



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



Carina Lucena Mendes

**Avaliação da técnica de nested PCR em tubo
único com dois genes alvos para detecção de
Vibrio cholerae O1 diretamente do meio de
cultura**

RECIFE
2007

Carina Lucena Mendes

Avaliação da técnica de nested PCR em tubo único com dois genes alvos para detecção de *Vibrio cholerae* O1 diretamente do meio de cultura

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Recife
2007

CARINA LUCENA MENDES

Dissertação analisada e aprovada pela comissão examinadora em janeiro de 2007.

Dra. Nilma Cintra Leal (Orientadora)
CPqAM - FIOCRUZ

EXAMINADORES

Dra. Tereza Cristina Leal Balbino (Titular)
CPqAM – FIOCRUZ

Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira (Titular)
UFRPE

Dra. Valéria Rego Alves Pereira (Suplente)
CPqAM – FIOCRUZ

Dra. Marise Sobreira Bezerra da Silva (Suplente)
UPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, à minha família, pelo amor e apoio, e a Tiago Marques, meu namorado, por estar ao meu lado em todos os momentos, sejam bons ou maus. Amo muito vocês.

A Dra. Nilma Cintra Leal, muito obrigada pela orientação, dedicação, confiança e incentivo nestes (quase) três anos de convivência.

Meus agradecimentos ao Dr. Frederico Guilherme Abath e ao Dr. Fábio Melo pelas preciosas contribuições ao longo deste trabalho.

Agradeço aos componentes da banca examinadora, em especial a Dra. Tereza Cristina Leal Balbino e Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira, por aceitarem mais este trabalho em meio a tantos.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do CPqAM Isaac Martins, Silvana Santos e Yara Nakasawa pelo suporte: meus agradecimentos.

Agradeço a Christian Reis, Francisco Cariri e Wagner Luis Mendes pela ajuda com a reação de seqüenciamento.

Aos colegas que fazem parte do Departamento de Microbiologia, muitos dos quais se tornaram verdadeiros amigos ao longo do tempo. Obrigada pelo carinho e pela atenção.

Obrigada ao Centro de pesquisas Aggeu Magalhães e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pelo suporte científico e financeiro.

RESUMO

A cólera é uma doença bacteriana historicamente conhecida por seu potencial de provocar epidemias, tendo levado milhares de indivíduos à morte. É causada pelo bacilo Gram-negativo *Vibrio cholerae* O1 toxigênico. No Brasil, apesar de grandes avanços no que se refere a prevenção, a infecção ainda persiste e, embora não seja causa de alta mortalidade, sua presença é motivo de preocupação para a rede de Saúde Pública local. A infecção colérica é endêmica no nordeste brasileiro e está relacionada, principalmente, a condições sanitárias precárias. O diagnóstico clássico da infecção é a cultura bacteriana, complementada pela detecção da toxina colérica, o que retarda o resultado do exame. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a técnica de nested PCR em tubo único com dois genes alvos (MSTNPCR) na detecção de *V. cholerae* O1 diretamente do meio de cultura. Utilizando DNA, a técnica foi capaz de amplificar até 1 pg de *V. cholerae* O1, além de ter possibilitado a detecção do vibrião diretamente do meio de cultura líquido, sem prévia extração de DNA, apresentando limite de detecção de três Unidades Formadoras de Colônia. Além disso, a MSTNPCR mostrou-se específica para *V. cholerae* O1 quando testada com vários microrganismos diferentes. Um *kit* diagnóstico foi montado e estocado a -20 °C, permanecendo estável durante os quatro meses em que foi testado. A MSTNPCR descrita neste trabalho pode ser útil no diagnóstico da infecção colérica e em investigações epidemiológicas, complementando os resultados obtidos com a cultura bacteriana.

