane

CDC – *Center for Diseases Control* / Centro de Controle de Doenças

CFR - Case Fatality Rate / Taxa de Letalidade de Casos

CT – Toxina Colérica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

HGT – *Horizontal Gene Transfer* / Transferência Horizontal de Genes

ICE – *Integrative and Conjugative Element* / Elemento Conjugativo Integrativo

INS – Instituto Nacional de Saúde

kb – Kilobase

LPS – Lipopolissacarídeo

LSPS – Laboratório de Saúde Pública da Sofala

MDR - Multidroga resistente

MH – Agar Mueller Hinton

MLST – *Multi Locus Sequence Typing* / Tipagem de Sequência Multilocus

MSHA - *Mannose-Sensitive Haemagglutinin* / Hemoaglutinina sensível à manose

NAG – Não aglutinantes

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* / Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

ORF – *Open Reading Frames* / Quadros de leitura abertos

PCR – *Polymerase Chain Reaction* / Reação em Cadeia da Polimerase

RT-PCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction* / Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

TCBS – *Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar* / Ágar Tiosulfato Citrato Sais Biliares e Sacarose

TCP – *Toxin coregulated pilus*/ Toxina coregulada por pilus

TM – Temperatura de anelamento

TSA – Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

VFDB – *Virulence Factor Database* – Base de dados de Factor de Virulência

VNC – Viável, mas Não Cultivável

VPI – *Vibrio Pathogenicity Island* - Ilha de patogenicidade do *Vibrio*

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

ST – *Sequence Type* -

WGS – *Whole Genome Sequencing*/ Sequenciamento do Genoma Completo

WHO – *World Health Organization* / Organização Mundial de Saúde

7PET – “*Seventh pandemic El Tor*” lineage / Sétima Pandemia de *Vibrio cholerae* O1 El Tor

ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control* / Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

RI – *Resistance integrons* -

SI – *Super integrons* -

TL – Taxa de letalidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Localização e fontes de contaminação de água dos locais de amostragem	42
Tabela 2.	Distribuição das amostras colhidas por distrito e por pontos de amostragem	45
Tabela 3.	Descrição dos primers de identificação de <i>V. cholerae</i> e de resistência a antibióticos	47
Tabela 4.	Genes conservados de <i>V. cholerae</i> seleccionados para análise de MLST	50
Tabela 5.	Parâmetros e condições de colheita dos isolados de <i>V. cholerae</i> O1	55
Tabela 6.	Isolados de <i>V. cholerae</i> confirmados pelo sequenciamento e respectivos genes de resistência aos antimicrobianos	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Número de casos de cólera notificados em 2025 no Mundo	22
Figura 2.	Distribuição dos principais locos genéticos necessários para virulência do <i>V. cholerae</i>	26
Figura 3.	Esquema da ilha de patogenicidade de <i>V. cholerae</i>	28
Figura 4.	Esquema do profago CTXφ	30
Figura 5.	Esquema dos principais mecanismos de resistência bacteriana	31
Figura 6.	Esquema dos mecanismos de resistência bacteriana adquirida por transferência horizontal de genes	37
Figura 7.	Mapa com os pontos de amostragem na província de Sofala nos Municípios da Beira e Dondo e no distrito de Nhamatanda	41
Figura 8.	Plano experimental e etapas da pesquisa	43
Figura 9.	Locais de amostragem de água	44
Figura 10.	Isolados suspeitos de <i>V. cholerae</i>	53
Figura 11.	Testes bioquímicos e serológicos para identificação de <i>V. cholerae</i>	53
Figura 12.	Detecção de gene <i>ompW</i> para identificação do <i>V. cholerae</i>	57
Figura 13.	Detecção de gene de resistência floR do <i>V. cholerae</i>	59
Figura 14.	Árvore filogenética que representa a relação das estirpes isoladas na Beira com as estirpes clínicas isoladas durante a epidemia que afectou a província de Sofala após o ciclone Idai em 2019	61

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Isolados de <i>V. cholerae</i> por local de amostragem	54
Gráfico 2.	Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana de <i>V. cholerae</i>	56

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

ANEXOS

Anexo 1. Concentração de DNA e valores de absorvância obtido após a extracção de DNA	81
Anexo 2. Genes de Resistência Antimicrobiana e genes conservados usados para MLST	82

1. INTRODUÇÃO

Vibrio cholerae é uma bactéria Gram-negativa responsável por causar cólera em humanos (Maheshwari *et al.*, 2011; Bhandari *et al.*, 2021). A cólera pode ocorrer de forma esporádica, endêmica e pandêmica e é caracterizada por fortes diarreias agudas com a cor de água de arroz e desidratação severa, choque hipovolémico que pode levar à morte do paciente dentro de 48 horas, caso não seja tratada. Os surtos de cólera estão muito associados às condições sanitárias precárias (Faruque *et al.*, 1998; Mendes, 2007; Bhandari *et al.*, 2021).

São conhecidos mais de 200 serogrupos de *V. cholerae*, com ênfase para os serogrupos O1 e O139 que causam epidemias de cólera. O serogrupo O1 divide-se em 2 biotipos: o Clássico e o El Tor (considerados os causadores da 6^a e 7^a pandemias, respectivamente) (Bandhari *et al.*, 2021). O *V. cholerae* O1 El Tor (7PET) foi responsável pela sétima pandemia e propagou-se a partir da Baía de Bengala para outros países do Sul da Ásia, África e América Central e do Sul, com as últimas epidemias mais mortais relatadas no Haiti em 2011 (Talkington *et al.*, 2011) e Iémen em 2017 (Weill *et al.*, 2019). As estirpes do serogrupo O1 (biotipo El Tor) e serogrupo O139 são os mais implicados em casos de epidemia de cólera no mundo (Faruque *et al.*, 1998).

Segundo um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017, mais de 34 países relataram um total de 1.227.391 casos incluindo 5.654 mortes, resultando em uma taxa de letalidade de casos (CFR) de 0,5% (OMS, 2018). No entanto, os números oficiais são significativamente subnotificados e a carga global de cólera foi estimada em 86 milhões de casos (intervalo: 1.3 – 4.0 milhões) e 95.000 mortes (intervalo: 21.000 – 143.000) por ano e uma população em risco de aproximadamente 1.3 bilhões em 69 países endêmicos (Pezzoli, 2019).

A epidemia da cólera é um importante problema de saúde pública em muitos países da África Subsaariana. Em Moçambique ocorrem surtos anuais com picos epidémicos sazonais, com a taxa de incidência anual entre 0 a 211 por 100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade periodicamente alta (Baltazar *et al.*, 2017).

O *V. cholerae* apresenta factores de virulência responsáveis por provocar sintomas graves da cólera que estão ligados a elementos genómicos móveis (fagos que são responsáveis por

codificar a toxina da cólera - CTX). Os bacteriófagos são responsáveis pela diarreia aguda; ilhas de patogenidade são responsáveis por codificar VPI-I que está associado a aderência do vibrião no intestino do hospedeiro; e integrons e elementos conjugativos integrativos (ICE) responsáveis pelos genes de resistência antimicrobianas (Faruque *et al.*, 1998; Maheshwari *et al.*, 2001).

Os ICE são os mais encontrados em estirpes de *V. cholerae* com resistência antimicrobiana, sendo responsáveis por resistência a mais de 6 antibióticos (cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, neomicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, eritromicina e amicacina) (Bhabatosh *et al.*, 2019).

O *V. cholerae* e outras espécies bacterianas podem apresentar resistência aos antimicrobianos através dos seguintes 7 mecanismos: modificação do sítio alvo do antibiótico, substituição do alvo do antibiótico, protecção do alvo do antibiótico, inactivação do antibiótico por hidrólise ou modificação química, prevenção do acesso ao sítio-alvo através da alteração da permeabilidade da membrana, exportação activa de antibióticos da célula bacteriana e resistência pela ausência do alvo do antibiótico (Alekshun, 2007; Blair *et al.*, 2015).

Neste contexto, o presente estudo teve como objectivo caracterizar isolados de *V. cholerae* O1 em ambiente aquático e determinar a relação genética e a dinâmica de transmissão de surtos de cólera na província de Sofala. Para o efeito, foram analisadas amostras de água provenientes de diferentes locais de estudo, recorrendo a métodos microbiológicos clássicos para o isolamento e identificação bacteriana, seguidos de técnicas moleculares para a detecção de genes associados à virulência e à resistência antimicrobiana. Adicionalmente, foi avaliada a susceptibilidade aos antimicrobianos com relevância clínica, de modo a contribuir para a compreensão do papel do ambiente aquático como reservatório e veículo de disseminação de estirpes potencialmente patogénicas e resistentes de *V. cholerae*.

2. JUSTIFICATIVA

Moçambique tem relatado casos de cólera anualmente, e é considerado um país endêmico. Desde 1973 que é assolado por surtos cíclicos e com altas taxas epidêmicas em diferentes épocas do ano. O verão é a época com maior incidência de casos de cólera, com mais impacto nos meses de Janeiro a Março e com uma incidência anual que varia entre 0 e 211 por 100.000 habitantes (Gujral L, *et al.*, 2013).

A província de Sofala tem sido assolada por surtos de cólera, frequentemente na época chuvosa (Baltazar *et al.*, 2017) e com áreas consideradas de zonas quentes em que a incidência da cólera é historicamente alta (MISAU, 2023). Aliado a isso, está o facto de que o surto mais recente de grande magnitude na província de Sofala agravou-se pelas condições ideais criadas pelas inundações após o devastador ciclone Idai ocorrido em 2019. Nesse contexto, dada a importância do ambiente aquático na transmissão da cólera, torna-se fundamental estabelecer uma vigilância de base laboratória de *V. cholerae* O1 nas águas e a sua caracterização genética. Contudo, a informação sobre a presença de estirpes ambientais circulantes de *V. cholerae* O1, e seu perfil genético, nesta região são escassas ou quase inexistentes tornando-se necessária a realização deste estudo de isolados ambientais. Igualmente, a falta de dados sobre o perfil de resistência das estirpes ambientais de *V. cholerae* aos antibióticos usados no tratamento da cólera, torna esta pesquisa ainda mais relevante contribuindo para a adopção de medidas estratégicas de controle mais eficazes de surtos da doença e na garantia da eficácia do tratamento.

3. OBJECTIVOS

3.1. Objectivo Geral

- Caracterizar isolados de *V. cholerae* O1 em ambiente aquático e determinar a relação genética e a dinâmica de transmissão de surtos de cólera na província de Sofala.

3.2. Objectivos Específicos

- Isolar o *V. cholerae* a partir de amostras de água urbana na província de Sofala;
- Identificar os isolados de *V. cholerae* por meio de testes fenóticos e bioquímicos convencionais e teste molecular;
- Determinar o perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *V. cholerae*;
- Identificar genes de virulência associados a patogenicidade e genes de resistência antimicrobiana de *V. cholerae* incluindo os relacionados a cólera epidémica;
- Realizar análise filogenética dos isolados ambientais, com base em sequências genómicas, comparar os isolados ambientais com as estirpes clínicas de *V. cholerae* e avaliar as relações evolutivas e possíveis conexões epidemiológicas.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Cólera

A Cólera é uma doença infecciosa intestinal aguda de transmissão fecal – oral que acomete seres humanos. Caracteriza-se por um volume exacerbado de diarreia aguada podendo levar a perda de um litro de líquido por hora. A diarreia de cólera apresenta um aspecto de água de arroz, cólicas abdominais, náuseas e vômitos (Sack *et al.* 2004, Kaper *et al.*, 1995).

A infecção ocorre através do consumo de alimentos e água contaminada com *V. cholerae* patogênico (Kaper *et al.*, 1995), que atravessa a barreira ácida do estômago, coloniza o epitélio do intestino delgado por intermédio de Toxina Corregulada por Pilus (TCP) e por meio de outros factores de colonização pouco descritos, proliferando-se no intestino delgado proximal e produzindo enterotoxinas (Cariri, 2008).

A Toxina Colérica (CT) é responsável por promover a desidratação intracelular que resulta na diarreia característica, isto ocorre por esta toxina actua sobre o mecanismo fisiológico de transporte de iões nas células epiteliais do intestino, promovendo um aumento da concentração intracelular de cAMP, aumentando a concentração a secreção do ião (Cl^-) e consequentemente diminuindo a absorção do ião de sódio (Na^+) pelas células das vilosidades (Field, 1980; Cariri, 2008).

4.2. Epidemiologia da Cólera

A cólera é uma doença endêmica em várias regiões do Mundo em via desenvolvimento, a sua disseminação está associada à fraca infra-estrutura, baixo desenvolvimento económico, pobreza e sistema de saneamento de meio precário aliado à alta densidade populacional e baixa escolaridade (Bahia, 2011).

Segundo ECDC, (2025), de 1 de Janeiro de 2025 até 2 de Maio de 2025, 111.359 casos de cólera, incluindo 1.562 mortes, foram relatados em todo o mundo, em comparação ao mesmo período do ano anterior, em 151.497 casos de cólera, incluindo 1.752 mortes foram relatados. Em

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

2025, cinco países registaram mais novas mortes nomeadamente Angola (247), Sudão (62), Moçambique (29), Etiópia (15) e Zimbabué (10), todos africanos.

Em Moçambique, a cólera é altamente sazonal, com aumento de casos no período quente e chuvoso, especialmente nas províncias de Cabo Delgado, Nampula, Tete e Sofala. A ocorrência da cólera pode ser definida como endémica com picos epidémicos ocasionais. A incidência anual varia de 0 a 211 por 100 000 habitantes, com taxa de letalidade (TL) entre 0,2% e 4,3%, constituindo este mal um importante problema de saúde pública (MISAU, 2023).

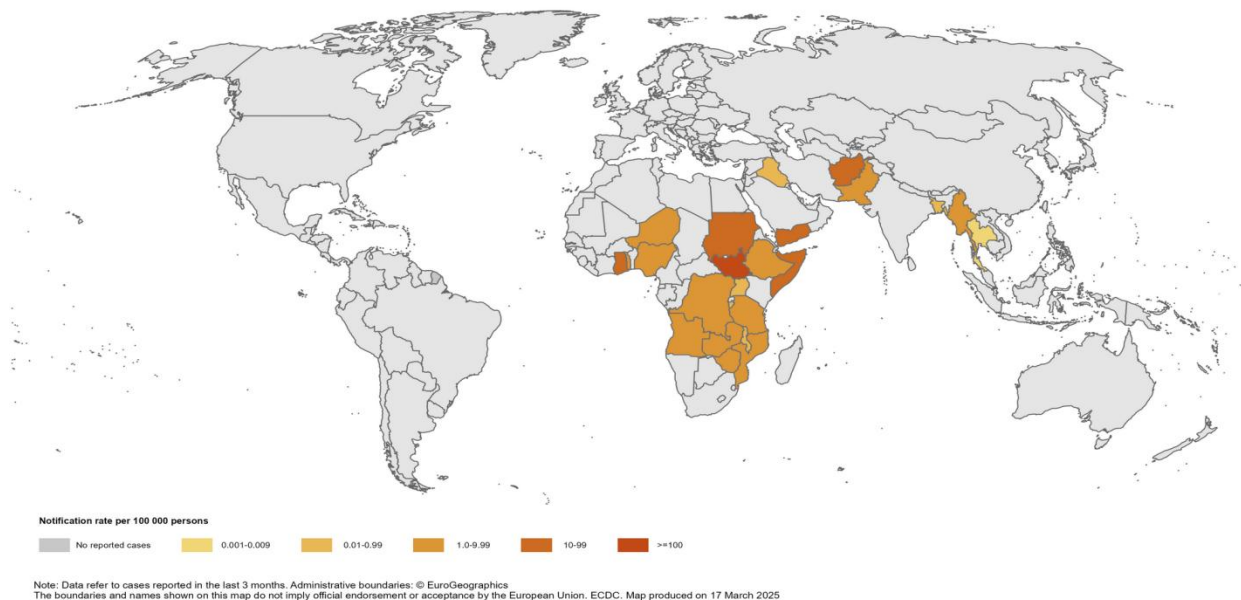


Figura 1. Número de casos de cólera notificados em 2025 no Mundo . **Fonte:** (ECDC, 2025).

4.3. Etiologia

O *V. cholerae* é faz parte da família Vibrionacea pertencente ao gênero *Vibrio*, que é composto por mais de 80 espécies e 13 deles implicados em infecções em seres humanos (Bahia, 2011; FAO/WHO, 2001). As Vibrionaceae são bacilos rectos ou curvos, que se movem por meio de flagelo polar, quimiorganotróficos e anaeróbicos facultativos, com metabolismo oxidativo e fermentativo. Na sua maior parte são oxidase positiva. Utilizam a D-glucose como fonte

principal de carbono e energia e utilizam sais de amónia como fonte de nitrogénio (Brenner *et al.*, 2005).

O *V. cholerae* foi descrito primeiramente em 1854 por Pacini e isolado em 1884 por Robert Koch no Egipto e na Índia. Analisando uma amostra de fezes de uma paciente, observou um bacilo no formato de uma vírgula que foi chamado de Comma bacilli (Koch, 1884, Faruque *et al.*, 1998, Sack *et al.*, 2004).

A sua estrutura termoestável polissacarídica do antígeno somático composto por três fracções (A, B, C) é a base para a determinação da classificação antigénica do *V. cholerae*. De acordo com esta classificação a bactéria é dividida em sorogrupos e sorotipos, sendo mais de duzentos sorogrupos O são conhecidos (Yamai, 1997; Thompson *et al.*, 2008). A estrutura polissacarídica existente na superfície da parede celular de *V. cholerae* é determinante para diferenciação dos sorogrupos, pois é o antígeno lipopolissacarídeo (LPS), que se encontra na membrana celular que se aglutina com o antisoro polivalente para o antígeno “O” específico. Onde se diferenciam o serogrupo O1 três fracções antigénicas A, B e C que se dividem nos sorotipos Ogawa (fracções A e B), Inaba (fracções A e C) e Hikojima (fracções A, B e C) (Bahia, 2011). O *V. cholerae* O1 pode ser classificado ainda em dois biotipos Clássico e El Tor, em função das características fenotípicas / bioquímicas (Vaz, 2013) e de patogenicidade.

Segundo Vaz (2013) e Cariri (2008), as estirpes mais implicadas em casos de cólera e mais conhecidos em epidemias são os serogrupos O1 [biotipos Clássico ou El Tor (sorotipos Inaba, Ogawa e Hikojima)] e O139. Porém existe o *V. cholerae* não – O1 e não – O139 ou também chamados de *Vibrio* não aglutinantes (NAGs) cuja identificação bioquímica é *V. cholerae* mas nos testes sorológicos não ocorre aglutinação aos antisoros O1 e O139 (Bahia, 2011).