ABSTRACT

Cholera is a bacterial disease historically known by its epidemics, having killed thousands of people through the centuries. The infection is caused by toxigenic *Vibrio cholerae* O1, a Gram-negative bacillus. Although great advances at prevention, in Brazil the infection still persists and even so it is not cause of high mortality, its occurrence worries the Public Health system. It is a brazilian northeast endemic disease mainly related to precarious sanitary conditions. The classic diagnostic of infection is the bacterial culture complemented by the detection of cholera toxin which delays the tests results. The major aim of this work was to adapt the technique of single tube nested PCR using two target genes (MSTNPCR) for detection of *V. cholerae* O1 directly from liquid culture. MSTNPCR was able to amplify up to 1 pg of *V. cholerae* O1 besides having made possible the bacterium detection directly from liquid culture, without need of previous DNA extraction. In this case the limit of detection was three UFC. Moreover MSTNPCR revealed being specific for *V. cholerae* O1 when it was tested with other bacteria. A diagnostic kit was prepared and kept stored at -20 °C, remaining stable throughout the four months it was tested. MSTNPCR described here can be useful for cholera diagnostic and by the monitoring ambiental service, complementing the bacterial culture results.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Número de casos e de países que notificaram cólera por ano, de 1995 a 2004	33
Figura 2.	Série histórica de casos e óbitos por cólera. Brasil, 1991-2003	34
Figura 3.	Microscopia eletrônica do bacilo em forma de vírgula de <i>V. cholerae</i>	35
Figura 4.	<i>Vibrio cholerae</i> com seu flagelo polar característico	36
Figura 5.	Estrutura genética de <i>V. cholerae</i> . A: cromossomo I. B: cromossomo II.	37
Figura 6.	Aquisição por <i>V. cholerae</i> do gene cluster TCP no ambiente aquático e infecção da bactéria pelo fago CTX ϕ no meio intestinal	38
Figura 7.	Estrutura em anel da molécula da toxina colérica. Em azul a subunidade A e, em vermelho, os monômeros da subunidade B	39
Figura 8.	Mecanismo de ação da toxina colérica no epitélio intestinal	40
Figura 9.	Representação esquemática das etapas realizadas para isolamento e identificação de <i>V. cholerae</i> O1 a partir de amostra de fezes	41
Figura 10.	Esquema representativo das regiões do profago CTX ϕ e do conjunto de genes <i>rfb</i> . A: Região <i>core</i> do profago CTX ϕ e localização dos <i>primers</i> <i>ctxA</i> internos e externos. B: Conjunto de genes <i>rfbE-rfbW</i> e localização dos <i>primers</i> <i>rfbN</i>	55
Figura 11.	Esquema representativo das formas de adição dos <i>primers</i> <i>rfbN</i> à STNPCR utilizando um gene alvo. A: 20 pmol na tampa do tubo; B: 20 pmol na tampa e 20 pmol na mistura de reação e C: 20 pmol na mistura de reação	56
Figura 12.	Reação de PCR simples com temperatura de anelamento de 50 °C (A) e 55 °C (B). A: Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: CP <i>rfbN</i> ; 2: CN <i>rfbN</i> ; 3: CP <i>ctxA</i> interno; 4: CN <i>ctxA</i> internos; 5: CP <i>ctxA</i> externos; 6: CN <i>ctxA</i> externos. B: Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: CN <i>rfbN</i> ; 2: CP <i>rfbN</i> ; 3: CN <i>ctxA</i> interno; 4: CP <i>ctxA</i> internos; 5: CN <i>ctxA</i> externos; 6: CP <i>ctxA</i> externos	62
Figura 13.	Adição dos <i>primers</i> <i>rfbN</i> à STNPCR. Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: 20 pmol de <i>rfbN</i> na tampa do tubo; 3: 20 pmol de <i>rfbN</i> na tampa e 20 pmol na mistura de reação; 5: 20 pmol de <i>rfbN</i> na mistura de reação; 2, 4 e 6: controles negativos	63
Figura 14.	Proporção entre <i>primers</i> <i>ctxA</i> internos (<i>ctxAi</i>); <i>ctxA</i> externos (<i>ctxAe</i>) e <i>rfbN</i> (pmol): A: 40:2:20 (<i>ctxAi</i> : <i>ctxAe</i> : <i>rfbN</i> , respectivamente); B: 20:2:20 (<i>ctxAi</i> : <i>ctxAe</i> : <i>rfbN</i> , respectivamente) e C: 20:2:10 (<i>ctxAi</i> : <i>ctxAe</i> : <i>rfbN</i> , respectivamente). Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: 20ng; 2: 100pg; 3: 10pg; 4: 1pg e 5: CN	64

- Figura 15.** Limiar de detecção de DNA de *V. cholerae*, através da MSTNPCR. Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 1 fg e 9: CN (controle negativo) 65
- Figura 16.** Limiar de detecção da MSTNPCR, quando a técnica foi realizada diretamente da cultura em APA. Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: CP; 2: 10; 3: 10^{-1} ; 4: 10^{-2} ; 5: 10^{-3} ; 6: 10^{-4} ; 7: 10^{-5} ; 8: 10^{-6} ; 9: 10^{-7} ; 10: 10^{-8} ; 11: CN 66
- Figura 17.** Especificidade da MSTNPCR. Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: *Aeromonas* sp.; 2: *E. coli*; 3: *Enterobacter* sp.; 4: *Klebsiella* sp.; 5: *Pseudomonas* sp.; 6: *Salmonella* sp.; 7: *Shigella* sp.; 8: *V. alginolyticus*; 9: *V. mimicus*; 10: *V. parahaemolyticus*; 11: DNA de todas as bactérias, inclusive de *V. cholerae* O1; 12: CP e 13: CN. 67
- Figura 18.** Alinhamento pelo programa BLAST da seqüência correspondente ao fragmento ctxA 68
- Figura 19.** Alinhamento pelo programa BLAST da seqüência correspondente ao fragmento rfbN 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Casos e óbitos por cólera notificados à WHO em 2004	42
Tabela 2.	Resultados de vários testes bioquímicos para <i>V. cholerae</i>	43
Tabela 3.	Características fenotípicas dos biotipos clássico e El Tor de <i>V. cholerae</i> O1	44
Tabela 4.	Seqüências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados e tamanho dos fragmentos amplificados	57
Tabela 5.	Proporções entre <i>primers</i> <i>ctxA</i> externos, <i>ctxA</i> internos e <i>rfbN</i> utilizadas no trabalho. Em destaque, a proporção que apresentou melhor reprodutibilidade.	58
Tabela 6.	Quantidade das unidades formadoras de colônias presentes em cada diluição e a localização destas na figura 16	70

LISTA DE ABREVIATURAS

bp/pb	Base pairs / Pares de Bases
CDC	Center of Diseases Control / Centro de Controle de Doenças
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CT	Toxina Colérica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxiribonucleotídeos trifosfato
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
kb	Kilobase
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	Ministério da Saúde
MSTNPCR	Multiplex single tube nested PCR / Multiplex nested PCR em tubo único
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PM	Peso Molecular
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
STNPCR	Single tube nested PCR / nested PCR em tubo único
TCBS	Ágar Tioossulfato Citrato e Sais Biliares
TM	Temperatura de Anelamento
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VNC	Viável mas não cultivável
WHO	World Health Organization / Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 HISTÓRICO	15
2.2 MODO DE TRANSMISSÃO	17
2.3 DOENÇA	18
2.4 SITUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA CÓLERA NO MUNDO E NO BRASIL	19
2.5 AGENTE ETIOLÓGICO	21
2.5.1 <u>Genoma bacteriano</u>	23
2.5.2 <u>Patogenicidade</u>	24
2.6 <i>VIBRIO CHOLERA</i> E O MEIO AMBIENTE	26
2.7 DIAGNÓSTICO	27
2.7.1 <u>Cultura</u>	28
2.7.2 <u>Testes imunológicos</u>	29
2.7.3 <u>Métodos moleculares</u>	29
2.7.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase	30
2.7.3.2 Nested PCR em tubo único	31

3 JUSTIFICATIVA	45
4 PERGUNTA CONDUTORA	46
5 HIPÓTESE	47
6 OBJETIVOS	48
6.1 OBJETIVO GERAL	48
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
7 MATERIAL E MÉTODOS	49
7.1 BACTÉRIAS E EXTRAÇÃO DE DNA	49
7.2 <i>PRIMERS</i>	49
7.3 PADRONIZAÇÃO DA MSTNPCR	50
7.4 PROGRAMAS DE AMPLIFICAÇÃO	51
7.4.1 <u>PCR simples</u>	51
7.4.2 <u>MSTNPCR</u>	51
7.5 LIMIAR DE DETECÇÃO DE <i>V. CHOLERA</i> O1 PELA MSTNPCR	52
7.5.1 <u>Utilizando DNA purificado</u>	52
7.5.2 <u>Diretamente da cultura em meio de enriquecimento</u>	52
7.6 ESPECIFICIDADE DA MSTNPCR	53
7.7 MONTAGEM E VALIDADE DE <i>KITS</i> DIAGNÓSTICOS	54
7.8 REPRODUTIBILIDADE	54
7.9 SEQÜENCIAMENTO	54
8 RESULTADOS	59
8.1 PADRONIZAÇÃO DA MSTNPCR	59
8.2 LIMIAR DE DETECÇÃO DE <i>V. CHOLERA</i> O1 DA MSTNPCR	60
8.2.1 <u>Com DNA purificado</u>	60
8.2.2 <u>Diretamente da cultura em meio de enriquecimento</u>	60

8.3 ESPECIFICIDADE DA MSTNPCR	60
8.4 ESTABILIDADE DE <i>KIT</i> DIAGNÓSTICO	61
8.5 REPRODUTIBILIDADE	61
8.6 SEQÜENCIAMENTO	61
9 DISCUSSÃO	71
10 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ARTIGO	88

1 INTRODUÇÃO

Vibrio cholerae O1 toxigênico é o principal agente causador da cólera, doença que acomete o homem e caracteriza-se por diarreia abundante acompanhada de vômitos. O indivíduo acometido, rapidamente, chega à desidratação severa, choque hipovolêmico, coma e morte. A infecção está muito associada a condições sanitárias precárias, uma vez que a transmissão é relacionada com a água.

No Brasil ela é endêmica, acontecendo surtos periódicos, especialmente, na Região Nordeste do país (GONÇALVES; HOFER, 2005) e é classificada pelo Ministério da Saúde como uma doença de notificação compulsória, de acordo com a Lei nº 6.259 de 30/10/1975. Todos os casos diagnosticados devem ser comunicados à Secretaria Estadual de Saúde, que repassa as informações ao Ministério da Saúde, e este à Organização Mundial de Saúde – WHO (MS, 2006).

Desde 1992, quando a 7ª epidemia de cólera chegou ao nordeste do Brasil, a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES-PE), na tentativa de controlar o número de casos, e posteriormente, de impedir nova epidemia, implantou um programa de investigação epidemiológica que pesquisa a presença do vibrião em mananciais aquáticos de regiões onde os surtos ocorrem (GONÇALVES; HOFER, 2005).

Esta pesquisa utiliza como método de diagnóstico a cultura bacteriana em meio seletivo para *V. cholerae*. Contudo, tal prática requer um número consideravelmente alto de bacilos vivos, sendo inábil em detectar bactérias mortas ou em seu estado viável mas não cultivável (VNC).

As formas moleculares de diagnóstico, em particular aquelas que têm como base a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizadas como uma alternativa ao diagnóstico tradicional já que apresentam alta sensibilidade e permitem a detecção de

microrganismos vivos ou mortos, cultiváveis ou não. Assim, uma vez que estejam bem padronizadas e otimizadas, estas técnicas podem ser utilizadas como método alternativo complementar ao diagnóstico clássico.

Uma variação da PCR tradicional, a nested PCR em tubo único (STNPCR) desenvolvida por Abath et al (2002), revelou-se bastante útil na detecção de alguns microrganismos infecciosos, tais como *Plasmodium* sp. (MONTENEGRO et al, 2004) *Yersinia pestis* (SOUZA et al, 2005), *Schistosoma mansoni* (MELO et al, 2006) e *Micobacterium tuberculosis* (Haiana Schindler – dados não publicados). No caso particular da cólera, o método utilizando um gene alvo foi capaz de detectar até 1 pg de DNA do vibrião colérico presente na amostra (MENDES; LEAL, 2005).

O presente trabalho propõe uma alteração na STNPCR para diagnóstico de cólera, que consiste na adição, à reação, de um par de *primers* direcionados ao gene *rfbN*, específico para o sorogrupo O1 de *V. cholerae*, possibilitando detectar bacilos pertencentes a este sorogrupo, sejam eles toxigênicos ou não. Além disso, foram objetivos detectar a presença do bacilo diretamente do meio de cultura, avaliar a especificidade da técnica para detecção de *V. cholerae* O1 e testar a estabilidade de um *kit* diagnóstico quando estocado a -20 °C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

A origem etimológica da palavra cólera provoca divergências entre os historiadores. Alguns autores acreditam que a palavra deriva de dois termos gregos: *chole* e *rein*, que significaria “vazão da bile” (LACEY, 1995). Outros sugerem que o termo *cholera*, em grego, quer dizer “calha do telhado”, e que os gregos teriam associado o forte fluxo de água que escoava pelas calhas durante uma tempestade, à diarreia intensa que a cólera provoca (BARUA; GREENOUGH, 1991).