O *V. cholerae* O1 clássico foi o responsável pelas primeiras seis pandemias de cólera que ocorreram entre os anos 1817 e 1923, porém o biotipo El Tor foi responsável pela sétima pandemia que se originou em 1961 na ilha Sulawesi na Indonésia, e daí, difundiu-se globalmente, alcançando áreas não afectadas pelas seis pandemias anteriores. O *V. cholerae* O1 clássico tem maior capacidade de sobrevivência em reservatórios aquáticos do que o biotipo El Tor (Vaz, 2013; Marin, 2013).

O *V. cholerae* O139 foi identificado pela primeira vez em 1992 no sul da Ásia, sendo associado a uma epidemia de cólera, ele deriva de *V. Cholerae O1* El Tor por transferência lateral de uma ilha genômica e é semelhante a *V. cholerae O1* El Tor (Vaz, 2013). Esta transferência lateral (horizontal) de genes, recombinações e mutações envolvendo factores de virulência pode resultar na emergência de variantes de *V. cholerae* com maior adaptabilidade ao meio ambiente elevando a sua capacidade de transmissão e patogenicidade (Blokesh *et al.*, 2007; Bahia, 2011).

4.4. Ecologia

V. cholerae apresenta um ciclo de vida com duas fases: uma fase ocorre no hospedeiro humano e outra, no ecossistema aquático distribuindo entre água do mar, água doce (rios), água de esgoto, águas estuarinas e regiões costeiras (Cariri, 2008). Pode habitar de forma livre como uma célula de vida livre ou associações ecológicas com zooplankton, crustáceos, moluscos e peixes (Colwell & Huq, 1994).

A sobrevivência do *V. cholerae* depende de vários factores tais como condições físico-químicas da água (temperatura, salinidade e pH), sendo temperaturas superiores a 5°C toleráveis para sobrevivência do microorganismo por longos períodos, e uma faixa de salinidade de 0,25 a 3%, com um pH que varia entre 7,0 a 9,0 (Silva *et al.*, 2019). Porém as condições ideais de salinidade, temperatura e pH *in situ* são de até 15‰, 30 °C e 7.0 a 9.0 respectivamente (Silva *et al.*, 2016). Mas, temperaturas baixas, alto teor de sal, escassez de nutrientes e choque térmico podem influenciar a bactéria a entrar no estado viável, mas não cultivável (VCN) (Tamplin *et al.*, 1990).

O *V. cholerae* pode ser encontrado dentro de comunidade multicelular chamado biofilmes que é uma matriz extracelular polissacarídica estruturada formado por quitina, que serve como protetor de agressões ambientais (Colwell, 1996).

As mudanças ambientais e climáticas influenciam no índice de contaminação por cólera em regiões endêmicas, sendo a disponibilidade da água um dos factores importantes na sua disseminação aliado a elevadas temperaturas o que favorece a proliferação massiva da população de *V. cholerae* (Sack *et al.*, 2004 & Bahia, 2011).

A temperatura, salinidade e concentração de matéria orgânica estão relacionadas à sobrevivência de vibriões no ambiente aquático (Colwell, 1996).

4.4.1. Patogenicidade e adaptabilidade ao ambiente

A transferência horizontal de genes no meio ambiente ocorre com muita frequência entre os microorganismos tais como *V. cholerae*. Todos os principais fatores de virulência de *V. cholerae*, muitos determinantes de resistência e determinantes antigénicos foram adquiridos por meio de eventos de transferência horizontal de genes. Pode-se destacar o surgimento de *V. cholerae* sorogrupo epidémico O139, resultante de um evento de recombinação homóloga em que ocorreu a transferência horizontal do operon do antígeno O, originando o *switch* de O1 para O139 (Blokesh & Schoolnik, 2007; Sá, 2009).

A troca de genes de patogenicidade de *V. cholerae* pode ocorrer pela transferência horizontal de genes entre indivíduos da mesma espécie, géneros distintos ou entre famílias e níveis taxonómicos. Os genes de virulência são transmitidos a bactérias não portadoras através de outras bactérias denominadas doadoras e eles passam a desempenhar papel de reservatórios ambientais de genes de patogenicidade (Sá, 2009).

A aquisição de fagos filamentosos, designados VPI, que contêm genes ligados à biossíntese do pilus TCP — um factor importante no processo de colonização intestinal e na predisposição para a aquisição de material genético externo durante a fase de crescimento de *V. cholerae* O1/O139 em substratos quitinosos de organismos marinhos — constitui uma evidência de transferência horizontal de genes associados à patogenicidade e à adaptabilidade ecológica de *V. cholerae* no ambiente aquático (Meibom *et al.*, 2005; Sá, 2009).

4.4.2. Genoma

O genoma do *V. cholerae* apresenta dois cromossomas circulares com cerca de 3Mbp e 1Mbp, que denominados por cromossoma I (maior) e cromossoma II (menor), respectivamente (fig 2), ambos são responsáveis pela codificação de 3.855 *Open Reading Frames* (ORF's) (Hilderberg *et al.*, 2000).

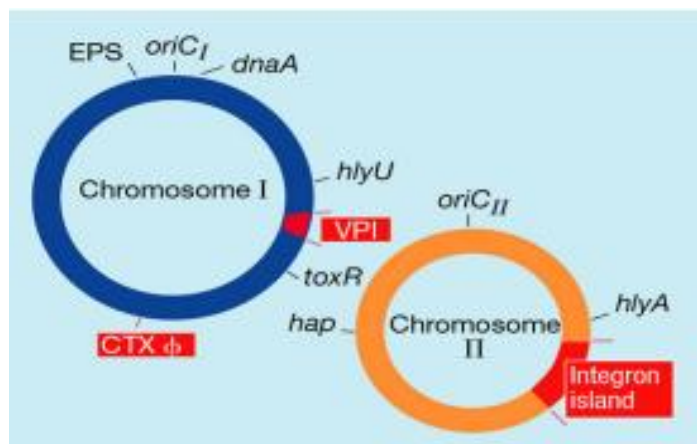
Os genes de crescimento e viabilidade bacteriana estão localizados no cromossoma I (maior), tais como genes de replicação, reparo, transcrição, tradução de DNA e os responsáveis pela biossíntese da parede celular, além disso, os locos genéticos que estão associados com a virulência: tais como ilha de patogenicidade VPI e genoma do fago filamentoso CTXΦ ou elemento CTX também se encontram no cromossoma maior (Mendes, 2007; Bahia, 2011).

A expressão dos genes de virulência depende várias proteínas reguladora para acontecer, que formam um sistema protéico regulatório formado pela ToxR e ToxT (Hilderberg *et al.*, 2000).

Também no cromossoma I encontram dois factores essenciais para a colonização do intestino que são: o pili corregulado com toxina (Toxin *corregulated pili*-CTP) e o factor acessório de colonização (*Accessory colonization fator*-ACF) (Bahia, 2011).

No cromossoma I de *V. cholerae* encontram-se o conjunto de genes *rfb* responsáveis pela codificação das enzimas necessárias a síntese do antígeno "O" do LSP da bactéria, O *rfbN* é específico para o sorogrupo O1 *V. cholerae* (ISLAM *et al.*, 1992; Fallarino *et al.*, 1997; Mendes, 2007).

Porém no cromossomo menor encontram-se alguns genes essenciais da função celular normal e outros codificam vários intermediários de vias metabólicas da bactéria, tais como genes envolvidos no transporte de açúcares, ions metálicos e anions, metabolismo, genes que codificam proteínas ribossomais e vias de transdução de sinais e no reparo de DNA, para além dos genes responsáveis pela adaptação ao habitat natural do *V. cholerae*. Porém muitos deles não têm função conhecida (Mendes, 2007; Bahia, 2011).



Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

Figura 2. Distribuição dos principais locos genéticos necessários para virulência do *V. cholerae*. **Fonte:** (Hilderberg *et al.*, 2000).

4.4.3. Factores de virulência do *V. Cholerae*

Existem múltiplos factores envolvidos na patogenicidade de *V. cholerae*, incluindo genes que codificam diferentes factores que actuam na colonização, na coordenação da expressão de diversos factores e na acção tóxica (Sack *et al.*, 2004).

Os principais factores de patogenicidade do *V. cholerae* são o Pilus Co-regulado por Toxina (TCP) ou toxin-coregulated pilus codificada pela Ilha de Patogenicidade de Vibrio (VPI) ou *Vibrio Pathogenicity Island*, codificada pelo bacteriófago CTXφ (Karaolis *et al.*, 1998), A VPI é responsável por causar a diarreia aquosa da cólera e a Toxina Colérica (CT) e o bacteriófago CTXφ serve para a adesão intestinal, a formação de biofilmes e funciona também como um receptor para o fago que transporta os genes da toxina colérica, permitindo a transmissão da toxina CT (Marin, 2013). Desse modo a VPI e o fago CTXφ são interdependentes na determinação da virulência de *V. cholerae*, com a VPI facilitando a aquisição do fago e a subsequente produção da toxina colérica que causa a doença.

A ilha de patogenicidade VPI e o fago CTXφ são constituídos por dois elementos móveis (bacteriófagos) que estão integrados ao cromossoma maior de *V. cholerae* (Heidelberg, *et al.*, 2000) e são capazes de serem transferidos horizontalmente, conferindo virulência às estirpes receptoras (Karaolis, *et al.*, 1999; Waldor & Mekalanos, 1996). A presença de quitina no ambiente por eventos de competência bacteriana, particularmente impulsiona a patogenicidade da VPI permitindo o surgimento de cepas mais virulentas.

A presença dos genes *ctxAB* e *tcpA* condicionam principalmente a patogenicidade do *V. cholerae*. Os *ctxAB* são responsáveis pela expressão das subunidades A e B da toxina colérica CT enquanto *tcpA* presentes na VPI garante a aderência e colonização do microorganismo na parede intestinal do hospedeiro (Herrington *et al.*, 1988).

Estudos têm indicado que os genes de virulência ou seus homólogos presentes nos bacteriófagos estão dispersos entre estirpes ambientais de diversos sorogrupos, constituindo assim, um

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

reservatório desses genes, o que dá suporte a hipótese de origem ambiental de *V. cholerae* patogénico (Mukhopahyay *et al.*, 1995; Chakraborty *et al.*, 2000; Daalgaard *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Boyd & Waldor, 2002; Theophilo *et al.*, 2006).

Outros factores envolvidos na patogenicidade do *V. cholerae* incluem a motilidade conferida pelo flagelo, que auxilia na navegação até o nicho intestinal; o *quorum sensing* - um sistema de comunicação entre bactérias - e a presença de elementos genéticos móveis, como ilhas de patogenicidade e plasmídeos que podem ser transferidos entre as bactérias, também são cruciais para a virulência e evolução do patógeno.

4.4.3.1. Ilha de patogenicidade em *V. cholerae*

A VPI é composta por 15 genes que compreende um segmento de 41,2 kb, que codifica o pilus TCP, o factor de colonização acessório e os reguladores da virulência ToxT e TcpH e outros genes de funções desconhecidas (Karaolis *et al.*, 1999; Marin, 2013).

Fazem parte dos TCP os seguintes genes: *tcpA*, que codifica uma proteína pilina de 20 kDa, que se assemelha com as fímbrias do tipo IV de outras bactérias; *tcpB*, codificadores da proteína estrutural menor de função desconhecida; *tcpJ*, responsável por codificar a proteína prépilina, capaz de clivar a porção amino terminal da proteína TcpA (Said *et al.*, 1995, Kumar *et al.* 2011).

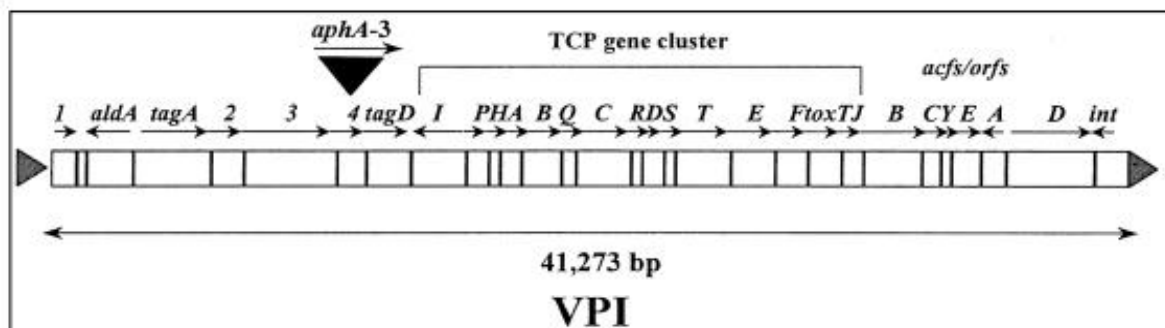


Figura 3. Esquema da Ilha de Patogenicidade de *V. cholerae*. **Legenda:** Neste esquema da Ilha de Patogenicidade de *V. cholerae* destaca-se o conjunto de genes TCP, responsável pela expressão do factor de colonização e demais genes envolvidos com a regulação. **Fonte:** (Zhang *et al.*, 2003).

O TCP (*toxin-coregulated pilus*) é responsável pela colonização do epitélio intestinal do hospedeiro, aliado a outros factores de colonização tais como o pilus MSHA (*mannose-sensitive haemagglutinin*), as proteínas regulatórias como ToxR/ToxS a ToxT, as purinas de membrana externa, os genes biossintéticos das biotina e purina, as proteínas de membrana externa reguladas pelo ferro e os factores acessórios de colonização (Thompson *et al.*, 2004; Sá, 2009).

4.4.3.2. Profago CTX ϕ

Profago CTX ϕ é um profago filamentosso de DNA de fita simples fundamental na patogenicidade do *V. cholerae* composta por dois domínios funcionais na estrutura que são, região central e RS2. A região central comporta os genes *ctxA* e *ctxB*, responsáveis pela codificação toxina colérica, que é o principal factor de virulência do *V. cholerae*, e os genes *ace* e *zot* responsáveis pela capacidade infecciosa do microorganismo (Waldor & Mekalanos, 1996). Esse bacteriófago apresenta uma região central (*core*) que é flanqueada por uma ou múltiplas cópias das sequências repetidas (Pearson *et al.*, 1993).

A molécula CT é uma enterotoxina composta que actua sobre os enterócitos através da ligação de cinco subunidades B e uma subunidade A (codificado pelo gene *ctxB* e *ctxA*) respectivamente. Sendo a subunidade B a que faz a ligação da toxina ao receptor da célula intestinal e a subunidade A é a enzima activa que actua sobre as células da mucosa intestinal gerando o desequilíbrio hidroelectrolítico gerando perda do líquido isotónico (Cariri, 2008).

A região dois comporta genes *rstA*, *rstB* e *rstR*, que são responsáveis por codificar produtos requeridos para a replicação, integração e regulação do profago, respectivamente (Waldor *et al.*, 1997).

A integração do Profago CTX ϕ ao cromossoma *V. cholerae* ocorre em uma região específica denominado *attRS* (Pearson, 1993). A interacção entre o profago CTX ϕ e RSI promove a eficiente propagação dos genes produtores da CT, aumentando a virulência e as relações evolutivas do *V. cholerae* (Cariri, 2008).

A forma lisogénica do profago CTX ϕ é mantida por uma proteína repressora fágica RstR a proteína anti-repressora *RstC* que induz a replicação e transmissão do CTX ϕ , é codificada na

RS1, na região adjacente ao seu genoma (Davis *et al.*, 2002). O RS1 e região RS2 do profago CTXφ são similares composições genéticas e na sua funcionalidade, mas o RS1 possui uma ORF adicional que não é encontrado no RS2 (Waldor, *et al.*, 1997). A quantidade de cópias de CTXφ difere entre os biotipos sendo o biotipo El Tor a que carrega uma ou mais cópias e se encontram no cromossoma maior, porém o biotipo clássico apresenta duas cópias divididas pelos dois cromossomas (Bahia., 2011).

Os diferentes profago CTX ϕ foram descritos e nomeados CTXET ϕ , derivado de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, CTXCLASS ϕ , de *V. cholerae* clássico, CTXCALC ϕ , de *V. cholerae* O139 (Davis *et al.*, 1999), CTXENV ϕ , derivado de *V. cholerae* não-O1, não-O139 (Mukhopadhyay *et al.*, 2001) e CTXVAR ϕ presente em *V. cholerae* pré-O139 El Tor (*V. cholerae* El Tor isolada antes do aparecimento de *V. cholerae* O139) (Nandi *et al.*, 2003).

O profago CTXφ pode ser encontrado dentro da célula como plasmídeo ou incorporado a um dos cromossomos do *V. cholerae*. Em condições ideais as estirpes toxigênicas do *V. cholerae* podem produzir várias partículas do Profago CTXφ (Waldor & Mekalanos, 1996; Faruque *et al.*, 1998; Cariri, 2008).

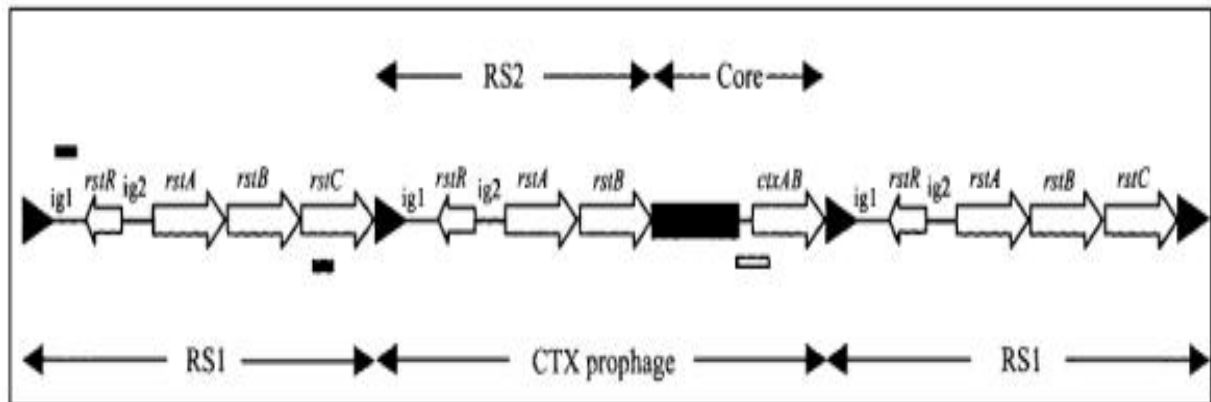


Figura 4. Esquema do profago CTX ϕ . Legenda: Esquema do profago CTX ϕ evidenciando a região central e a região RS2, flanqueado pelo elemento RS1. **Fonte:** (Nandi *et al.*, 2003).

4.5. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos do *V. cholerae*

A resistência é um fenómeno já conhecido desde a antiguidade. No início era reconhecida como uma curiosidade científica mas passou a ser vista como uma ameaça à eficácia do tratamento. O desenvolvimento de novas famílias de antimicrobianos nas décadas de 1950 e 1960 e as modificações dessas moléculas nas décadas de 1960 a 1980 nos levou a acreditar que sempre poderíamos combater os agentes patogénicos. A geração de medicamentos novos está a esgotar-se e são poucos os incentivos para elaborar novos antimicrobianos que permitam combater os problemas mundiais da farmacoresistência (OMS, 2001).

Muitas espécies de bactérias Gram-negativas pertencentes ao filo Proteobacteria que estão associadas a muitos problemas de saúde, incluindo diarreia, infecções do trato urinário, infecções do trato respiratório, pneumonia e sepse, emergiram como patógenos MDR e PDR potencialmente fatais. A maioria dos isolados é resistente a vários antibióticos b-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, SXT, polimixinas e macrolídeos usados rotineiramente na prática clínica para tratar patógenos Gram-negativos (Bhabatosh das et al., 2020). O *V. cholerae* e outras bactérias podem adquirir resistência antimicrobiana através de vários mecanismos sendo as mais comuns as seguintes:

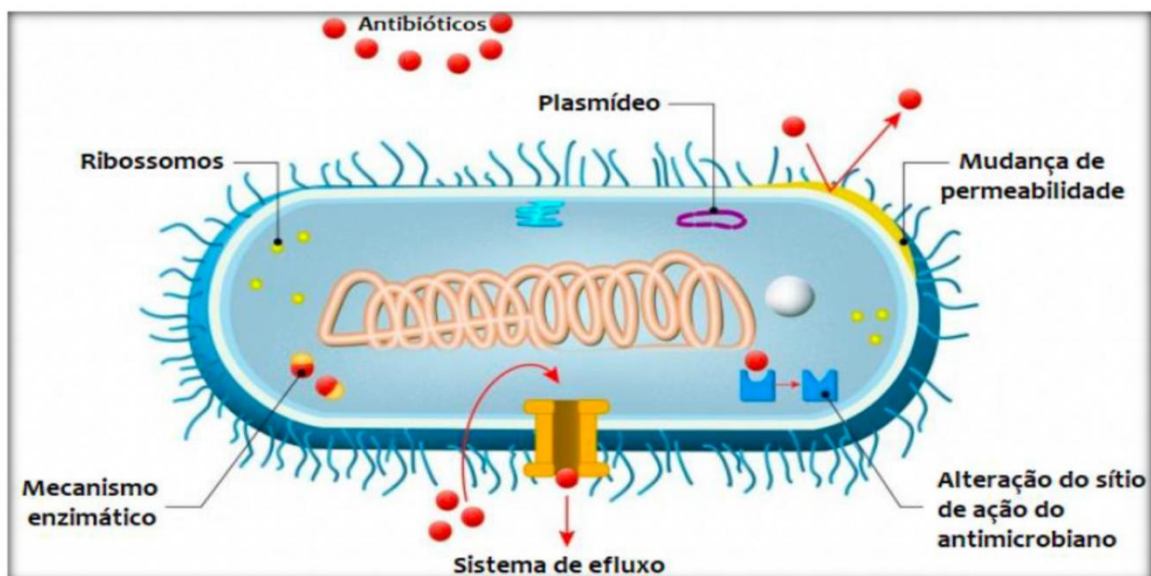


Figura 5. Esquema dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. **Fonte:** (Neto, 2021).

4.5.1. Modificação do local alvo do antibiótico

Este mecanismo ocorre quando as mutações pontuais no gene que codifica o alvo sofrem alterações na composição da molécula-alvo e consequentemente o ambiente de interação antibiótico-alvo é alterado resultando na redução da eficácia do antibiótico (Andersson, 2010). Sendo que as interações físico-químicas são factores cruciais para as actividades dos antimicrobianos, as modificações na estrutura do local-alvo dessas drogas podem resultar na diminuição ou mesmo a ausência de afinidade entre o antimicrobiano e seu alvo e consequentemente ocorrer a neutralização da acção antimicrobiana e sendo assim as bactérias não sofrem nenhum dano tornando-se assim resistentes (Rodrigues *et al.*, 2017).

A alteração dos locais-alvo dos antibióticos é um mecanismo comum de resistência, sendo muito relatado em estirpes clínicas de bactérias que apresentam resistência para todas as classes de antibióticos, independentemente do mecanismo de acção (Andersson, 2010).

Os antibióticos têm alta afinidade com os seus alvos interrompendo as funções celulares vitais da bactéria. Esta afinidade resulta da interacção específica entre o antibiótico e seu alvo, sendo condicionada pela natureza química de resíduos específicos da molécula-alvo. As mutações pontuais no gene codificador do alvo alteram a composição da molécula alvo e, portanto, alteram o ambiente de interações antibiótico-alvo e reduzem a eficiência do antibiótico (McGrath *et al.*, 2014). Estas alterações nos locais-alvo resultam frequentemente da mutação espontânea de um gene bacteriano no cromossoma e da seleção na presença do antibiótico. O *V. cholerae* apresenta vários mecanismos de resistência associados a modificação estrutural no gene, que se caracterizam pela inibição (i) a replicação e reparo do DNA afectando as funções dos genes *parC* e *gyrB* (resistência às quinolonas), (ii) transcrição afectando a proteína codificada *rpoB* (rifampicina), (iii) síntese de proteínas afectando *rpsL* função génica (estreptomicina) (iv) biossíntese da parede celular afectando a função do gene *pbp* (β -lactâmico) e (v) várias enzimas metabólicas afectando as funções *katG*, *embB*, *mshA* (SXT) (Hooper, 2001 & Bhabatosh *et al.*, 2020).

4.5.2. Resistência devido à redução da permeabilidade ou ejeção activa de antibióticos

Este mecanismo consiste na redução da permeabilidade da membrana aos compostos químicos, impedindo a entrada de vários antibióticos no citoplasma, onde se situam principalmente os locais-alvo dos medicamentos sendo um importante mecanismo de defesa das bactérias que promove a resistência bacteriana (Darley *et al.*, 2012).

O *V. cholerae* e outras bactérias entéricas apresentam na sua parede celular a lipopolissacarídeo que actua como uma forte barreira de permeabilidade, o que confere a estas bactérias uma resistência antimicrobiana a diversos fármacos, tais como a polimixina B, eritromicina, azitromicina e a rifamicina. Entretanto algumas das alterações que ocorrem ao nível da parede celular bacteriana tais como, a modificação da barreira lipídica da membrana e alteração no padrão de expressão das porinas podem influenciar na diminuição da permeabilidade aos antimicrobianos (Bhabatosh *et al.*, 2019). Outro factor que influencia na redução da permeabilidade dos antimicrobianos gerando resistência e a redução, perda ou substituição de proteínas do canal da membrana externa (purinas), o que confere ao *V. cholerae* e outras e bactérias Gram negativas a resistência aos Carbapenemes, tetraciclina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e cloranfenicol (Darley *et al.*, 2012).

4.5.3. Bomba de efluxo

As bombas de efluxo têm um papel importante na evolução da resistência antimicrobiana das bactérias. As proteínas presentes na membrana bacteriana, chamadas de bombas de efluxo, movem activamente impulsionando o material intrínseco incluindo os antimicrobianos para fora da célula, gerando resistência antimicrobiana (Masooma *et al.*, 2024)

A bomba de efluxo em bactérias Gram negativas apresenta duas categorias, determinadas por componentes a transportar que são: transportadores de componente único ou transportadores multicomponentes. Quanto ao termo de reconhecimento do substrato as bombas podem apresentar maior especificidade, como a bomba de efluxo de tetraciclina ou de menor especificidade com capacidade de exportar variedade de composto com estruturas diferentes (Bhabatosh *et al.*, 2019). Segundo Kumar & Varela (2012) e Kumar *et al.* (2013), no *V.*

cholerae e outras espécies bacterianas foram descritos seis classes de proteínas de efluxo de fármacos que são:

- **Proteína de efluxo da cassette de ligação ao (ATP):** esta caracteriza-se pela capacidade de reconhecer e bombear b-lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, ácido nalidíxico, tetraciclinas e antibióticos SXT para fora da célula. esta capacidade resulta da presença no genoma de N16961 de quatro loci codificadores de transportadores ABC.
- **Proteína de efluxo de resistência-nodulação-divisão celular (RND):** esta caracteriza-se por uma remoção selectiva de antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina. O *V. cholerae* estirpe N16961 apresenta seis loci codificadores de RND nos Ch1 (cinco) e Ch2 (um) do gene N16961. As bombas RND no *V. cholerae* conferem a capacidade de resistência a vários antibióticos.
- **Proteína efluxo facilitador principal (MFS):** está presente no *V. cholerae* e em várias bactérias gram-negativas patogénicas como *E. coli* e *Salmonella*. No genoma de N16961, foram identificadas onze loci que codificam proteínas de bomba de efluxo MFS.
- **Pequena família de resistência a múltiplos fármacos (SMR):** foi identificado um locus no genoma de N16961 que codifica proteínas de bomba de efluxo da família SMR.
- **As famílias de extrusão de múltiplos fármacos e compostos tóxicos (MATE):** podem conferir resistência contra múltiplos compostos antimicrobianos derivados de b-lactamas, macrolídeos, aminoglicosídeos, ácido nalidíxico, *scaffolds* de cloranfenicol SXT. O genoma do N16961 possui seis loci codificantes do transportador MATE.
- **Família de efluxo de compostos antibacterianos proteobacterianos (PACE)-** conferem resistência através da membrana transportadora que usa o gradiente de protões (H⁺) para expulsar compostos.

4.5.4. Inativação do antibiótico por hidrólise ou modificação química

Este mecanismo de resistência antimicrobiana é caracterizado pela expressão de enzimas capazes de criar modificações na estrutura do antimicrobiano fazendo perder sua funcionalidade, as proteínas são capazes de hidrolisar o anel dos fármacos beta-lactâmicos (Tafur *et al.*, 2008).

A inativação de antibióticos b-lactâmicos por b-lactamases no *V. cholerae* e outras Proteobacteria é o mecanismo de resistência aos antibióticos mais bem estudado (Aleksun & Levy, 2007). O anel b-lactâmico é comum entre todos. A hidrólise do anel b-lactâmico pela acção da metalo-b-lactamase confere resistência antimicrobiana para a maior parte das bactérias (De Pascale & Wright, 2010).

A enzima b-lactamase hidrolisa o anel b-lactâmico dos antibióticos gerando a inativação do antibiótico b-lactamase. As b-lactamases formam um complexo intermediário através de ligações covalente enzima-b-lactâmico através de resíduo Ser do sítio activo resultando na formação acilo-enzima. A hidrólise da estrutura do intermediário acilo-enzima ocorre de forma rápida nas b-lactamases resultando na inativação efectiva dos antibióticos no periplasma e no citoplasma das bactérias resistentes (Bhabatosh *et al.*, 2019).

No *V. cholerae* e em outras proteobactérias a resistência antimicrobiana causada por modificação enzimática da estrutura do antibiótico através da transferência covalente de grupos químicos é das mais relatadas. Foram identificadas milhares de enzimas que actuam na modificação de antibióticos gerando resistência antimicrobiana. A inativação dos antibióticos pode acontecer das seguintes formas: (i) O-fosforilação, onde ocorre a transferência do grupo fosfato para o andaime do antibiótico a partir de ATP ou GTP. A resistência a antibióticos como fosfomicina, clorafenicol, viomicina, macrolídeo e rifampicina é associada à fosforilação; (ii) O-nucleotidililação, ocorre quando o antibiótico transfere monofosfato de adenosina (AMP), esta modificação confere resistência a antibióticos como aminoglicosídeos e lincosamidas; (iii) O-glicosilação, consiste na cedência de fracção glicosil ao macrolídeo e antibióticos rifampicina; (iv) O-ribosilação, inativação da rifampicina pela adição de ADP-ribose a partir de NAD; (v) N-acetilação, AMR devido a transferência de um grupo acetil para o antibiótico a partir do acetilCoA.

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

A resistência antimicrobiana em *V. cholerae* ocorre principalmente devido à aquisição de genes de resistência de espécies microbianas próximas ou distantes através da transferência horizontal de genes (Bhabatosh das *et al.*, 2020). Porém as mutações espontâneas na ORF alvo ou numa sequência da sua região reguladora pode conferir resistência através da inibição da ligação ao antibiótico ou da produção excessiva de moléculas alvo (McGrath *et al.*, 2014).

4.5.5. Importância da transferência génica horizontal do *V. cholerae*

A transferência horizontal de genes entre procariotes é um fenómeno comum e de extrema importância na evolução bacteriana podendo ocorrer de quatro formas, transformação, transdução, conjugação e ainda por transposição (Tafur *et al.*, 2008).

Esta interacção entre estirpes patogénicas e não patogénicas é responsável por conferir artifícios toxigénicos por processo de conjugação bacteriana (Chiang & Mekalanos 1999; Jain *et al.*, 2002; Sá, 2009).

A transferência horizontal de genes contribui para algumas características importantes de *Vibrio*, tais como patogenicidade e exploração de nichos ecológicos (Boyd *et al.*, 2000; Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Rowe-Magnus *et al.*, 2002).

Um estudo de Farruque *et al.* (1997), evidencia que as estirpes não toxigénicas podem se converter em toxigénicas através da transcrição de fago com toxina colérica quando entra em contacto com um ambiente gastrointestinal. E a sua mutação pode ser influenciada pelos factores ambientais, salinidade, pH, temperatura, resistência do hospedeiro conferindo ferramentas toxigénicas ao organismo (Chowdhury *et al.*, 2017).

O *V. cholerae* é composto por diferentes linhagens e biotipos que são receptores e doadores de genes de virulência, factores de colonização, genes de resistência antibiótica, polissacarídeos capsular e novos antígenos de superfície (lipopolissacarídeos O139 e antígeno O1) (Sá, 2009).

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

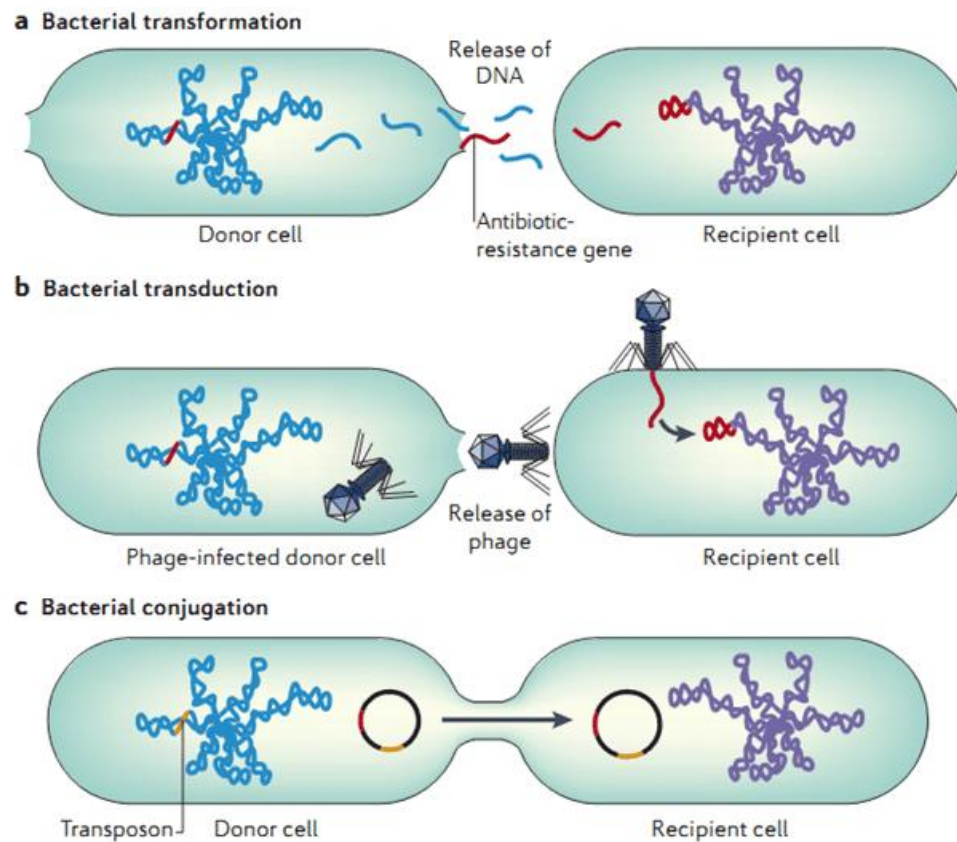


Figura 6. Esquema dos mecanismos de resistência bacteriana adquirida por transferência horizontal de genes. Legenda: a) transformação, b) transdução e c) conjugação. **Fonte:** (Baptista, 2013)

4.6. Genes de Resistência aos antibióticos

4.6.1. Elementos integrativos e conjugativos

Os elementos integrativos e conjugativos (Integrative and Conjugative Element – ICE) da família dos SXT/R391 são móveis auto-transmissíveis, envolvidos entre outros aspectos, na dispersão de genes de resistência a antibióticos entre gama-proteobactérias, incluindo *V. cholerae*. O elemento SXT foi identificado pela primeira vez em 1992 num isolado clínico de *V. cholerae* O139; este elemento carregava genes de resistência para sulfametoxazol, trimetoprima e estreptomicina (Waldor & Mekalanos, 1996; Marin, 2013).

Mais de 50 elementos de ICEs pertencentes a família SXT/R391 conhecidos e são compostos por 79 a 108 Kb e se caracterizam por seu gene da integrase, *intSXT*, altamente conservado (Wozniak et al. 2009). A integrase é responsável pela integração do ICE no extremo 5' do gene

prfC, e apresentar uma região core de 52 genes presentes em todos os ICE SXT/R391 a qual é requerida para a excisão/integração, a transferência conjugativa e a regulação deste elemento (Marin, 2013).

Os ICE também apresentam a região variável III onde se encontram os genes de resistência para sulfametoxazol (*sul2*), trimetoprima (*dhfrA1*) e estreptomicina (*strAB*). Este elemento também apresenta cinco regiões conjugativas conhecidas como hotspots3 (HS) para a integração de DNA exógeno o qual dá características específicas a seu hospedeiro bacteriano (Burrus *et al.*, 2006; Wozniak *et al.*, 2009).

Os ICEs a semelhança dos plasmídeos a sua transferência é por conjugação tal como os fagos, estes elementos integram-se no cromossoma do hospedeiro e replicam-se passivamente, explorando mecanismos de replicação cromossômica. Os ICEs cruciais para o surgimento de multirresistentes *V. cholerae* (Waldor *et al.*, 1996 e Burrus & Waldor, 2003).