Documentos em sânscrito datados de aproximadamente 500 a 400 a.C. descrevem uma doença semelhante à cólera, e há registros históricos da infecção há mais de 2000 anos. Contudo, somente a partir de 1817 é que a literatura cita a doença. Acredita-se que até então a cólera era esporádica e só veio atingir sua forma epidêmica a partir daquele ano, quando ocorreu a primeira pandemia, que só terminou em 1823 (COLWELL, 1996a).

No total são descritas sete pandemias, sendo que a primeira ficou limitada à região entre a Pérsia e a Turquia, que estavam em guerra. Foi durante a segunda pandemia (1829-1851) que John Snow propôs um estudo sobre o modo de transmissão da cólera, relacionando-a à água de beber e aos efluentes (COLWELL, 1996a). Em 1855, durante a terceira pandemia (1852-1859), a doença atingiu o Brasil pela primeira vez (GONÇALVES; HOFER, 2005).

À quarta pandemia (1863-1879) seguiu-se a quinta (1881-1896) e a sexta (1899-1923). Somente em 1884, o bacteriologista alemão Robert Koch (1843-1910) isolou o agente etiológico *V. cholerae* O1, a partir da água de um tanque em Calcutá. Em tal tanque, cuja água destinava-se ao consumo, fora lavada a roupa de cama do primeiro doente daquela região (THOMPSON, 2004; GONÇALVES; HOFER, 2005).

Devido às melhorias no abastecimento de água e nas condições sanitárias, diversos países tornaram-se livres de cólera, e acreditava-se que não haveria outra pandemia (COWELL, 1996a).

Entretanto, em 1961, na atual Indonésia, a doença re-emergiu em sua sétima forma pandêmica, espalhando-se rapidamente por vários continentes. Em 1991 atingiu a América do Sul num surto que teve origem no Peru, e daí espalhou-se pelos países vizinhos, inclusive o Brasil (FARUQUE et al, 1998).

Embora os sintomas clínicos da doença sejam bem menos severos que aqueles das seis primeiras pandemias (COWELL, 1996a), a sétima tem sido mais extensa no que se refere a distribuição geográfica e duração (FARUQUE et al, 1998).

Em 1992 teve início, na Índia, uma epidemia de cólera causada por um novo sorogrupo, posteriormente classificado como O139 ou Bengal, por ter sido isolado da Baía de mesmo nome (SHIMADA et al, 1993).

No ano seguinte, a epidemia espalhou-se por países vizinhos e surtos causados por este novo sorogrupo têm sido confirmados, desde então, em vários países da Ásia. Além disso, casos importados foram notificados no Reino Unido e nos Estados Unidos da América (COLWELL, 1996a).

Uma vez que *V. cholerae* O139, juntamente com O1, continuam causando cólera na Índia e em Bangladesh, e caso os surtos provocados por este novo sorogrupo continuassem a surgir, acreditava-se que estaria instalada a oitava pandemia (FARUQUE et al, 1998). No entanto, isto ainda não ocorreu.

2.2 MODO DE TRANSMISSÃO

Atualmente sabe-se que a cólera é uma doença de veiculação hídrica e que a transmissão é feita, principalmente, pela via fecal-oral, sendo o homem o único portador conhecido até a década de 70, quando estudos indicando a existência de reservatórios ambientais começaram a ser publicados (ISLAM et al, 1994).

Contudo, nem sempre foi assim. Até a primeira metade do século XVII, devido à crença na teoria miasmática, acreditava-se que a cólera era transmitida pelo ar. Somente a partir de 1854, graças aos estudos de Snow, é que ficaram provadas as vias de transmissão da doença (SACK et al, 2004).

Naquela época, era comum acreditar que a cólera era transmitida de pessoa para pessoa devido a um “veneno específico”. Snow concluiu que tal veneno seriam partículas fecais que, quando presentes na água de beber, transmitiam a infecção (FROST, 1999).

A transmissão direta pessoa a pessoa é favorecida por falta de asseio pessoal, em particular pela falta do hábito de lavar as mãos antes das refeições ou ao prepará-las. Esta conduta promove a difusão da doença quando indivíduos que tratam os doentes tocam nas roupas e objetos destes, que são destituídos de cor e odor apesar de infectados pelas evacuações constantes, e não lavam as mãos depois (SNOW, 1854).

Entretanto, a principal conclusão, especialmente do ponto de vista epidemiológico, a que chegou Snow sobre a transmissão desta infecção é que a cólera está diretamente relacionada ao sistema de abastecimento de água de uma localidade. Ele verificou que água contaminada com dejetos de doentes era a principal forma de propagação da doença (SNOW, 1854). A infecção colérica também pode ser “transportada”, através da descarga de lastros de navios provenientes de lugares onde a cólera é epidêmica (COLWELL, 1996a).

É devido a capacidade de propagar-se pela água que a cólera difunde-se tão rapidamente nas coletividades. Todavia, há indícios de que a difusão aquática não explica a rapidez com que a doença atinge áreas tão distantes, e que tal fato seria mais bem justificado pelo crescimento exacerbado e inesperado de fitozooplâncton que carregariam células bacterianas de um lugar para outro (COLWELL, 1996a).

A dose infectante de *V. cholerae* varia de 10^6 a 10^{11} UFC (REIDL; KLOSE, 2002), sendo que alcalinização do suco gástrico reduz a dose média de 10^9 para 10^4 (GONÇALVES; HOFER, 2005). É importante atentar para a existência de portadores sãos que eliminam bactérias intermitentemente por vários meses e até anos, e uma vez que a relação doente portador é de 1/25 a 1/100, estes indivíduos têm grande importância na disseminação da doença (MS, 2006).

2.3 DOENÇA

O período de incubação da cólera varia entre 18 horas e 5 dias, após os quais os sintomas começam abruptamente (SACK et al, 2004). De acordo com Gonçalves e Hofer (2005), as formas clínicas da doença apresentam muitas variações, dentre as quais destacam-se a cólera seca, clássica e benigna.