4.6.2. Integrans

Os integrans são elementos genéticos diferentes com capacidade de inserir e expressar genes usando o sistema de recombinação sítio-específico, são estrutura não móveis, porém podem associar a transposons e/ou plasmídeos conjugativos que actua como veículos de transmissão intra e inter- específicas de material genético (Sá, 2009).

O integron é constituído por três elementos, o gene codificador da intagrese (*intI*), um sítio de recombinação (*attI*) e uma região promotora. os integrans são divididas em dois grupos: os integrans de resistência (RI, *resistence integrans*) e os superintegrans (SI). os RI que se localizam nos plasmídeos ou nos transposons carregam os genes cassetes que codificam para resistência antibiótica (Fluit & Schmitz, 2004).

Os genes cassetes são elementos móveis constituídos por sequência que codifica (um gene funcional ou ORF) e uma sequência de recombinação (sítio *attC*). Esses genes podem ser inseridos nos integrans forma independente, através das enzimas integrases presentes nos mesmo (Sa, 2009). Os arranjos de genes cassetes na região variável dos integrans podem ser

alterados pela excisão ou re-inserção de cassetes individuais ou ainda pela introdução precisa de novos genes cassetes (collis *et al.*, 1993).

Existem várias classes de integrons já identificadas, porém os mais detectados são os integrons de resistência (RI) ou de multirresistência (MRI) que fazem parte da classe 1, 2, 3 (Rowe-Magnus & Mazel, 2001). Os integrons da classe 1 são mais encontrados em plasmídeos conjugativos ou associada com a família de transposon Tn 21 favorecendo a dispersão dos genes cassete e são os mais comuns em casos de resistência antibiótica em isolados clínicos (Hall, 1997; Girlich *et al.*, 2001; Fluit & Schmitz, 2004).

O integrons de classe 1 foram identificados em isolados clínicos *V. cholerae* de diferentes partes do mundo e também em isolados clínicos e ambientes de várias espécies bacterianas (Dalsgarard *et al.*, 1999; Falbo *et al.*, 1999; Dalsgarard *et al.*, 2000; Sa, 2009).

Os integrons de classe estão associados a transposons da família do Tn7 que são carreadores de três genes de resistência: trimetropina (*dfrA1*), streptotricina (*sat1*) e estreptomicina/espectinomicina (*aadA1*) (Hansson *et al.*, 2002; Opintan *et al.*, 2008). O Tn7 é o transposon mais encontrado em bactérias entéricas e está integrado aos plasmídeos conjugativos ou ao genoma bacteriano em um sítio de ligação específica entre os genes *pstS* and *glmS* do *V. cholerae* (Opintan *et al.*, 2008).

4.6.3. Plasmídeos de resistência

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos, proficientes na replicação autónoma, amplamente atribuídos à HGT e são actores-chave na evolução microbiana. Tem a capacidade de mover-se de uma célula para outra através da chamada transferência horizontal de genes (Bennett, 2007).

Os plasmídeos foram relatados como elementos importantes na resistência antimicrobiana e na virulência do *V. cholerae* muito antes dos ICEs e dos Integrons e sua presença nos isolados clínicos e ambientais de *V. cholerae* serogrupos epidémicos O1, O139 e também nos isolados não epidémicos não O1 e não O139 desde os anos de 1960 (Amaro *et al.*, 1988 e Hedges *et al.*, 1995).

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

No *V. cholerae* os plasmídeos reportados são muito diferentes em termos de tamanho, variando de (4 a 200 kb), transmissibilidade (conjugativo, não conjugativo) e nos mecanismos biológicos de *V. cholerae* (aquisição de toxinas, virulência, adesão, partição cromossômica, resolução de dímeros, resistência a antibióticos e metais pesados). No *V. cholerae* e outros agentes patogénicos entéricos, um único plasmídeo pode ser responsável pela resistência a mais de 6 antimicrobianos diferentes (ampicilina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol e SXT) (Ceccarelli, 2006; Carattoli, 2013).

5. METODOLOGIA

5.1. Tipo de Estudo

O presente estudo é observacional transversal prospectivo em que foram colhidas amostras de água durante 7 dias em Maio de 2023 em locais que foram recentemente afectados pelo ciclone Idai, ocorrido na província de Sofala (província costeira no Centro de Moçambique), em 2019 que resultou num surto de cólera.

5.2. Área de estudo

A selecção dos locais do estudo foi por conveniência, tendo sido incluídos para análise as áreas de ocorrência de surtos de cólera após o ciclone Idai e a existência de fontes de água como poços e valas de drenagens como critérios de selecção das amostras. Sendo assim, foram considerados 3 locais nomeadamente os Municípios da Beira, de Dondo e distrito de Mapa com

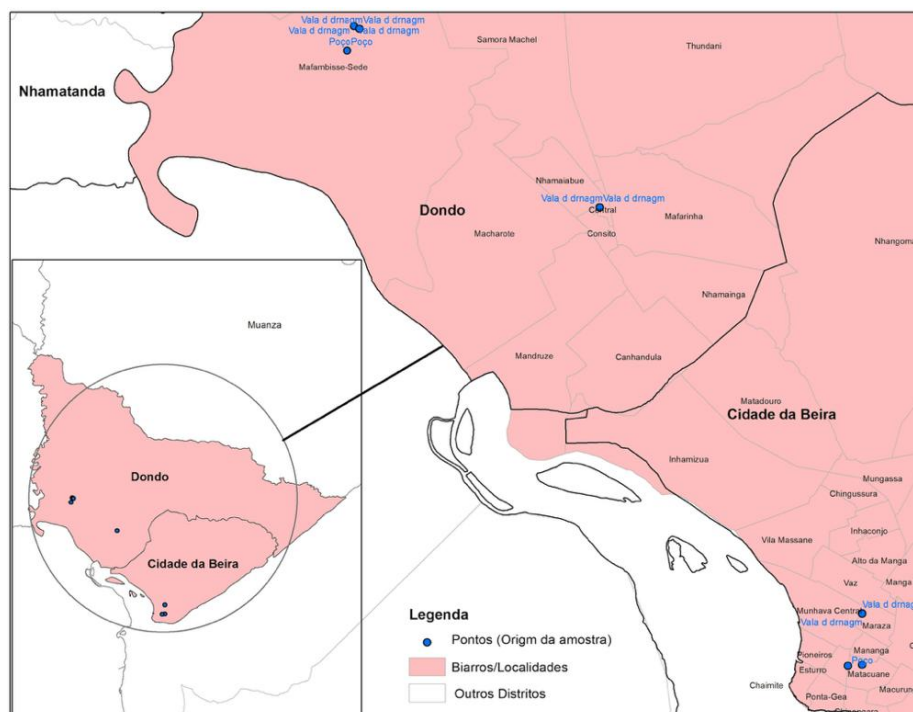


Figura 7. Mapa dos pontos de amostragem na província de Sofala nos Municípios da Beira e Dondo e no distrito de Nhamatanda. **Fonte:** (Autor, 2023)

Figura 7. Mapa com os pontos de amostragem na província de Sofala nos Municípios da Beira, Dondo e no distrito de Nhamatanda

Na figura 7, pode-se observar os 13 locais exactos da amostragem, sendo que no Município da Beira foi realizada a colheita de amostras nos bairros da Munhava, Munhava Matope e Esturo, no Município de Dondo foram colhidas nos bairros Eduardo Mondlane, Munhonha e Cimento e no Posto administrativo de Mafambisse e no distrito de Nhamatanda nos 4º, 5º, 7º e 11º bairros, listados na tabela 1.

Tabela 1: Localização e Fontes de contaminação de água dos locais de Amostragem

Bairro	Município / Distrito	Latitude	Longitude	Origem da amostra	Fontes de contaminação das águas próximo
Eduardo Mondlane - Posto Admin. Mafambisse	Dondo	S 19.54255	E 34.62406	Poço 1	Lixo, latrinas, fezes, ventos, destilação de álcool
Eduardo Mondlane - Posto Admin. Mafambisse	Dondo	S 19.53106	E 34.62719	Vala de drenagem 1	Lixo, machambas, piscicultura
Munhonha - Posto Admin. Mafambisse	Dondo	S 19.53233	E 34.62967	Vala de drenagem 2	Lixo, combustível, fezes e lençol de água
Cimento – Vila Sede	Dondo	S 19.61530	E 34.74117	Vala de drenagem	Lixo, excrementos, ventos
Munhava	Beira	S 19.80379	E 34.86297	Vala de drenagem 1	Lixo, latrinas e combustíveis
Esturo	Beira	S 19.82770	E 34.86297	Vala de drenagem 2	Lixo, latrinas, excremento, pesca
Esturo	Beira	S 19.82820	E 34.85648	Poço 1	Latrinas, ventos, lençol freático
Munhava	Beira	S 19.80379	E 34.86297	Bacia	Lixo, latrinas, fezes, combustíveis e excrementos
Munhava Matope	Beira	INR	INR	ETAR	Latrinas, ventos, lençol freático, combustíveis
7º Bairro	Nhamatanda	INR	INR	Rio Metuchira	Fezes, lixo, ventos,
4º Bairro	Nhamatanda	INR	INR	Poço 1	Latrinas, ventos, lençol freático

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

5º Bairro	Nhamatanda	INR	INR	Poço 2	Latrinas, ventos, lençol freático
11º Bairro	Nhamatanda	INR	INR	Poço 3	Latrinas, ventos, lençol freático

INR: Informação não recolhida

5.3. Plano experimental e etapas da pesquisa

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Saúde Pública de Sofala - INS (LSPS-INS), Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do CB-UEM (vide figura 8) e no Laboratório de Genómica de Microorganismos e Bioinformática, Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita na Universidade de Génova na Itália (LGMB-UG). No LSPB-INS foi realizado o processamento inicial microbiológico que consistiu na filtração das amostras, enriquecimento em APA e isolamento das bactérias em meio *thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS). Nos laboratórios do CB-UEM foram realizados os testes bioquímicos dos isolados, testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e identificação molecular. No Laboratório na Itália foi realizada a confirmação da testagem molecular e o sequenciamento.

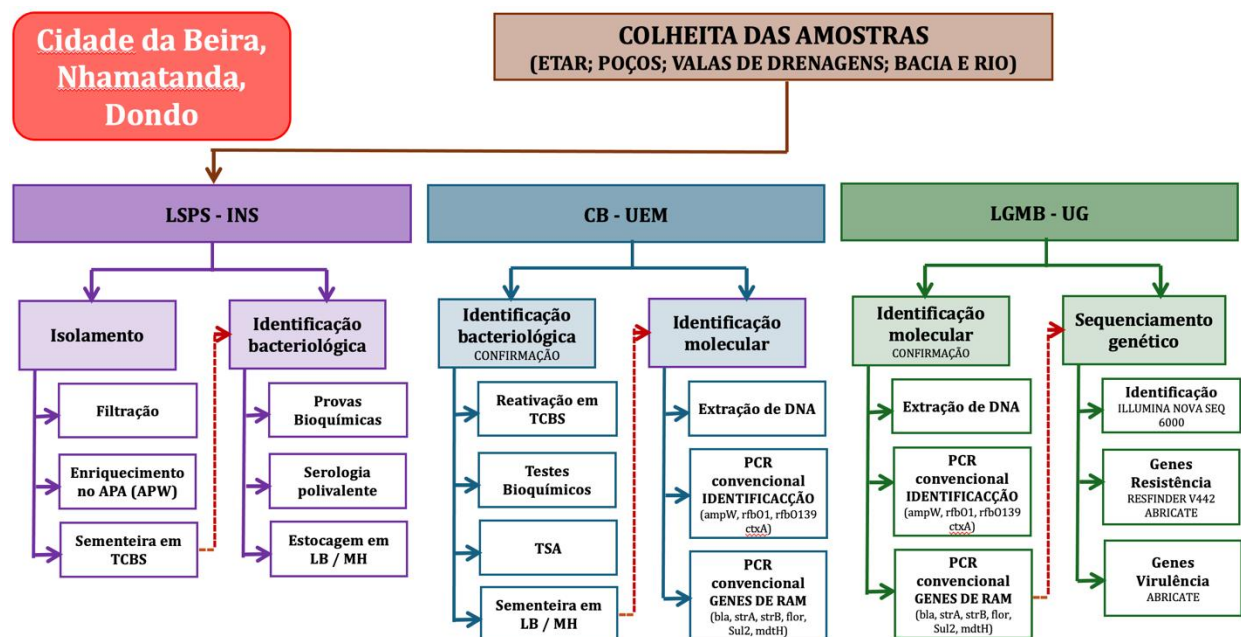


Figura 8. Plano Experimental e Etapas da Pesquisa. Legenda: LSPB-INS: Laboratório de Saúde Pública da Sofala do Instituto Nacional de Saúde; APA: Água Peptonada Alcalina; LB: Luria Bertani Ágar; MH: Mueller Hinton; CB-UEM: Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane; TCBS: PCR:

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

Reacção de Cadeia de Polimerase; (LGMB-UG): Laboratório de Genómica de Microorganismos e Bioinformática. **Fonte:** (Autor, 2026)

5.4. Amostragem

Setenta e sete (77) amostras de água foram colhidas em sacos plásticos estéreis Nasco Whirl-Pak® de 500 ml e foi adicionado tiosulfato para garantir a viabilidade das mesmas para o processamento laboratorial. A amostragem foi feita em 13 pontos dentre estação de tratamento de águas residuais (ETAR), valas de drenagem, rio e poços distribuídos pelas áreas listadas na tabela 1 e na figura 7. Foi feita apenas uma amostragem em cada ponto no período comum de ocorrência de surtos de cólera em Maio de 2023.

As amostras foram transportadas imediatamente em caixas térmicas com gelo para o laboratório LSPS-INS para o processamento inicial, sendo que os isolados foram transportados para o laboratório do CB-UEM para as análises subsequentes conforme descrito na figura 7.



Figura 9. Locais de Amostragem de Água. **Legenda:** a) Rio Metuchira; b) Vala de drenagem da cidade da Beira; c) Poço de água em Mafambisse; d) ETAR da cidade da Beira. **Fonte:** (Autor, 2023)

No total foram colhidas 77 amostras de água, das quais 45 de valas de drenagem, 24 de poços, 6 da ETAR da cidade da Beira e 2 amostras provenientes do rio Metuchira, como descrito na tabela 4. Na Vila de Dondo não foi colhida nenhuma amostra de água de poços e não foram encontradas valas de drenagem em Nhamatanda.

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endémicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

Tabela 2. Distribuição das amostras colhidas por distrito e por pontos de amostragem

Local de Amostragem	Valas de Drenagem	Poços	ETAR	Rio
CIDADE DA BEIRA	20	8	6	N/A
DONDO				
Vila de Dondo	8	NR	N/A	N/A
Mafambisse	17	7	N/A	N/A
NHAMATANDA	N/A	9	N/A	2
Total	45	24	6	2

Legenda: ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais; NR – Não Realizado; N/A – Não aplicável

5.5. Testagem Microbiológica

5.5.1. Isolamento e Identificação

A nível laboratorial as amostras foram filtradas em 2 volumes (500ml cada) onde um filtro foi conservado em etanol absoluto para análise metagenómica e outro filtro foi enriquecido em Água Peptonada Alcalina (APA) e incubado a 36.5 ± 0.5 °C durante 24h. Após a incubação, as amostras foram semeadas em meio de cultura ágar TCBS. As amostras com crescimento de colónias suspeitas de *V. cholerae* em TCBS foram sub-cultivadas em ágar Müeller Hinton e incubadas por 24h. De seguida, foram realizados os testes de oxidase e sorologia para sorotipos O1 e O139. Todas as amostras com colónias suspeitas e as confirmadas através de testes sorológicos para *V. cholerae* O1 foram estocadas em *duplicata* e referenciadas para o Laboratório do CB-UEM em Maputo para a realização dos testes bioquímicos: *Kliger Iron Agar* (KIA), *Simmons Citrate Agar*, *Ureia Agar base*, *Sulphate Indol Motility* (SIM) para confirmação e de testes de susceptibilidade antimicrobiana (TSA), assim como a confirmação molecular através de PCR convencional.

5.5.2. Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana

O TSA foi realizado de acordo com as Normas CLSI 2019, em que numa cabine de biossegurança, foi realizada a reactivação dos isolados seleccionados e uma suspensão em soro fisiológico a 0.5 na escala de McFarland. Com auxílio de uma zaragatoa de algodão, realizou-se a sementeira usando a técnica de lençol (estrias) por toda a superfície da placa de petri de 90 mm com ágar Müeller Hinton. Em cada placa devidamente identificadas, foram fixados os discos de antibióticos (clorafenicol 30ug, gentamicina 10ug, ciprofloxacina 5ug, meropenem 10ug e cefotaxime 30ug), com auxílio de uma pinça esterilizada na chama de uma lamparina. As placas foram de seguida seladas com papel de filtro para evitar a contaminação e incubadas em uma estufa bacteriológica 35°C +/- 2°C num período de 24h.

5.6. Identificação Molecular

5.6.1. Extracção de DNA e Detecção de *V. cholerae*

O DNA genómico foi obtido a partir de colónias isoladas com características morfológicas de *V. cholerae* usando o kit da Roche High Pure PCR Template Preparation Kit® seguindo as instruções do fabricante. Para amostras com uma concentração de DNA menor ou igual a 10 ng/µl, foi efectuada uma segunda extracção de DNA através do kit DNeasy Blood and Tissue Kit® seguindo as instruções do fabricante.

5.6.1.1. Quantificação de DNA

A Quantificação de DNA foi realizada por NanoDrop® One microvolume UV-Vis Spectrophotometer. As concentrações e purezas de DNA foram estimadas através de análise espectrofotométrica em comprimento de onda ultravioleta (a 260nm/280nm), como preconizado por (Sambrook *et al.*, 1989) citado por (Souza, 2016).

5.6.2. Descrição dos PCRs Convencionais de detecção de *V. cholerae* e de identificação dos genes de resistência a antibióticos

A detecção de *V. cholerae* foi efectuada por PCR convencional, usando os marcadores moleculares *ompW*, *ctxA*, *rfbO1* e *rfbO139* descritos por Tirapattanam *et al.*, (2015) (Tabela 2). A detecção de genes de resistência foi efectuada usando um PCR convencional, tendo como alvos os marcadores moleculares de resistência *bla*, *strA*, *strB*, *floR*, *sul2*, de acordo com Dallene *et al.*, (2010) citado por Rosa (2015).