A primeira é a forma mais grave, na qual o indivíduo infectado entra em choque e vai a óbito rapidamente. Nesta forma da doença não há tempo sequer de ocorrerem diarreias devido a uma “paralisação intestinal”, o que provoca a retenção de líquido nas alças intestinais (GONÇALVES; HOFER, 2005).

Na forma clássica, que caracterizou as seis primeiras pandemias, a diarreia típica em água de arroz é contínua e acompanhada de vômitos, com ou sem presença de cólicas. Hipertemia é rara em adultos mas pode acometer crianças. À medida que a diarreia torna-se

mais intensa, instalam-se rápida perda de peso, câimbras musculares, delírio, estado comatoso e morte (GONÇALVES; HOFER, 2005).

A forma benigna da cólera é aquela onde não há sintomatologia aparente e a doença só pode ser diagnosticada através de exames laboratoriais. Podem ocorrer muitas variações entre as formas clássica e benigna, onde os sintomas e sua intensidade podem divergir entre os indivíduos (GONÇALVES; HOFER, 2005).

O coeficiente de mortalidade quando do não-tratamento da doença é de cerca de 50% (SACK et al, 2004), caindo para 1-5% quando o tratamento é instituído rapidamente (THOMAS, 1970). Este consiste de reidratação, para repor os fluidos perdidos, corrigir a acidose metabólica e a deficiência de potássio, juntamente com a antibioticoterapia (tetraciclina, ampicilina ou trimetoprima e sulfametaxazol). Além de simples, é muito eficaz, quando é administrado tão logo comecem os sintomas (SACK et al, 2004).

2.4 SITUAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA CÓLERA NO MUNDO E NO BRASIL

A cólera é endêmica em, pelo menos, 80 países do mundo e o número de casos varia entre 110.000 a 200.000 por ano. Oficialmente ocorrem 5.000 mortes causadas pela infecção a cada ano, porém, devido à subnotificação da doença, estima-se que esse número seja bem maior (WHO, 2004). As seis primeiras pandemias tiveram início na Ásia e a sétima começou na Indonésia e espalhou-se rapidamente para Ásia, Europa, África, chegando, finalmente, à América Latina em 1991, que esteve livre da cólera por mais de um século. Naquele ano foram notificados, aproximadamente, 400.000 casos e mais de 4.000 óbitos em 16 países americanos (WHO, 2006a).

Na figura 1 está demonstrado o número de casos e de países que notificaram a ocorrência de cólera à WHO desde o ano de 1995 até 2004 (WHO, 2005). Em 2003, a WHO

divulgou um total de 111.575 casos de cólera em 45 países, dos quais 1.894 evoluíram para a morte (CDC, 2004).

Cinquenta e seis países notificaram à WHO em 2004, um total de 101.383 casos e 2.345 mortes, sendo que a grande maioria dos casos (95%) ocorreu na África, seguida da Ásia, Américas, Europa e Oceania. Apenas cinco países americanos registraram casos, sendo eles Brasil, Colômbia e Equador com 21, dois e cinco casos respectivamente, e Estados Unidos da América e Canadá, com cinco e três casos importados, respectivamente (WHO, 2005).

A tabela 1 mostra o total de casos e mortes por continente, em 2004. Do total de 36 casos notificados pelas Américas, 21 foram registrados pelo Brasil, todos autóctones (WHO, 2005). Em 2005, as Américas comunicaram à WHO um total de 12 casos, sendo cinco deles registrados pelo Brasil (WHO, 2006b).

A cólera foi reintroduzida no Brasil em abril de 1991 através da parte alta do Rio Solimões na região Amazônica, na margem Peru-Colômbia, e daí espalhou-se pelas outras regiões (HOFER, 1993). No Brasil, é classificada como doença reemergente e acomete, principalmente, as Regiões Norte e Nordeste, áreas onde o saneamento é precário e, muitas vezes inexistente (SVS, 2006).

No Brasil, a doença experimentou seu pico epidêmico em 1993, porém os esforços do sistema de saúde conseguiram reduzir o número de casos significativamente, apesar da insatisfatória condição sanitária de parte da população, o que cria um ambiente favorável para a disseminação e persistência desta infecção (SES - SP, 2003). Uma campanha nacional de combate à cólera foi desenvolvida e, em 1994, a doença começou a retroceder (GUTHMANN, 1995). Na figura 2 estão os números de casos e óbitos pela doença entre os anos de 1991 a 2003.

No ano de 2000, a cólera apresentou uma redução importante, tanto no número de casos, como na área geográfica em que se manifestava, sendo registrados 733 casos em todo o país, os quais atingiram, principalmente, dois estados da Região Nordeste: Pernambuco e Alagoas. Já no ano de 2001, foram notificados apenas sete casos da doença em todo o país, também concentrados na Região Nordeste, sendo quatro no Ceará, um em Pernambuco, um em Alagoas e um em Sergipe (SVS, 2005a).

Em 2002 e 2003, apesar de não ter sido registrado nenhum caso da doença em território brasileiro, o agente etiológico da cólera, o *V. cholerae* O1, foi isolado de seis amostras ambientais, todas não-toxigênicas. Ainda em 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da pesquisa em água de lastro de navios aportados em Belém – PA e Recife – PE, verificou a presença de duas cepas toxigênicas de *V. cholerae* O1 (SVS, 2006).

Dados obtidos entre os anos de 2001-2003, indicavam que a cólera estava sob controle no país e que, se essa tendência fosse mantida, a doença passaria a integrar o grupo das enfermidades transmissíveis declinantes. Contudo, em março de 2004, foram confirmados 21 casos da doença, num surto que acometeu o município de São Bento do Una, no Estado de Pernambuco, e em janeiro de 2005, mais cinco casos de cólera foram notificados, sendo quatro naquele município e um em Recife (SVS, 2005b).