Tabela 3. Descrição dos primers para a identificação de *V. cholerae* e de resistência a antibióticos

Primers	Sequência de Primers (5' > 3')	Tamanho do produto (bp)	Ref.	Descrição do Gene
	Primers de Identificação do <i>V. cholerae</i>			
ompW-F	GTACTTGCAGCCCTAAGCT	307	Tirapattanam et al., 2015	<i>outer membrane protein species specific gene</i>
ompW-R	GGACCATAAAGGTAGGTGGC			
ctxA-F	TGGTCTTATGCCAAGAGGACA	517		<i>cholera toxin gene</i>
ctxA-R	ATCTTGAGCATTCCCACAAC			
rfbO1- F	TAATTCATCTTGGCGTGGAG	171		<i>O1 serogroup identification gene</i>
rfbO1 -R	CCCCGAAAACCTAATGTGAG			
rfbO139 -F	AGCCTCTTTATTACGGGTGG	449		<i>O139 serogroup identification gene</i>
rfbO139 -R	GTCAAACCCGATCGTAAAGG			
	Primers de resistência antimicrobiana			
<i>Sul2-F</i>	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293	Dallene et al., 2010	<i>sulfonamide resistance gene</i>
<i>Sul2-R</i>	GCGTTTGATACCGGCACCCGT			
strA-strB-F	TGCTGAATCGCATTCTGACTG	1607	Kerm et al., 2022	<i>streptomycin resistant genes</i>
strA-strB-R	GTCTGTGCGACCTGCTTGATC			
<i>floR</i>	CACGTTGAGCCTCTATAT	868	Antune, Machado Peixe, 2006	<i>florfenicol resistance gene</i>
<i>floR</i>	ATGCAGAAGTAGAACGCG			
<i>Bla_{KPC}-F</i>	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	Bradford et al., 2004	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemases enzyme</i>
BlaKPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC			
cat1-F	GGCATTTCAGTCAGTTG	584	Daniela et al., 2006	<i>cloranfenicol acetiltransferase</i>
cat1-R	CCGCCCTGCCACTCATC			
tetG-F	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	468		<i>tetracycline resistance gene</i>
tetG-R	AGCAACAGAATCGGGAACAC			
dfrA-F	CGAAGAATGGAGTTATCGGG	372		<i>trimethoprim resistance gene</i>

dfA-R	TGCTGGGGATTTTCAGGAAAG			
-------	-----------------------	--	--	--

Fonte: Autor 2025

5.6.3. PCR para detecção de genes de *Vibrio cholerae*

A amplificação foi efectuada numa reacção com o volume final de 20µl contendo 10 µl de 2X Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo scientific, USA), 0.2 µM de primers ompW e rfbO139 e 7 µl de DNA (100ng). O real time PCR duplex de SYBR green foi efectuado numa reacção com o volume final de 20µl contendo 12.5 µl de 2X Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo scientific, USA), 0.2 µM de primers rfbO1 e 0.8 µM de primers ctxA e 7 µl de DNA (100ng). A amplificação foi realizada usando o termociclador em tempo real da ABI 7500 Fast (Applied Biosystems). Os valores de Ct foram determinados usando o seguinte programa: 2 min a 50°C; 10 min a 95°C; e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 32 segundos. O limite de detecção foi determinado usando Ct. O Ct > 33 foi considerado negativo para o gene ompW e o Ct > 32 foi considerado negativo para o gene rfbO139 e para o duplex de genes ctxA, rfbO1 (Tirapattanam *et al.*, 2015).

5.7. Sequenciamento genómico (WGS)

Para o sequenciamentos genómico foram submetidos dezanove isolados dos vinte e seis com características de *V. cholerae* O1 confirmados por testes sorológicos e por PCR usando os sistemas Illumina e NanoPore.

O DNA genómico foi quantificado usando o NanoDrop. A qualidade geral do DNA foi verificada por electroforese em gel. As livrarias para sequenciamento Illumina foram preparadas usando o kit Novogene NGS DNA Library Prep Set (Cat No.PT004). O DNA genómico foi cortado aleatoriamente em fragmentos curtos. Os fragmentos obtidos foram reparados nas extremidades e posteriormente ligados com adaptadores Illumina. Os fragmentos com adaptadores foram seleccionados por tamanho, amplificados por PCR e purificados. A biblioteca foi verificada com Qubit e RT-PCR para quantificação e Agilent Bioanalyzer para detecção de distribuição de tamanho dos fragmentos. As bibliotecas quantificadas foram

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

agrupadas e sequenciadas na plataforma Illumina NovaSeq 6000, de acordo com a concentração efectiva e a quantidade de dados necessária.

As *reads* sequenciadas (raw reads) foram filtradas (remoção de *reads* contendo adaptadores, com N> 10% ou contendo base de baixa qualidade (Qscore <= 5)) para obter as *clean reads*.

Adicionalmente, três isolados (VC1, VC9, VC62) foram escolhidos aleatoriamente para sequenciamento combinando a tecnologia Illumina de *short reads* com o sequenciamento MinION de *long reads* em um dispositivo de sequenciamento MinION (Oxford Nanopore Technologies) usando o kit de sequenciamento de DNA genómico unidimensional (1D) SQK-LSK109 de acordo com as instruções da Oxford Nanopore Technologies.

As *short reads* dos isolados sequenciados apenas com Illumina foram assembladas *de novo* com o software Spades (v.3.15.5) (Prjibelski et al., 2020). Para os três isolados também submetidos ao sequenciamento de *long reads* da ONT, o genoma foi assemblado *de novo* combinando Spades (v.3.15.5) com parâmetro –nanopore e com o software Flye (v. 2.9.3). A anotação foi realizada utilizando o servidor RAST (<https://rast.nmpdr.org/>).

O sequenciamento das 19 amostras com a plataforma Illumina NovaSeq 600 gerou 40 GB de dados com uma média de 9.986.000 *raw reads* por amostra com índice de qualidade QPhred>30.

Após o sequenciamento, as sequências foram submetidas a FastQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) para controlo de qualidade e a limpeza usando o programa fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>).

5.8. Análise de Multi Locus Sequence Typing (MLST)

As sequências obtidas do sequenciamento, foram submetidas ao programa MLST (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>) para análise de MLST. Este método é baseado na comparação da sequência genética de sete genes conservados com uma base de dados global. O conjunto de genes forma um perfil alélico denominado *Sequence Type* (ST) que pode ser organizado em grupos de acordo com o número de alelos compartilhados. A lista de genes analisados seleccionados pelo programa MLST versão 2.0, são descritos na tabela 3.

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

Tabela 4. Genes conservados de *V. cholerae* seleccionados para análise de MLST

Gene	Descrição	Tamanho (bp)
adk	<i>Adenylate kinase</i>	416
gyrB	<i>DNA gyrase subunit B</i>	431
mdh	<i>Malate dehydrogenase</i>	421
metE	<i>Methionine synthase</i>	591
pntA	<i>Pyridine nucleotide transhydrogenase</i>	431
purM	<i>Phosphoribosyl-formyldicynamide cyclo-ligase</i>	476
pyrC	<i>Dihydroorotase</i>	449

5.9. Análises de Genes de Virulência

Genes de Virulência foram identificados usando *abricate* (<https://github.com/tseemann/abricate>) com o banco de dados Virulence Factors DataBase (VFDB).

5.10. Análises de Genes de Resistência aos Antibióticos

A presença e o tipo de genes de resistência a antibióticos (ARGs) ou estruturas contendo ARG foi avaliada nos genomas em forma de draft e nos genomas completos com o ResFinder versão 4.4.2 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) e usando a ferramenta bioinformática *abricate* (<https://github.com/tseemann/abricate>) usando diferentes bancos de dados (NCBI e CARD).

5.11. Análise filogenética

A análise filogenética dos isolados foi realizada usando kSNP4 com base em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do genoma pan-genómico e central. O uso de SNPs permite estimar árvores sem alinhamentos de genoma e permite o uso de conjuntos de dados de centenas de genomas microbianos usando um genoma de referência, estima parcimónia, máxima verossimilhança e árvores *neighborjoining*, e é capaz de anotar os SNPs.

6. LIMITAÇÕES

O número de amostras colhidas na época seca foi limitado devido à escassez de cursos de circulação de água e fontes de água potável contendo água no momento da amostragem.

Fundos limitado para custear o processo de sequenciamento genómico para todos os isolados de *V.cholerae* O1 confirmados por testes Bioquímicos e sorológicos.

Foi também uma limitação, o facto de que durante a realização do TSA não foi possível testar todos os antibióticos recomendados pelo CLSI por limitações financeiras e por isso não foi possível confirmar a expressão fenotípica de resistência de alguns antibióticos cujos respectivos genes de resistência foram encontrados nos isolados de *V. cholerae* deste estudo.

7. RESULTADOS

7.1. Análise Microbiológica

7.1.1. Isolamento de *Vibrio cholerae*

Das 77 amostras de água colhidas, foram isoladas 66 estirpes suspeitas de *Vibrio* através da testagem microbiológica (Figura 8).

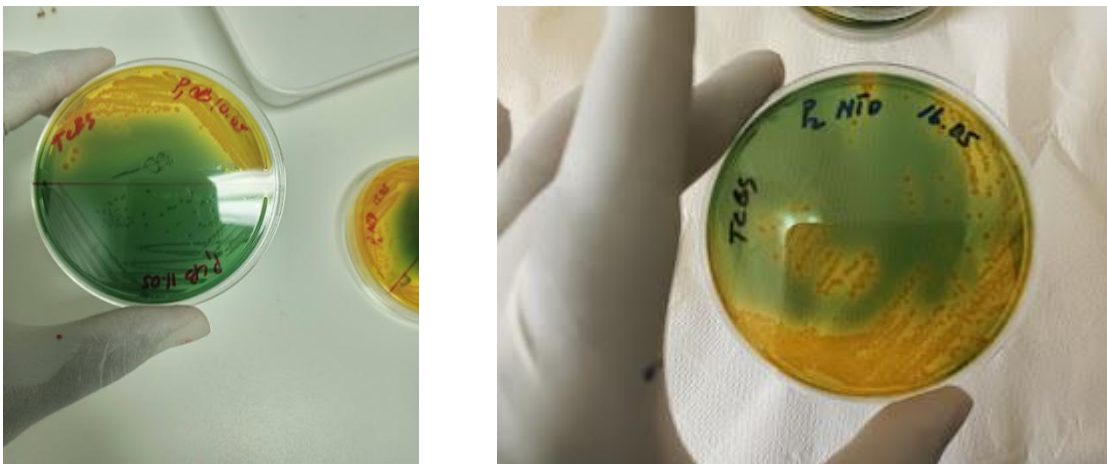


Figura 10. Placas de isolados suspeitos de *V. cholerae*. **Fonte:** (Autor, 2023)

Dos 66 isolados suspeitos, 26 foram confirmados como sendo *V. cholerae* O1 através dos testes bioquímicos e sorológicos (Figuras 8 e 9).

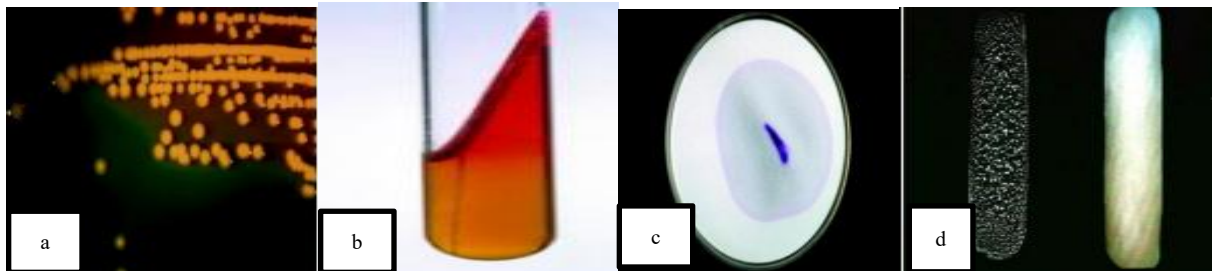


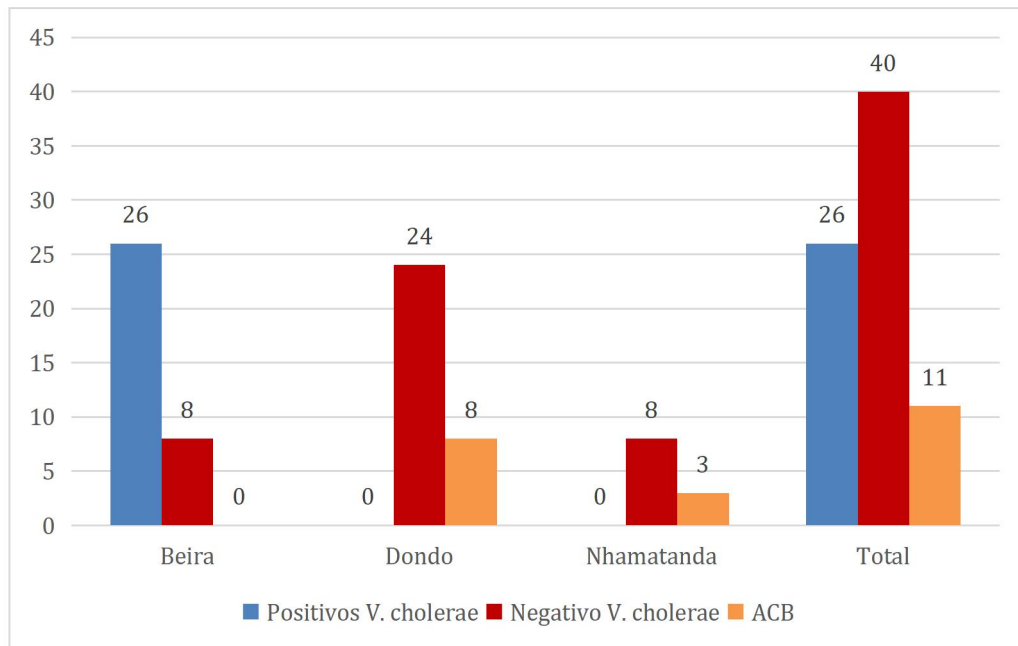
Figura 11. Testes Bioquímicos e Sorológicos para identificação de *V. cholerae*. **Legenda:** a) Crescimento de *V.cholerae* no meio TCBS; b) Reação de *V.cholerae* no meio Kligler; c) Teste Oxidase

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

positivo (cor púrpura) de *V.cholerae*; d) Teste de aglutinação positivo e negativo de anti-soros para o soro-grupos O1 V. **Fonte:** Adaptado de (CDC, 2000)

Foram isoladas um total de 40 bactérias não identificadas como *V. cholerae* provenientes da cidade da Beira 8 (20,0%), 24 de Dondo (60,0%) e 8 de Nhamatanda (20,0%). Houve ausência de crescimento bacteriano em 11 amostras, sendo 8 (72,7%) provenientes de Dondo e 3 (27,3%) de Nhamatanda (gráfico 1).

Gráfico 1. Isolados de *V. cholerae* por local de amostragem



Fonte: autor 2025

Todos os 26 isolados de *V. cholerae* O1 confirmados pela sorologia são provenientes de amostras colhidas na cidade da Beira, sendo 20 isolados provenientes de valas de drenagem e 6 da ETAR (Tabela 4). Nenhum *V. cholerae* foi isolado dos outros locais de amostragem.

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

Tabela 5: Parâmetros e Condições de colheita dos isolados de *V. cholerae* O1

Código	Data de colheita	Local	Local de colheita	Temp. °C	PH	Cond. (m/s)	OD
VC_1	9/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.3	7.8	1.178	18.9
VC_2	9/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	27.7	8	1.093	21.3
VC_11	10/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.3	7.83	1.123	16.8
VC_12	10/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.3	8.2	2.089	19.6
VC_18	11/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.6	7.9	1.293	19.9
VC_19	11/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.9	8.1	1.907	19.9
VC_20	11/5/2023	cidade da Beira	ETAR	28.6	8.2	1.533	33.6
VC_26	12/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	27.6	7.6	1.286	22.3
VC_27	12/5/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.5	8.3	1.907	18.5
VC_28	12/5/2023	cidade da Beira	ETAR	28.2	8.1	1.439	31.6
VC_34	15/6/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	26	7.89	1.102	15.9
VC_35	15/6/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	27.6	8.6	1.803	26.7
VC_36	15/6/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.5	8.2		27.9
VC_37	15/6/2023	cidade da Beira	ETAR	27.9	8.2	1.433	34.6
VC_47	16/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	27.7	7.6	1.019	19.3
VC_48	16/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	26.5	8.5	3.802	27.4
VC_49	16/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.5	8.45		27.5
VC_50	16/05/2023	cidade da Beira	ETAR	28.2	7.89	1.321	37.7
VC_59	17/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	27.1	8.3	1.019	19.3
VC_60	17/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	26.5	8.5	3.801	27.1
VC_61	17/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28	8.6		27.5
VC_62	17/05/2023	cidade da Beira	ETAR	28.6	7.83	1.421	38.3
VC_68	18/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	27.6	8.1	1.023	19.6

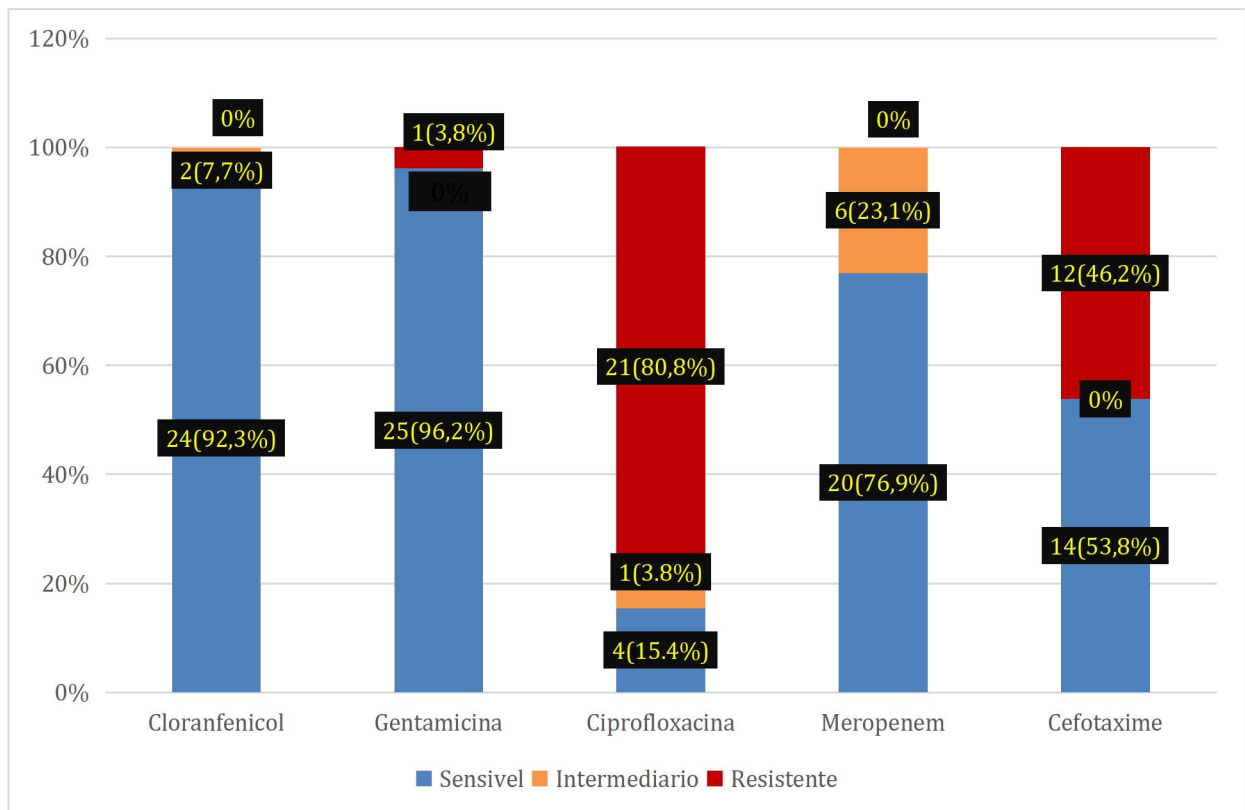
Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

Código	Data de colheita	Local	Local de colheita	Temp. °C	PH	Cond. (m/s)	OD
VC_69	18/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.3	8.3	3.022	22.3
VC_70	18/05/2023	cidade da Beira	vala de drenagem	28.3	8.5		27.7
VC_71	18/05/2023	cidade da Beira	ETAR	27.6	7.8	1.429	36.9

7.1.2. Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

Os resultados dos TSA mostram que dos 26 isolados de *V. cholerae* O1, 21 (80,8%), 12 (46,2%) e 1 (3,8%) foram resistentes a Ciprofloxacina, Cefotaxime e Gentamicina, respectivamente. Nenhum isolado foi resistente a Cloranfenicol e Meropenem. Foram encontrados susceptibilidade intermediária em 6 (23,1%), 2 (7,7%) e 1 (3,8%) a Meropenem, Cloranfenicol e Ciprofloxacina, respectivamente.

Gráfico 2. Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana de *V. cholerae*



Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

Fonte: Autor (2025)

Observou-se nesta testagem que à exceção de 4 (15,4%) isolados sensíveis à ciprofloxacina (4 (15,4%)), a maioria dos isolados foram sensíveis a quase todos os antimicrobianos testados, sendo que 25 (96,2%) sensíveis a gentamicina, 24 (92,3%) a cloranfenicol, 20 (76,9%) a meropenem e 14 (53,8%) a cefotaxime.

7.2. Identificação molecular

A análise molecular pelo PCR convencional para os genes *ompW* e *ctxA* realizado no laboratório do CB-UEM, confirmou 26 isolados de *V. cholerae* O1 (figura 12). A PCR convencional realizada no laboratório DISTAV da Universidade de Genova na Itália para genes *rfbO1* reconfirmaram os 26 isolados de *V. cholerae* O1 identificados. Destes, 19 isolados de *V. cholerae* O1 foram seleccionados para sequenciamento genómico.

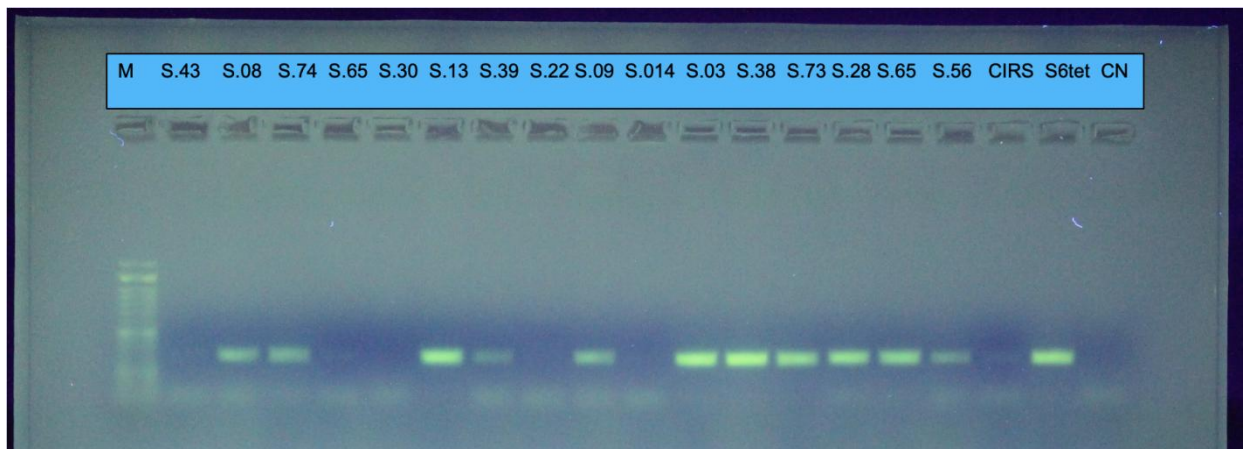


Figura 12. Detecção de gene *ompW* para identificação do *Vibrio cholerae*

7.3. Sequenciamento

A amostra VC_11 foi identificada como um *Proteus* e a amostra VC_50 foi identificada como *V. cholerae não-O1* pelo que não foram incluídas nas análises subsequentes. A identificação incorrecta desses dois isolados previamente confirmados como *V. cholerae* O1 em nível microbiológico e por PCR pode ser atribuída à presença de uma cultura mista que durante a fase de sequenciamento resultou no sequenciamento de apenas uma espécie microbiana presente na amostra de DNA.

Os restantes 17 isolados listados na tabela 5 foram confirmadas como sendo *V. cholerae* O1.

7.3.1. Resultados de Análise de Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Todas as sequências submetidas ao MLST 2.0, agruparam no *sequence type* (ST) 69 com os alelos *adk_7*, *gyrB_11*, *mdh_4*, *meE_37*, *pntA_12*, *purM_1*, *pyrC_20* (Anexo 3).

7.3.2. Análise de Genes de Virulência

A análise dos genes de virulência destacou a presença de todos os principais factores de virulência presentes em todos isolados de *V. cholerae* O1 tais como o *ctxAB*, operon TCP, toxina ACE, *zot*, operon *acf*, hemolisinas HylA, genes do flagelo e os T2SS, T4SS e T6SS.

7.3.3. Análise de Genes de Resistência Antimicrobiana (AMR) e Fenótipos de Resistência aos Antibióticos

As sequências genómicas obtidas foram submetidas ao programa *Resfinder* e *abricate* para análise de genes de resistência adquiridos e fenótipos de resistência a antibióticos. A tabela 6 apresenta os genes e os fenótipos de resistência encontrados para cada sequência. Todas as sequências de *V. cholerae* submetidas ao programa demonstraram potencial resistência aos antibióticos Estreptomicina, Florfenicol, Cloranfenicol, Sulfamethoxazol e Trimethoprim.

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

A figura 13 apresenta os resultados de PCR de detecção do gene floR que codifica a resistência para Florfenicol.

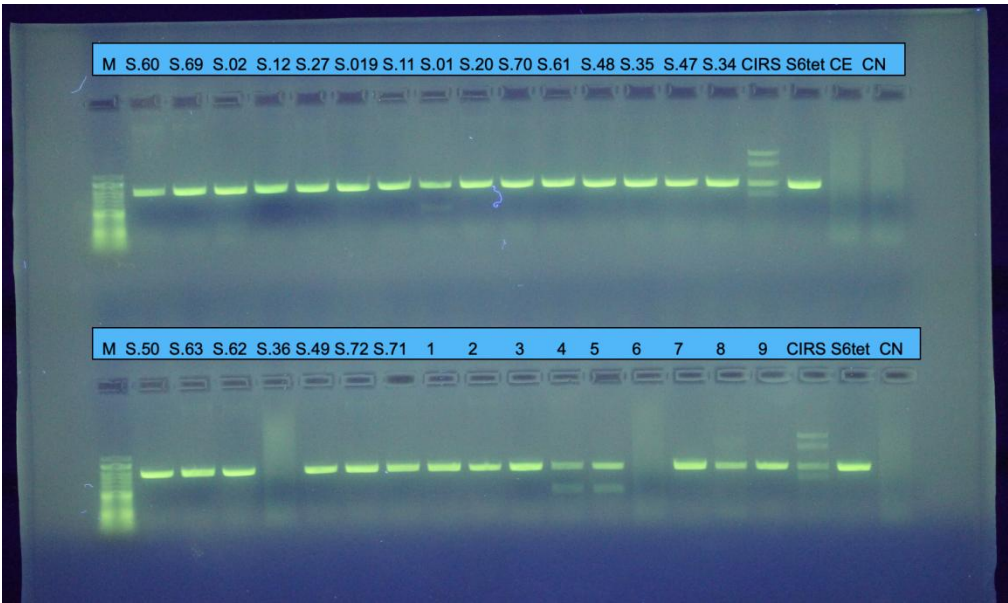


Figura 13. Detecção de gene de resistência floR do *Vibrio cholerae*

Tabela 6. Isolados de *V. cholerae* confirmados pelo sequenciamento e respectivos genes de resistência aos antimicrobianos

Code	Resistência Antimicrobiana				
	<i>Streptomycin</i>	<i>Chlor, florfenicol</i>	<i>Chloramphenicol</i>	<i>Sulfamethoxazole</i>	<i>Trimethoprim</i>
VC_1	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_2	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_12	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_18	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_19	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

VC_27	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_34	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_37	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_47	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_48	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_49	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_60	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_61	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_62	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_69	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_70	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>
VC_71	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>

Fonte: Autor 2025

7.3.4. Análise Filogenética

Foi realizada uma análise filogenética dos genomas dos isolados do estudo com outros genomas de *V. cholerae* O1 de origem clínica em Moçambique e estirpes de referência da sétima pandemia. A árvore filogenética representa a relação das estirpes isoladas na Beira com as estirpes clínicas isoladas durante a epidemia que afectou a província de Sofala após o ciclone Idai em 2019 e a relação com as estirpes de referência existentes em bancos de dados (figura 14). A análise filogenética mostra uma maior proximidade do genoma central dos isolados de Sofala com as sequências genómicas do 7PET circulantes na Índia em comparação com os isolados clínicos circulantes durante a epidemia da Beira de 2019. Estes dados fornecem-nos evidências

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

de que as estirpes de *V. cholerae* O1 El Tor 7PET isoladas nas águas residuais da Beira em 2023 são originárias de um evento de entrada de isolados pandémicos do subcontinente indiano.

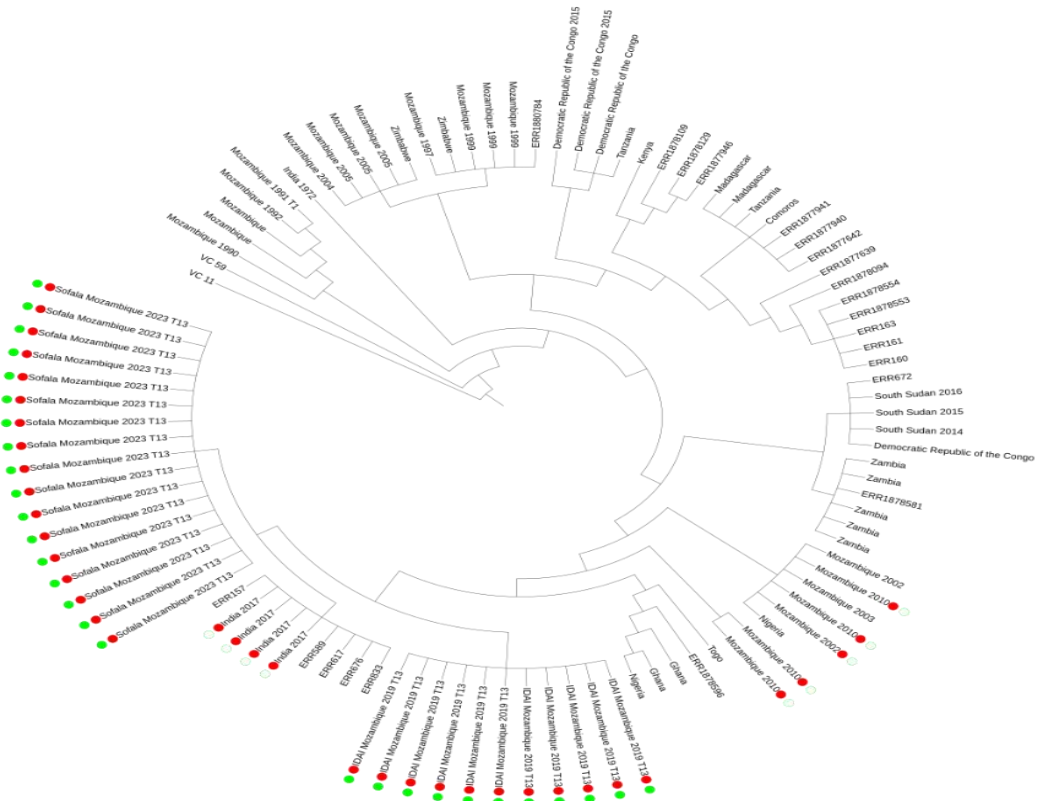


Figura 14: Árvore filogenética que representa a relação das estirpes isoladas na Beira com as estirpes clínicas isoladas durante a epidemia que afectou a província de Sofala após o ciclone Idai em 2019

8. DISCUSSÃO

A cólera continua a ser um importante problema de saúde pública em Moçambique. Caracterizamos isolados de *V. cholerae* O1 utilizando WGS para determinar a relação genética e a dinâmica de transmissão de surtos de cólera na Beira. Foram isoladas estirpes de *V. cholerae* O1 em alguns locais de amostragem das águas residuais da Beira. Os isolados foram confirmados para todos os factores de virulência característicos de *V. cholerae* O1 por PCR ou análise genómica. Resultados similares foram observados no estudo realizado com amostras de águas ambientais na região costeira do estado de São Paulo tendo isolado 16 *V. cholerae* confirmados por cultura de bactérias e testes bioquímicos (Markman, 2008). Porém os nossos resultados diferem dos resultados observados por Rocha, 2016, onde o *Vibrio coralliilyticus* foi isolado em 28 amostras e *V. cholerae* foi isolado em apenas duas amostras de água.

A temperatura, salinidade e/ou interação com outros microrganismos são factores ambientais determinantes para presença de *V. cholerae* no ambiente. Sendo a temperatura um dos factores que influencia na taxa de isolamento do *V. cholerae* a partir de amostras de água (Colwell & Huq, 1994). Porém o isolamento de estirpes ambientais com marcadores epidémicos e genes de virulência associados com casos clínicos indicam que estas estirpes do género *Vibrio* podem constituir um reservatório de genes de virulência e que podem se disseminar no ambiente em águas urbanas (Caburlotto *et al.*, 2008). Amirmozafari e colaboradores (2005) consideram que existe um risco sanitário elevado associado a presença de bactérias patogénicas no ambiente aquático e enfatizam a necessidade de programas de monitoria de longo prazo.

No presente estudo os testes de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados mostraram uma alta taxa de resistência antimicrobiana para Ciprofloxacina (80.8%) e Cefotaxime (46.2%). porém para os outros antibióticos testados, os isolados mostraram-se sensíveis para Gentamicina (96.1%), Clorafenicol (92.3%), Meropenem (76.93%) e Cefotaxime (53.8%). Também os nossos isolados mostraram ser portadores de genes multirresistentes aos principais antibióticos (tetraciclina, SXT, macrolídeos e fluoroquinolonas) comumente usados no tratamento de casos moderados a graves de cólera, como adjuvantes da terapia de reidratação, a fim de encurtar a duração e o volume da diarreia e, assim, limitar a transmissão bacteriana. Nossas análises dos dados do WGS revelaram que os isolados eram um grupo monofilético na terceira

onda da Sétima Pandemia. A resistência de isolados de *V. cholerae* a tetraciclina, STX macrolídeos e fluoroquinolonas foi reportado num estudo anterior de Mandando et al., 2007. O mesmo foi observado por Mashe et al., 2020, onde em 12 isolados de *V. cholerae* provenientes do surto de 2018 no Zimbabwe foi detectada a presença de genes de resistência antimicrobiana para Streptomycin, Florfenicol, Cloranfenicol, Sulfamethoxazole e Trimethoprim. O estudo de Folgosa et al., 2001 revela uma resistência global a sulfonamida e ao trimetoprim e uma elevada taxa de resistência a tetraciclina nos isolados de *V. cholerae* de Maputo, Tete e Zambézia, bem como o isolamento de estirpes multirresistentes. Os nossos resultados diferem dos resultados observado em estudo anterior realizado em Moçambique com 100% sensibilidade a ciprofloxacina e 89% de resistentes a clorafenicol (Dengo-Baloi et al., 2015). O mesmo foi observado em estudos realizados com isolados clínicos e ambientais de *V. cholerae* na Amazónia onde não foi identificada nenhuma estirpe multirresistente (Bahia, 2011) o que difere do observado no presente estudo.

A partir de 1990 até epidemia do Haiti (2010) de *V. cholerae*, os isolados mostraram-se portadores de elemento genético da família STX/ICE que se caracterizam por uma integrase conservada (*int_{sxt}*), um *core* e suas regiões variáveis, onde muitas vezes encontram-se genes de resistência a antibióticos (Marin, 2013).

Na última década, o perfil de resistência antimicrobiana de *V. cholerae* tem apresentado uma mudança e relatos de isolados multirresistentes a antibióticos vem aumentado a nível mundial o que pode influenciar nos resultados de terapia antimicrobiana em pacientes com cólera (Kitoaka et al., 2011; Urassa et al., 2000). A OMS reconhece o aumento da resistência antimicrobiana como um problema de saúde pública extremamente grave com impacto no tratamento de doenças infecciosas como a cólera, embora a base do tratamento seja a reidratação oral, o uso de antibioticoterapia encurta a duração da doença em casos severos (Hossain et al., 2002; Bahia, 2011).

Os ambientes naturais são reservatórios de genes de resistência a antibióticos, de forma que as alterações nestes ecossistemas são relevantes para a selecção de bactérias patogénicas resistentes (Lavezzo, 2015). Em ambientes menos contaminados por dejectos de esgotos verifica-se uma baixa taxa de resistência antimicrobiana do que em ambientes com maior taxa

de contaminação fecal. Num estudo realizado em Ubatuba por Burbano-Rosero e colaboradores (2011), numa área menos contaminada, verificou-se que dos onze antibióticos testados apenas em quatro deles observou-se resistência, principalmente para ampicilina (82.3%) e Cefalotina (76%). O contrário foi observado em ambientes com maiores taxas de contaminação fecal, como a Baixada Santista e o Canal de São Sebastião, com uma taxa de resistência a 10 e a 9 antibióticos respectivamente (Burbano-Rosero *et al.*, 2011).