2.5 AGENTE ETIOLÓGICO

Vibrio cholerae, agente causador da infecção colérica, foi descrito por Robert Koch, bacteriologista alemão, em 1884, que o denominou “*kommabacillus*” devido à sua forma de coma, ou seja, vírgula (FINKELSTEIN, 2005), como mostra a figura 3.

Microrganismos pertencentes à família Vibrionaceae e ao gênero *Vibrio* são bactérias Gram-negativas, na forma de bacilos curvos, com presença de flagelo polar (figura 4). São anaeróbios facultativos, não formam esporos e produzem citocromo-oxidase, característica que os diferencia das bactérias da família Enterobacteriaceae (GONÇALVES; HOFER, 2005). Seu hábitat natural é o ambiente aquático e crescem bem em meio de isolamento, sendo que a adição de NaCl 1% ao meio favorece a multiplicação bacteriana (REIDL; KLOSE, 2002).

A membrana externa de bactérias Gram-negativas é constituída de lipopolissacarídeos (LPS), que representam os determinantes antigênicos somáticos “O” (KONEMAN, 2001). Em *V. cholerae*, enzimas necessárias à biossíntese dos LPS são codificadas pelos genes *rfb* (FALLARINO et al, 1997) que são específicos para o antígeno “O” (ISLAM et al, 1992).

Com base em tal antígeno, *V. cholerae* é subdividido em mais de 200 sorogrupos (YAMAI et al, 1997), sendo que apenas os sorogrupos O1 e O139 são capazes de provocar epidemias (SACK et al, 2004). O sorogrupo O1 é dividido nos biotipos clássico, agente das seis primeiras pandemias, e El Tor, causador da pandemia atual. O biotipo El Tor produz menos toxina, porém possui maior resistência ao meio ambiente, o que o torna mais propenso a endemização (MS, 1992).

Cada um destes biotipos é subdividido em três sorotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima. Cepas Ogawa expressam os antígenos A e B, e uma pequena quantidade do antígeno C, enquanto cepas Inaba produzem apenas os antígenos A e C. Cepas do sorotipo Hikojima expressam os três antígenos, só que são muito raras e instáveis (SACK et al, 2004).

Cepas de *V. cholerae* que não aglutinam com antisoro O1 nem O139, apesar de incomum, podem ser patogênicas e alguns estudos associam tais cepas a surtos de doença diarréica (ALDOVA et al, 1968; DAKIN et al, 1974) sem, contudo, possuírem capacidade de

provocar epidemias (SACK et al, 2004). Além disso, são causadoras de infecções extra-intestinais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (KO et al, 1998).

Tendo em vista a dinâmica de transferência horizontal de genes de virulência entre os diferentes sorogrupos, deve-se considerar as cepas não-O1/não-O139 como patogênicas em potencial, dispensando a mesma atenção dada àquelas O1 e O139 (KARAOLIS et al, 1999; HEIDELBERG et al, 2000).

Assim como outras bactérias Gram-negativas, cepas de *V. cholerae* O1 podem transformar-se de lisas a rugosas (ROCHETTA et al, 1999). Tais cepas rugosas são isoladas, ocasionalmente, de pacientes convalescentes e de portadores crônicos do vibrião (SACK; MILLER, 1969). Pouco se conhece a respeito do potencial patogênico das cepas rugosas, mas Rice et al (1993) afirmam que o estado rugoso da bactéria é uma forma de proteção contra agentes externos, e que cepas em tal estado permanecem infecciosas. Além disso, em um estudo realizado por Islam et al (2004), não houve diferenças estatisticamente significativas a respeito da patogenicidade de cepas lisas e rugosas.

2.5.1 Genoma Bacteriano

O genoma de *V. cholerae* O1 consiste de dois cromossomos circulares de 2.961.146 bp e 1.072.314 bp, sendo denominados cromossomo I (maior) e cromossomo II (menor), respectivamente (figura 5). Juntos, os dois cromossomos codificam 3.855 *open reading frames* (ORF's) ou códigos abertos de leitura (HEIDELBERG et al, 2000).

No cromossomo maior estão localizados a maioria dos genes necessários ao crescimento e à viabilidade bacteriana, tais como genes relacionados à replicação, reparo, transcrição e tradução do DNA e à biossíntese da parede celular, por exemplo. Apesar de a maioria dos genes presentes no cromossomo menor não terem função conhecida, alguns genes

essenciais à função celular normal e genes que codificam vários intermediários de vias metabólicas da bactéria estão localizados apenas neste cromossomo. Nele está presente a região de integração, uma ilha de captura de genes, na qual estão contidos genes que conferem resistência a antibióticos e que expressam enzimas necessárias ao metabolismo do DNA (HEIDELBERG et al, 2000).

No cromossomo I de *V. cholerae* O1 El Tor há apenas uma cópia dos genes *ctxAB*, os quais encontram-se integrados ao genoma do fago lisogênico CTX ϕ de 6,9 kb. O genoma deste fago é composto por 2 domínios funcionalmente distintos: o *core* ou região central, e a região RS2. No *core*, além dos genes *ctxAB*, estão presentes genes relacionados à morfogênese e ao empacotamento do bacteriófago. Na região RS2 estão inclusos genes necessários à replicação, integração e regulação de CTX ϕ : *rstA*, *rstB* e *rstR*, respectivamente (HEIDELBERG et al, 2000).

O cromossomo I de *V. cholerae* abriga o conjunto de genes *rfb* que codificam enzimas necessárias à síntese do antígeno “O” do LPS da bactéria, sendo *rfbN* específico para o sorogrupo O1 do vibrião (ISLAM et al, 1992; FALLARINO et al, 1997).