Os isolados de *V. cholerae* O1 responsáveis pelos surtos de cólera no Haiti em 2010 eram portadores de ICE*VchHail* e módulos auxiliar que codifica para resistência para trimetoprima (*dfrA1*), sulfametoxazol (*sul2*), estreptomicina (*strAB*) e cloranfenicol (*floR*). ICEs com um conjunto semelhante de genes de resistência antimicrobiana também foram relatados na Índia (1994-2005) e Bangladesh (1998), Nepal (1994) e Nigéria (2010) (Marin *et al.*, 2014). Estes resultados assemelham-se aos resultados do presente estudo, onde 19 isolados foram portadores de genes de resistência para *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib* (Streptomycin), *floR* (*Chlor*, *florfenico*), *catB9* (Chloramphenicol) *Sul2* (Sulfamethoxazole) e *dfrA1* (Trimethoprim). Resultados similares foram observados pelo Malki e colaboradores, (2021) onde todos isolados clínicos de *V. cholerae* O1 El Tor foram portadores dos genes *sul2*, *tet(59)*, *dfrA1*, *catB9*, *aph(30)-Eu*, e *aph(6)-Id*, que codificam para resistência aos antibióticos sulfametoxazol, tetraciclina, trimetoprim, cloranfenicol e Streptomycin.

Os genes *aph(6)-Id* e *aph(3'')-Ib*, identificados nos isolados analisados neste estudo, pertencem à família *aph*, responsável por conferir resistência à estreptomicina. De acordo com Kobayashi & Kuzuyama (2000), a resistência mediada por esses genes ocorre por meio da codificação de aminoglicosídeo fosfotransferases, enzimas que inativam o antibiótico através da adição de um grupo fosfato proveniente de ATP a uma hidroxila específica do anel da molécula. Esse processo impede a ligação da estreptomicina à subunidade ribossomal 30S, bloqueando, assim, a sua acção bactericida. Por sua vez, segundo Dijun *et al.* (2019), o gene *floR* confere resistência ao cloranfenicol por meio de uma bomba de efluxo pertencente à família MFS (Major Facilitator Superfamily). Esse gene está frequentemente associado a elementos genéticos móveis, como integrons de classe 1 e plasmídeos, o que favorece a sua disseminação entre bactérias. A resistência ocorre através da codificação de uma proteína transportadora de

membrana pertencente à família MFS, que actua como bomba de efluxo, promovendo a expulsão do cloranfenicol e do florfenicol para fora da célula. Esse mecanismo reduz a concentração intracelular dos antibióticos e, consequentemente, impede a sua interacção com a subunidade ribossomal 50S, local onde ocorre o bloqueio da síntese protéica (Dijun *et al*, 2019).

A resistência ao cloranfenicol é atribuída à inibição enzimática do fármaco, facilitada pelas acetiltransferases de cloranfenicol (*catB*), impedindo que antibiótico se ligue ao ribossoma (50S) bloqueando assim a acção inibitória da síntese proteica (Alcala *et al.*, 2020). O gene *catB* está localizado em plasmídeos e integrons móveis facilitando a sua disseminação através da sua transferência horizontal genes (Oyama *et al.*, 2018).

Segundo Hochhut & Waldor (1999), a resistência *sul* confere resistência ao sulfametoxazol por meio da acção da enzima dihidropteroato sintase (DHPS), que apresenta afinidade reduzida por este antibiótico, tornando-o ineficaz na eliminação da bactéria. No caso de *Vibrio cholerae*, o gene *sul* está associado principalmente ao integron conjugativo (SXT), o qual carrega cassetes génicos que incluem, entre outros, o gene de resistência *sul2*.

Segundo Armshaw & Pembroke (2013) no *V. cholerae*, o elemento STX abriga um gene de resistência trimethoprim (*dfrA1*) que está associado aos integrons móveis. A resistência a trimethoprim ocorre através da modificação do sítio alvo do antibiótico ou pela criação de uma via alternativa por mutações espontâneas no gene alvo que altera a sequência consequentemente diminuindo a afinidade do trimethoprim.

Segundo Bhabatosh Das *et al.* (2020) os plasmídeos, superintegrons, transposons e sequências de inserção presentes no genoma de *V. cholerae* desempenham um papel relevante na resistência antimicrobiana e são os mais distribuídos no *V. cholerae* devido a sua fácil disseminação.

A análise no presente estudo de WGS de estirpes de *V. cholerae* O1 circulantes nas águas residuais da Beira, demonstram que estes isolados moçambicanos formaram uma linhagem distinta dentro de um clado que inclui variantes de 7PET da Ásia e mostram uma relação mais distante com as estirpes clínicas de *V. cholerae* O1 isolados na Beira em 2019, indicando uma origem diferente e evidenciando que houve múltiplas introduções independentes de *V. cholerae*

O1 provenientes da Ásia. Resultados similares foram obtidos por Langa e colaboradores, 2015 onde das epidemias dos anos 1997-1999 e 2012-2014 em Moçambique demonstrou-se que as estirpes epidémicas apresentaram perfis genéticos relacionados com as estirpes pandémicas originárias da Ásia. Outro estudo feito por Garrine *et al.*, 2017 em Manhiça mostrou que estirpes de *V. cholerae* O1 persistiram por pelo menos oito anos em um reservatório ambiental ou circulando dentro da população humana naquele Distrito. Quanto a formação de linhagem distinta dentro de um clado, Garrine *et al.*, 2017 observou o mesmo no seu estudo onde os isolados moçambicanos formaram uma linhagem distinta dentro de um clado que inclui variantes El Tor do Bangladesh, China, Haiti, Nepal, Índia e Quênia que pertencem à radiação global actual da Sétima Pandemia. A ocorrência de introdução sucessiva do *Vibrio cholerae* de sublinhagens da 7PET em África, justifica o surgimento de novos surtos e novas variantes em circulação (Weill *et al.*, 2020). Porém, estudos filogenéticos realizados com isolados epidémicos de Gana, Nigéria e outros países da região do Oeste africano como Angola evidenciaram que estes eram mais próximos ao *cluster* da América Latina em comparação aos da Tanzânia, Quênia e Ruanda que eram mais próximos aos do Sudoeste Asiático (Marin, 2013)

A linhagem *El Tor* epidémico se caracteriza por carregarem elementos genéticos móveis ou fixos que desempenham um papel importante no sucesso das linhagens e evidencia que o genoma *core* do *V. cholerae* é muito conservado, e sua dinâmica epidémica na provocação de surtos é resultado das novas informações contidas nestes elementos (Boucher *et al.*, 2011; Marin, 2013).

No presente estudo as análises dos genes de virulência destacaram a presença dos genes *ctxAB* que produzem a toxina da cólera, um factor-chave de virulência nas infecções por *V. cholerae* O1 e o operon TCP responsável pela produção de factor de colonização, para além dos outros genes de virulência essenciais tais como *ACE*, *zot*, *acf*, hemolisina *Hyla*, genes de flagelos e o sistema de secreção de T2SS, T4SS e T6SS. Resultados similares foram observados por Ansaruzzaman e colaboradores (2024), onde isolados de *V. cholerae* resultantes de uma vigilância na cidade da Beira, utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR), mostraram que todas as 40 cepas carregavam o gene *ctxA* e o gene *TCPA* (tipo El Tor), um gene constituinte da ilha de patogenicidade do vibrio. Estirpes epidémicas de cólera de Moçambique possuem um conjunto de genes de virulência sem polimorfismo aparente (Folgososa *et al.*, 2001).

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

O estudo de Sá (2009) mostrou que isolados ambientais de *V. cholerae* O1 continham os genes *ctxA* e *tcpB*, indicando a presença dos genes que codificam a toxina colérica e o *pilus* responsável pela aderência e colonização intestinal e demonstravam uma relação muito próxima com os da linhagem da sétima pandemia. Porém no mesmo estudo, um isolado obtido fora da época epidêmica não continha genes de virulência e nem ilhas de patogenicidade (Sá, 2009). O mesmo foi observado em um estudo com 32 amostras de água e 32 de sedimento da região estuarina no estado do Ceará, num período de três meses, onde foram isoladas nove Estirpes de *V. cholerae* em água e sedimentos, no entanto nenhuma das estirpes apresentava os genes de virulência *ctxAB*, *zot*, *tcp* e *rfbO1* (Sousa *et al.*, 2006).

A evidência do papel dos genes na adaptabilidade da espécie ao ambiente é a prevalência dos genes de virulência em *V. cholerae* ambiental (Chiavelli *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2008).

9. CONCLUSÕES

Apesar de a cólera ser endémica em Moçambique, a sua epidemiologia nas últimas duas décadas foi marcada pela sétima pandemia originada no subcontinente indiano. Os resultados deste estudo, obtidos a partir de isolados de águas residuais, evidenciam o papel do ambiente aquático como importante reservatório de *V. cholerae* e uma ameaça à saúde pública.

A monitoria do *V. cholerae* em ambientes aquáticos é essencial para a saúde pública em áreas endémicas, funcionando como sistema de alerta precoce para surtos e permitindo intervenções oportunas. Além disso, compreender a sua dinâmica nestes reservatórios fornece informações valiosas para prever e controlar a cólera de forma mais eficaz.

As estirpes circulantes de *V. cholerae*, isoladas de ambientes de águas urbanas na cidade da Beira, apresentaram elevada taxa de resistência *in vitro* à ciprofloxacina e ao cefotaxime, além de serem portadoras de genes de resistência. No entanto, a monitoria contínua do perfil de resistência antimicrobiana destas estirpes epidémicas é fundamental, uma vez que o surgimento de novas resistências pode impactar directamente as estratégias de controle da cólera.

10. RECOMENDAÇÕES

A Direcção Provincial de Saúde de Sofala:

- Sugere-se a continuação de acções de vigilância activa para cólera no ambiente de águas urbanas incluindo a pesquisa de factores de virulência, visto que foram detectados isolados de *Vibrio cholerae* O1 na sua forma viável e cultivável;
- Recomendamos a monitoria contínua do perfil de resistência aos antibióticos de estirpes epidémicas, pois o surgimento de resistência aos antibióticos pode influenciar as estratégias de controle da cólera;
- Às autoridades Municipais da cidade da Beira recomenda-se o tratamento das águas residuais e garantir a limpeza das valas de drenagem;
- À população da cidade da Beira recomenda-se o consumo de água tratada ou fervida para evitar surtos cólera e outras gastroenterite;

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*;128:1037–50.
2. Alcalá, A., Ramirez, G., Solis, A., Kim, Y., Tan, K., Luna, O., et al. (2020). Structural and Functional Characterization of Three Type B and C chloramphenicol Acetyl-Transferases from *Vibrio* species. *Prot. Sci.* 29 (3), 695–710. doi: 10.1002/pro.3793.
3. Amaro, C., Aznar, R., Garay, E., Alcaide E. R. (1988). plasmídeos em ambiente *Vibrio cholerae* estirpes não-O1. *Appl Environ Microbiol*;54:2771–6.
4. Andersson, D.I., Hughes, D. (2010). A resistência aos antibióticos e o seu custo: é possível reverter a resistência? *Nat Rev Microbiol*;8:260–71.
5. Armshaw, P., Pembroke, J. (2013) “Integrative conjugative elements (ICEs) of the SXT/R391 group as vehicles for acquisition of resistance determinants, stable maintenance and transfer to a wide range of enterobacterial pathogens,”. In: *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, ed. Méndez-Vilas A., editor. (Badajoz: Formatex Research Center). p. 439–446.
6. Bahia, Marcia De Nazaré Miranda. (2011). Caracterização molecular de *Vibrio cholerae* O1 Sacarose Negativa de Isolados clínicos e Ambiente na Amazônia Brasileira. UFP. Pará. Brasil.
7. Baltazar, C.S., Langa, J.P., Baloi, L.D., Chitio, J.E. (2017) Multi-site cholera surveillance within the African Cholera Surveillance Network shows endemicity in Mozambique, 2011–2015.
8. Banerjee, R., Das, B., Nair, G.B., Basak, S. (2014). Dinâmica na evolução do genoma do *Vibrio cholerae*. *Infectar. Geneta. Evol.* pág. 32–41.
9. Bhabatosh, Das., Jyoti, V., Pawan, K., Amit, G., Thandavarayan, R. (2019). Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms.
10. Bhandari, M., Jennison, A. V., Rathnayake, I. U., Huygens, F. (2021). Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – a review. *Infection, Genetics and Evolution*, 104726.
11. Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J. (2015). Mecanismos moleculares de resistência a antibióticos. *Nat Rev Microbiol*;13:42–51.
12. Blokesch, X.R., Schoolnik, G.K. (2007). Serogroup conversion of *Vibro cholerae* in aquatic reservoirs. *PloS Pathogens*.

13. Boucher, Y., Cordero, O.X., Takemura, A., Hunt, D.E., Schliep, K., Baptiste, E., *et al.* (2011). Local mobile gene pools rapidly cross species boundaries to create endemicity within global *Vibrio cholerae* populations. *mBio*. Jan;2(2):e00335–10.
14. Boyd and Valdor. (2002). Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 serogroup isolates. *Microbiology*. Jun;148(Pt 6):1655-1666.
15. Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (2022). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology Volume 2, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. 2 Ed. New York: Springer.
16. Burrus, V., Marrero, J., Waldor, M.K. (2006). The current ICE age: biology and evolution of SXT related integrating conjugative elements. *Plasmid*. May;55(3):173–83.
17. Burrus, V., Waldor, M.K. (2003). Control of SXT integration and excision. *J Bacteriol*;185:5045–54
18. Burdano-Rosero, E., Ueda-Ito, M., Kisielius, J.J., Nagasse-Sugahara, T.K., Almeida, B.C., Sousa, C.P., Martins, G.G., Albertini, L., Rivela, I.G., Ivera. (2016). Diversity of samtic Coliphages in Coastal regions with different Levels of Anthropogenic Activity in Sao Paulo State, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 77, n. 12, P 4208-4216,
19. Carattoli, A. (2013). Os plasmídeos e a disseminação da resistência. *Int J Med Microbiol*;303:298–304.
20. Carbuloto, G., Ghidini, V., Gennari, M., Tafi, M.C; Lleo, M.M. (2008). Isolation of a *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain from a marine water sample obtained in the northern Adriatic. *Eurosurveillance*. v.13, p.1-3.
21. Cariri, A., Francisco, A.M. (2008). A Caracterização Molecular de Cepas de *Vibrio cholerae* O26, Isoladas de processos entéricos humanos no Nordeste do Brasil. UFP. Brasil.
22. Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A. K., Bhadra, R. k., Ghosh, A. N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S., Takeda, Y., Colwell, R. R., Nair, G. B. (2000). Virulencia genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *ppI Environ Microbiol*. Sep;66(9):4022-8.
23. Chiang, S.L., Mekalonos, J.L. (1999). Horizontal gene transfer in the emergence of virulent *Vibrio cholerae*. 156-168. In: *Microbial Ecology and Infectious*. Washington, DC: Editora Eugene Rosenberg, American Society for Microbiology.
24. Chiavelli, D.A., marsh, J.W., taylor, R.K. (2001). The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3220-3225.

25. Chowdhury, FR; Nur, Z; Hassan, N; Seidlein, L; Dunachie, S. (2017). Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 16(1). 1-6,
26. Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM. (2006). New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul;50(7):2493-9. doi: 10.1128/AAC.01310-05. PMID: 16801431; PMCID: PMC1489794.
27. Centro Europeu de Prevenção e Controle (ECDC). 2025.
28. Collis, CM., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Sokes, H.W., Hall. R.M. (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Molecular Microbiology*.
29. Colwell, Rita. R., Huq. D. Anwarul. (1994). Environmental Reservoir of *Vibrio cholerae*. Department Of microbiology. Pg46-56.
30. Colwell RR, Huq A. *Ann N Y Acad Sci*. (1994). Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. *Ann N Y Acad Sci*, Dec 15;740:44-54., doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb19852.x.
31. Colwell, R. R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Review Science*, Dec 20;274(5295):2025-31. doi: 10.1126/science.274.5295.2025.
32. Dalsgaard, A., Forslund, A., Tam, N.V., Vinh, D.X Cam, P.D. (1999). Cholerae in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance genes cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996. *Journal of Clinical Microbiology*.
33. Dalsgaard, A., Forslund, A., Serichantalergs, O., Sandvang, D. (2000). Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
34. Dalsgaard. A., Hossain, Z. Z., Leekitcharoenphon, P., Sultana, R., Begum, A., Jensen, M, P. K., Hendriksen., R. S. (2001). Comparative genomics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Bangladesh
35. Darley, E., Semanas, J., Jones, L., Daniels, V., Wootton, M., MacGowan, A., *et al.* (2012). Infecções polimicrobianas por NDM-1, incluindo *Vibrio cholerae* *Lanceta*, 380. pág. 1358
36. Davis, B. M., *et al.* (1999). The *Vibrio cholerae* O139 Calcutta bacteriophage CTX ϕ is infectious and encodes a novel repressor. *Journal of bacteriology*, Washington, v. 181, p. 6779-6787.
37. Davis B. M, Moyer KE, Boyd EF, Waldor MK. (2002). CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. *J Bacteriol*. (2000) 182:6992–8. doi: 10.1128/JB.182.24.6992-6998.