É também no cromossomo maior, fazendo parte da ilha de patogenicidade (VPI) de 40 kb, que está presente o fago VPI ϕ (KARAOLIS et al, 1998), no qual está contido o conjunto de genes reguladores TCP (toxin co-regulated pillus). Uma vez que *V. cholerae* adquire VPI ϕ e expressa o gene *tcpA*, a bactéria torna-se susceptível à infecção pelo CTX ϕ , já que *tcpA* é receptor deste fago (WALDOR; MEKALANOS, 1996; REIDL; KLOSE, 2002).

2.5.2 Patogenicidade

A patogenicidade de *V. cholerae* O1 depende, principalmente, da presença dos genes *ctxAB* e *tcpA*. Os genes *ctxAB* expressam as subunidades A e B da toxina colérica (CT),

enquanto que *tcpA* permite a aderência da bactéria e sua colonização na parede intestinal (HERRINGTON et al, 1988).

De acordo com Faruque et al (1998), a transformação de cepas não-patogênicas em patogênicas eventualmente acontece dentro do hospedeiro, se o mesmo ingerir cepas não-toxigênicas juntamente com fagos CTX ϕ e VPI ϕ que se encontram livres no meio ambiente. Assim, no intestino delgado, CTX ϕ infecta as bactérias ao reconhecer seu receptor TCP, e tem início o processo de colonização, multiplicação e produção de CT (figura 6).

O peso molecular de CT é de 84.000 dáltons, e ela é composta de 2 subunidades: A (ativa) e B (de ligação). A subunidade A, de PM=27.000 dáltons, é formada por dois peptídeos: A₁ e A₂. A₁ apresenta atividade tóxica enquanto A₂ promove a entrada de A₁ nas células. A subunidade B, formada por cinco monômeros idênticos de PM =11.500 dáltons cada um, permite a ligação da molécula da toxina aos receptores gangliosídicos GM1 presentes nas células do epitélio intestinal. A subunidade A é envolvida pelos monômeros da subunidade B, como mostrado na figura 7 (FINKELSTEIN, 2005).

Uma vez ligada às células intestinais, a molécula da CT sofre uma alteração conformacional para permitir a entrada da subunidade A₁ nestas células. Após vários eventos bioquímicos sucessivos, há um aumento na concentração de AMP cíclico intracelular que impede a reabsorção de íons de Na⁺⁺ pelas células intestinais e a excreção de bicarbonato de Na⁺⁺ e de K⁺ para a luz intestinal (figura 8). Assim, a água flui passivamente das células epiteliais para a luz intestinal, causando a diarreia profusa característica da cólera (FINKELSTEIN, 2005).

2.6 *Vibrio cholerae* E O MEIO AMBIENTE

O ciclo de vida de *V. cholerae* é constituído de uma fase dentro do hospedeiro humano e de outra no ambiente aquático (COLWELL, 1996a), como pode ser observado na figura 6. Em seu hábitat aquático natural, a bactéria pode encontrar-se em cinco diferentes estágios: uma forma independente ou livre, em simbiose com fitoplâncton (LACEY, 1995), em comensalismo com zooplâncton (BARUA; GREENOUGH, 1991), em seu estado viável mas não-cultivável (VNC) e como biofilme aderido a superfícies quitinosas ou abióticas (COLWELL, 1996a).

O ciclo biológico ambiental de *V. cholerae* está diretamente relacionado a mudanças sazonais tais como temperatura, salinidade, pH, tensão de O₂ e fonte de nutrientes encontradas na água (ROSZAK; COLWELL, 1987).

Rivera et al (2001) descreveram que a incidência variável dos fatores de virulência em isolados ambientais de *V. cholerae* O1 depende da fonte ou do ecossistema (água do mar, frutos do mar, amostras clínicas, água de esgoto) do qual a cepa foi isolada, e que a resposta a mudanças nas condições climáticas ocorrem pela expressão de genes que promovem o crescimento em cada nicho. Entretanto, o mecanismo pelo qual mudanças ambientais afetam a expressão de fatores de virulência em *V. cholerae* O1 permanece pouco esclarecido.

Nos períodos inter-epidêmicos, quando há privação de nutrientes e condições de estresse, que envolvem temperatura e salinidade da água, *V. cholerae* entra em seu estado VNC, o qual representa um estágio semelhante ao de esporo em outras bactérias (COLWELL, 1996a).

Estas células permanecem infecciosas e podem persistir por longos períodos em ambientes aquáticos (COLWELL, 1996a). Assim, a reativação destas células pode levar a novos surtos de cólera, o que é um problema para a Saúde Pública (FARUQUE et al, 1998).

Há uma correlação entre o perfil epidêmico da cólera e transições climáticas, e isto pode ser explicado pelo fato de que “uma vez que o *V. cholerae* reside numa reserva ambiental estável, mudanças na precipitação de chuvas e na incidência da luz solar ocasionam sua emergência periódica e transitória como patógeno humano” (COLWELL, 1996b). Também há uma relação direta entre surtos da doença colérica e a ocorrência de “*blooms*” (grande propagação) de algas, mas não existem evidências de que este evento seja causa de epidemias (REIDL; KLOSE, 2002).

O monitoramento bacteriológico de ecossistemas aquáticos é um dos pontos básicos instituídos para o rastreamento de *V. cholerae* O1. Essa atividade é muito importante em áreas endêmicas, principalmente naquelas consideradas de riscos para a cólera. O monitoramento molecular de ecossistemas microbianos pode ser de grande ajuda para controle de doenças veiculadas pela água, sobretudo diante da possibilidade da presença de microrganismos VNC que não podem ser detectados pela cultura bacteriana (BINSZTEIN et al, 2004).