38. De Pascale, G., Wright, G.D. (2010). Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *ChemBioChem*;11:1325–34.
39. Dijun, Du., Xuan, Wang-Kan., Arthur, Neuberger., Hendrik, W. Van. Veen., Klaas, M. Pos., Laura, J., V. Piddock., Bem, F. Luisi. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *microbiologia*.
40. Dutta, J.K., Santhanam, S., Misra, B. S., Ray, S.N. (1978). Effect of trimethoprim-sulphamethoxazole on vibrio clearance in cholera (El Tor): a comparative study *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 72 (1) pp. 40-42.
41. Falbo, V., Carattoli, A., Tosini, F., Pezzella, C., Dionisi, AM., Luzzi, I. (1999). Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
42. Fallarino, A.C. et al. (1997). Identification of additional genes required for O-antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Bacteriology*, v. 179, p. 21472153.
43. Faruque, S.M., Ahmed, KM., Siddique, AK., Zaman K; Abdul, Alim. Arm., Albert, J. (1997). Molecular Analysis of Toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal Strains Isolated in Bangladesh between 1993 and 1996. Evidence for Emergence of a New Clone of the Bengal Vibrios. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 35, n. 9, p. 2299-2306.
44. Faruque, S.M., Albert, M.J., Mekalanos, J.J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio Cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1301-1314.
45. Field, D. (1980). Intestinal secretion and Its Stimulation by enterotoxin. In Ouchterlony O and Holmgren. J (ed). *Cholera and related diarrheas*.
46. Finkelstein, R.A. (2006). Cholera, *Vibrio cholerae* O1 and O139, and Other Pathogenic Vibrios. In: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*, 2005. Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/cholera.html>. Acesso em: 20 de Maio.
47. Fluit, A.C., Schmitz, F.J. (2004). Resistenc integrons and super integrons. *clinical Microbiology and infection*, 10.
48. Folgosa, E., Mastrandrea, S., Cappuccinelli, P., Uzzau, S., Rappelli. P., Brian, Mj., et al. (2001). Identificação molecular de genes de patogenicidade e tipos ERIC em estirpes epidêmicas de *Vibrio cholerae* O1 de Moçambique. *Infeção Epidemiol.*; 127(01):17–25.
49. Food And Agriculture Organization/ World Health Organization Expert Consultation. (2001). Risk assessment of campylobacter spp. in broiler chickens and *Vibrio spp.* in seafood. Rome: FAO.
50. Girlich, D., Poirel, L., Leelaporn, A., Karim, A., Tribuddharat, C., Fennewald, M., Nordmann, P. (2001). Molecular epidemiology of the integrons located VEB-1 extended-

- spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolated in Bangkok, Thailand. Journal of clinical Microbiology.
51. Gurjal, L., Semá, C., Rebaudet, S., Taibo, C. L., Manjate, A. A., Piorroux, R., Gessner, B. D., Jani, I.V. (2013). Cholera epidemiology in Mozambique using national surveillance. J Infect Dis, Nov 1;208 Suppl 1:S107-14., doi: 10.1093/infdis/jit212.
 52. Hall, R.M. (1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance gene in gram-negative bacteria. Ciba foundation Symposium; discussion.
 53. Hansson. k., Sundstron, L., Pelletier, A., Roy, P.H. (2002). IntI2 integron Integrase in Tn7. The Journal of Bacteriology 184.
 54. Hedges, RW., Jacob, AE. (1975). Mobilização de determinantes de resistência a fármacos transmitidos por plasmídeos para transferência de *Pseudomonas aeruginosa* para *Escherichia coli*. Mol Gen Genet.140:69–79.
 55. Heidelberg, J. F., et al. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature, v. 406, p. 477- 484.
 56. Herrington, D. A., et al. (1988). Toxin, toxin-coregulated pili and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. The Journal of Experimental Medicine, v. 168, p. 1487-1492.
 57. Higgins, C.F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters, Nature, 446 pp. 749-757.
 58. Hooper, D.C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. Clin Infect Dis;32. (Suppl 1):S9–S15.
 59. Hossain, M.S., Salam, M.A., Rabbani, G.H., Kabir, I., Biswas, R., Mahalanabis, D. (2002). tetracycline in the treatment of severe cholera due to *Vibrio cholerae* O139 Bengal. Journal of Health, population and Nutrition, 20: 18-25.
 60. Huq, A., Colwell. R.R., Rahman, R., et al. (1990). Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ambiente aquático por anticorpo monoclonal fluorescente e métodos de cultura. Appl Ambiente Microbiol;56(8):2370–2373.PMID:2206100.
 61. Islam, M.S. et al. (1992). Seasonality and toxigenicity of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from different components of pond ecosystems of Dhaka City, Bangladesh. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 8.
 62. Izard, T., Ellis, J. (2000). The crystal structures of chloramphenicol phosphotransferase reveal a novel inactivation mechanism EMBO J, 19 pp. 2690-2700.
 63. Kaper, J. B., Morris, J.G and Levine, M.M. (1994). Cholera.Clin Microbiol.Rev.

64. Kaper J. B., Morris, J.G and Levine, M.M. (1995). Cholera. Clin Microbiol.Rev
65. Karaolis, D.K.R., Johnson, J.A., Bailey, C.C., Kaper, J.N., Reeves, P.R. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. Proceedings of the national Academy Sciences of United State of Americas.
66. Karaolis, D. K. R. *et al.* (1999). A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage rceptor in cholera bacteria. Nature, London v. 399, p. 375-379.
67. Kobayashi, S., Kuzuyama, T., Seto, H. (2000). Characterization of the *fomA* and *fomB* gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomycin resistance on *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 44 pp.647-650.
68. Koch Robert (1884). Cholera and ITS bacillus. The British Medical journal.pp 403-407
69. Kumar, P., Thulaseedharan, A., Chowdhury, G., Ramamurthy, T., Thomas, S. (2011). Characterization of novel alleles of toxin co-regulated pilus a gene (*tcpA*) from environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Current microbiology. Mar;62(3):758–63.
70. Kumar, S., Floyd, J.T., He, G., Varela, M.F. (2013). Bombas de efluxo antimicrobianas bacterianas das famílias de transportadores MFS e MATE: uma revisão em Desenvolvimentos recentes na investigação sobre agentes antimicrobianos e quimioterapia; Research Signpost, Inc.: Kerala, Índia; pp. 1–21.
71. Kumar, S., Varela, M.F. (2012). Bioquímica de bombas de efluxo multi-fármaco bacterianas. Int. J. Mol. Ciência. 13, 4484–4495. 52.º
72. Kumar, S., Varela, M.F. (2013). Mecanismos moleculares de resistência bacteriana a agentes antimicrobianos em patógenos microbianos e estratégias para os combater: Ciência, Tecnologia e Educação; Méndez-Vilas, A., Ed.; Centro de Investigação Formatex: Badajoz, Espanha; pp. 522–534.
73. Lekshmi, N., Iype, J., Ramamurthy.T., Sabu.T. (2018). Mudanças nas fachadas do *Vibrio cholerae*: um enigma na epidemiologia da cólera. Indian Journal of Medical. Pp133-141.
74. Maheshwari, M., Nelapati, K., & Kiranmayi, B. (2011). *Vibrio cholerae* - a review. Veterinary world, 4(9), 423-428.
75. Malki, Ameena A.L., Kyle, D. Brumfield., Clement, K. M., Tsui, Anjana. Anand., Shah, M. Rashed., Emad, Ibrahim., Hamad, A.L Shamari., Anwar, Huq., Rita, R. Colwell., Rashmi, Fotedar. (2021). Draft Genome Sequences of Seven *Vibrio cholerae* Isolates from Adult Patients in Qatar. Microbiology Resource.
76. Markman, Coroline V. (2009). Caracterização de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras da região costeira do estado de são Paulo de regiões portuárias brasileiras e de tanques de lastros de navios. Dissertação. USP. Brasil.

77. Marin, E.L., Fonseca, B.N., Andrade, A.C., Cabral, A.C., Vicente. (2014). Ocorrência mundial de elementos conjugativos integrativos que codificam determinantes de resistência a múltiplas drogas na epidemia de *Vibrio cholerae* O1 PLoS UM, 9 pág. e108728.
78. Marin, Michel F.B. (2013). Epidemiologia genômica de *Vibrio cholerae* da epidemia de colera na America Latina.IOC. RJ. Brasil.
79. Mashe. T., Domman.D., Tarupiwa. A., Masunda. K., Ramudzulu. M., et al. (2022). Cepa de surto de cólera altamente resistente no Zimbábue. The new England Journal of Medicine.
80. Masooma, F., Ayesha, M., Zeenat.N., Nazim. H., Ahmer, B.H., Piotr. S. (2024). Antibiotic resistance and preventive strategies in foodborne pathogenic bacteria: a comprehensive review. Food Science Biotechnology.
81. McGrath, M., Gey, Van Pittius NC., Van, Helden. P.D., Warren, R.M., Warner, D.F. (2014). Taxa de mutação e surgimento de resistência aos medicamentos em *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother;69(2):292–302.
82. Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.Y., Schoolnik, G.K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholera*. Science. 310: 1824-1827.
83. Mendes, L.C. (2007). Avaliação da técnica de nested PCR em tubo unico com dois genes alvos para detecção de *Vibrio cholera* O1 diretamente do meio cultura. (12).
84. Mendes, Re., Rhomberg, Pr., Bell. Jm., Turnidge, Jd., Sader, HS. (2009). Doripenem activity tested against a global collection of Enterobacteriaceae, including isolates resistant to other extended-spectrum agents. Diagn Microbiol Infect Dis.
85. Merrell. D.S., Butler; S, M., Quadri, F., Dolganov, N.A., Alam, A., Cohen, M. B., Calderwood, S.B., Schoolnik, G.K, Camilli, A. (2002). Host Induced Epidemic Spread of the Cholera bacterium. Nature, 417: 642-645.
86. MISAU. (2023). Relatório de mapeamento de áreas críticas de cólera em Moçambique. MISAU/INS.
87. Morar, M.K., Pengelly, K., Koteva, G.D. (2012). Wright Mechanism and diversity of the erythromycin esterase family of enzymes Biochemistry, 51 pp. 1740-175.1.
88. Mukhopadhyay, S., Nandy, R. K., Sengupta, T. K., and Ghose, A. C. (1995). A comparative study of the properties of *Vibrio cholerae* O139, O1 and other non-O1 strains. Journal of Medical Microbiology.
89. Mukhopadhyay, A. K., et al. (2001). Characterization of VPI pathogenicity island and CTXφ prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. Journal of bacteriology, Washington, v. 183, p. 4737–4746.

90. Nandi, S., et al. (2003). Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype EL Tor: role of the CTX ϕ array and its position in the genome. *Microbiology*, Reading, v. 149, p. 89- 97.
91. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1991). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. NCCLS Pub- location M2-A4. Villanova: NCCLS.
92. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2003). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: Norma Aprovada- Sexta edição. Wayne, Pennsylvania.
93. Neto, Antônio. (2025). Como a *Escherichia coli* e Demais Bactérias Resistem aos Antibióticos? Disponível em: <https://www2.zoetis.com.br/painel-da-avicultura/posts/66-como-a-escherichia-coli-e-demais-bacterias-resistem-aos-antibioticos>. 2021. Acessado em: 28 de Agosto.
94. Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain J.M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria, *Front Microbiol*, 5 p. 643.
95. Opintan, J.A., Newman, M.J., Nsiah-poodoh, O.A., Okeke, I.N. (2008). *Vibrio Cholerae* O1 from Accra, Ghana carrying a class 2 integron and the STX element. *The Journal of Antimicrobiobial Chemotherapy*, 62.
96. Organização Mundial Da Saúde. Cólera, 2017. *Wkly Epidemiol Rec* 2018;93 (38):489-500.
97. Oyama, Gxalo., Tennison, O. Digban., Bright, E. Iger Ola, A. Olapade., Anthony, I. Okoh., Uchechukwu, U. Nwodo. (2018). Virulence and Antibiotic Resistance Characteristics of *Vibrio* Isolates from Rustic Environmental Freshwaters. *Review Nat Rev Microbiol*.
98. Pearson, G.D., Woods. A., Chiang, S.L and Mekalanos. (1993). CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and na intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci USA* .90:3750-3754.
99. Pearson, G. D. N. *et al.* (1993). CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, Washington, v. 90, p. 3750-3754.
100. Pezzoli L. (2019). Oral Cholera Vaccine Working Group of the Global Task Force on Cholera control. *Global oral cholera vaccine use, 2013-2018*. *Vaccine*. 2020 Feb 29;38 Suppl 1(Suppl 1):A132-A140. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.08.086. Epub 2019 Sep 10.
101. Rhaman, M.H., Biswas, K., Hossain, M.A., Sack, R.B., Mekalanos, J.J., Faruque, S.M. (2008). Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area: tracking the evolution of patogenic strains. *Dna and Biology*, 27:347-355.

102. Rocha R Dos Santos. (2016). Caracterização polifásica da comunidade bacteriana heterotrófica de ambiente de carcinicultura frente às tetraciclinas. Dissertação.UFC.
103. Rosa F Juliana, (2015). Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*.
104. Sá Lena Liliana Canto De. (2009). Diversidade Genética de Isolados Ambientais de *Vibrio cholerae* da Amazonia Brasileira. Dissertação.UFP.
105. Sack, D.A., Sack, R.B., Nair, G.B., Siddique, A.K. (2004). Cholera. *Lancet* 363: 223-233.
106. Said, B., Smith, H.R., Scotland, S.M., Rowe, B. (1995). Detection and differentiation of the gene for toxin co-regulated pili (tcpA) in *Vibrio cholerae* non-O1. using the polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters*, 125: 205-210.
107. Silva, E.S., Fernandez, M.A.S., Lopes, A.P., Costa, B.S., Pereira, S.S. (2019). Variation of pH, salinity and temperature for the establishment of *Vibrio cholerae* in the city of Rio de Janeiro. Incqs-Fiocruz. Brasil.
108. Silva, E.S., Viana, C.M. (2016). *V. cholerae* inspection in the port water of Rio de Janeiro Brazil. a methodological essay. *Revista Visa em debate*.
109. Sousa, O. V.; Macrae, A.; Menezes, F. G. R.; et al. (2006). The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 12, p. 1725–1734.
110. Smith, K.P., Kumar, S., Varela, M.F. (2009). Identification, cloning, and functional characterization of EmrD-3, a putative multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Vibrio cholerae* O395. *Arch. Microbiol.* 191, 903–911,
111. Tafur, J.d., Torres, J.A., Villegas, M.V. (2008). Mecanismos de Resistência a Antibióticos em bactérias Gram negativo, Centro Internacional de Formação e Pesquisa Médica, CIDEIM, Cali, Colômbia, v.12, n 03, Setembro, pp 218-219.
112. Talkington, D., Bopp, C., Tarr, C., Parsons, M. B., Dahourou, G., Freeman, M., Gerner-Smidt, P. (2011). Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti. *Emerging infectious diseases*.
113. Tamplin, M.L., Gauzens, A.L., Huq, A., Sack, D.A., Colwell, R.R. (1990). Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl Environ Microbiol*.
114. Theophilo GN, Rodrigues Ddos P, Leal NC, Hofer E. (2006). Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006 Mar-Apr;48(2):65-70. doi: 10.1590/s0036-46652006000200002.

115. Tirapattanun, A., Chomvarin, C., Wongboot, W., & Kanoktippornchai, B. Application of SYBR green real-time PCR for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment. Aquatic. 2015.
116. Thompson, C.C., Thompson, F.L., Vicente, A.C.P. (2004). Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: 617-621.
117. Thompson, C.C., Thompson, F.L., Vicente, A.C.P. (2008). Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: 617-621.
118. Thompson FL, Iida T, Swings J. (2004). Microbiol Mol Biol Rev. Sep;68(3):403-31., doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.
119. Vaz, A. (2013). Controlo e Prevenção da Cólera. Faculdade de Medicina. Universidade de Coimbra. Portugal
120. Yamai, S., Okitsu, T., Shimada, T., Katsube, Y. (1997). Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin and addition of novel serogroups. Kansenshogaku Zasshi: The journal of the Japanese Association for infections Diseases 71.
121. Waldor, M.K., Mekalanos, J.J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous bacteriophage encoding cholera toxin. Science 272.
122. Waldor, M.K., Rubin, E.J., Pearson, G.D., Kimsey, H and Mekalanos, J.J. (1997) Regulation replication, and integration functions of the *Vibrio cholera* CTX are encoded by region RS2. Mol Microbiol 24:917-926.
123. Waldor, M.K., Tschape, H., Mekalanos, J.J. (1996). A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. J Bacteriol;178:4157-65.
124. Weill, F. X., Domman, D., Njamkepo, E., Almesbahi, A. A., Naji, M., Nasher, S. S. Quilici, M. L. (2019). Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. Nature, 565(7738), 230-233.
125. Weill, F. X., Domman, D., Njamkepo, E., Almesbahi, A. A., Naji, M., Nasher, S. S. Quilici, M. L. (2017). História genômica da sétima pandemia de cólera em África. Ciência 358, 785–789.
126. Wozniak, Raf Fouts De., Spagnoletti M, Colombo M.M., Ceccarelli, D., Garriss, G., et al. (2009). Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. PLoS genetics. Dec; 5(12):e1000786.

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

127. Zhang, D., et al. (2003). Analysis of the *Vibrio* pathogenicity island-encoded Mop protein suggests a pleiotropic role in the virulence of epidemic *Vibrio cholerae*. FEMS microbiology letters, Amsterdam, v. 225, n. 2, p. 311-318.

Identificação molecular e perfil de resistência de *Vibrio cholerae* de ambientes aquáticos em zonas endêmicas na província de Sofala após o ciclone Idai.

ANEXOS

Anexo 1. Concentração de DNA e Valores de absorvância obtido após a extracção de DNA

Código	Serologia	Kit de extracção de DNA	NanoDrop (ng/ul)	260/280	260/230
VC_1	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	41.4	1.9	1.7
VC_2	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	92.3	2	2.4
VC_11	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	107.1	2	2.3
VC_12	<i>V. cholerae</i> O1	Qiagen DNeasy	364.2	2	2.4
VC_18	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	35.3	1.9	2
VC_19	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	98.3	2	2.3
VC_27	<i>V. cholerae</i> O1	Qiagen DNeasy	317.5	2	2.5
VC_34	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	103	2	2.4
VC_37	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	93.8	2	2.3
VC_47	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	41.6	2	2.3
VC_48	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	121.2	2.12.4	2.5
VC_49	<i>V. cholerae</i> O1	Qiagen DNeasy	364.8	2	2.5
VC_59	<i>V. cholerae</i> O1	Qiagen DNeasy	76.2	1.9	2.2
VC_60	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	73.2	2	2.4
VC_61	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	101.2	2	2.5
VC_62	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	102.9	2	2.5
VC_69	<i>V. cholerae</i> O1	Roche	39.1	2	2.5
VC_70	<i>V. cholerae</i> O1	Qiagen DNeasy	401	2.1	2.4
VC_71	<i>V. cholerae</i> O1	Qiagen DNeasy	373	2	2.4

Anexo 2. Genes de Resistência Antimicrobiana e genes conservados usados para MLST

Code	AMR					MLST							
	Streptomycin	Chlor, florfenicol	Chloram phenicol	Sulfamethoxa zole	Trimetho prim	Sequence Type	Conserved genes						
VC_1	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_2	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_12	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_18	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_19	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_27	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_34	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_37	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_47	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_48	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_49	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_60	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_61	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_62	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_69	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_70	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>
VC_71	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	<i>floR</i>	<i>catB9</i>	<i>sul2</i>	<i>dfrA1</i>	69	<i>adk_7</i>	<i>gyrB_11</i>	<i>mdh_4</i>	<i>meE_37</i>	<i>pntA_12</i>	<i>purM_1</i>	<i>pyrC_20</i>