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser realizado através da observação de sintomas como número de evacuações líquidas, fezes com aspecto de “água de arroz”, vômitos, espasmos musculares, grau de desidratação e choque hipovolêmico (VILCHIS-GUIZAR et al, 1999). Entretanto, para confirmação do diagnóstico é necessário realizar testes laboratoriais uma vez que, na maioria dos casos, os sintomas acima descritos não são tão evidentes (GONÇALVES; HOFER, 2005).

2.7.1 Cultura

A cultura bacteriana é o método considerado padrão-ouro para o diagnóstico da cólera. Após o enriquecimento da amostra em água peptonada alcalina (APA), é realizado o cultivo em meio seletivo (ágar tiosulfato citrato e sais biliares - TCBS), que é incubado por 24 horas a 37 °C (CDC, 1999).

Devido à capacidade de fermentar a sacarose presente no meio, as colônias apresentam coloração amarela, de aspecto liso, medindo entre dois e quatro milímetros de diâmetro, com centro opaco e periferia transparente (MS, 1992). Posteriormente, são realizados testes bioquímicos, tais como, oxidase, lisina descarboxilase e motilidade para confirmação do diagnóstico, dentre outros. A figura 9 mostra os passos para isolamento e identificação de *V. cholerae*, e a tabela 2 mostra o resultado de algumas provas bioquímicas para *V. cholerae*, em meio de triagem (MS, 1992).

A diferenciação entre os biotipos Clássico e El Tor de *V. cholerae* pode ser feita com base em características fenotípicas, como mostra a tabela 3 (GONÇALVES; HOFER, 2005). Após o isolamento da bactéria, é realizada a sorologia, primeiramente, com antisoro polivalente dos sorogrupos O1 e O139, e então com antisoro monovalente tipo específico (Inaba ou Ogawa) para confirmação. Depois destas etapas, realiza-se o antibiograma para avaliação da suscetibilidade a drogas antimicrobianas (MS, 1992) e o teste de ELISA para pesquisa da CT (CDC, 1994). No Brasil, o teste para detecção da CT só é realizado pelo laboratório de referência em cólera, localizado no Instituto Oswaldo Cruz – RJ.

2.7.2 Testes imunológicos

Há alguns anos são utilizados sistemas rápidos para detecção de *V. cholerae*, baseados na interação antígeno-anticorpo. Os primeiros métodos faziam uso de anticorpos policlonais que identificavam a bactéria diretamente do meio de cultura (RAHMAN et al, 1989), entretanto tais anticorpos não eram específicos.

Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, os resultados tornaram-se mais confiáveis. Atualmente há técnicas que utilizam estes anticorpos adsorvidos sobre partículas de látex ou marcados com ouro coloidal. Uma vez que entrem em contato com *V. cholerae* O1, os anticorpos reagem com o bacilo, formando um complexo antígeno-anticorpo. Utiliza-se, então, um anticorpo policlonal, específico para este complexo, fixado sobre uma membrana de nitrocelulose, o que torna possível a visualização do resultado (COLWELL et al, 1992; CARRILLO et al, 1994; HASAN et al, 1994). Mais recentemente, foi desenvolvido um sistema imunocromatográfico (*dipstick*) para detecção de *V. cholerae* O1 e O139 (NATO et al, 2003). Contudo, ainda existem poucos estudos demonstrando a validade deste método.

2.7.3 Métodos moleculares

Com o advento da biotecnologia, várias formas moleculares de diagnóstico vêm sendo desenvolvidas que, além de sensíveis, são rápidas de serem realizadas (BERTOLINI et al, 2003).

2.7.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase

Dentre os métodos moleculares, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis & Faloona (1987). Nesta técnica, uma sequência-alvo do ácido nucléico é identificada e amplificada exponencialmente até que o ácido nucléico alcance uma concentração suficiente para ser detectado.

A PCR consiste de três etapas fundamentais que correspondem a um ciclo da reação: desnaturação da fita dupla do DNA, anelamento e extensão dos *primers*. Cada etapa é realizada a uma temperatura diferente e, ao final de 30 a 50 ciclos térmicos, a quantidade desejada do DNA-alvo é alcançada, tornando possível sua detecção (MULLIS; FALOONA, 1987). Por ser uma técnica altamente sensível, exige-se um rigoroso controle de qualidade a fim de não promover resultados falsos (ABATH et al, 2002). A presença de genes de virulência em *V. cholerae* O1 foi evidenciada por PCR, demonstrando que esta técnica é útil na pesquisa desta bactéria (GHOSH et al, 1997; CHAKRABORTY et al, 2000; DALSGAARD et al, 2001; LEAL et al, 2004).

Modificações na técnica de PCR para aperfeiçoar o diagnóstico são frequentes. Uma destas alterações é a Multiplex-PCR, que consiste na utilização de mais de um par de *primers*, o que possibilita detectar mais de um organismo na mesma reação ou mais de uma sequência-alvo em um mesmo organismo (HENEGARIU et al, 1997). Vários estudos demonstraram, com sucesso, a utilização desta variação da técnica de PCR para detecção de *V. cholerae* O1 (KONG et al, 2002; RIVERA et al, 2003; PANICKER et al, 2004).

Outra variação bastante utilizada é a nested PCR, onde um segundo ciclo de amplificação é realizado, utilizando como alvo o produto da primeira etapa de amplificação. Para isso, são utilizados, na primeira fase, um par de *primers* externos ao seguimento de DNA que se deseja amplificar, e um par de *primers* internos na segunda amplificação, localizados internamente à seqüência previamente amplificada (LEAL et al, 1996).

Em estudo realizado por Mendes e Leal (2005), o limiar de detecção da técnica de nested PCR, utilizando DNA purificado de *V. cholerae*, foi de 100 fg, enquanto que na PCR simples foi de 100 pg. Contudo, houve surgimento de várias bandas inespecíficas, possivelmente, devido ao excesso de *primers* utilizados na nested PCR, o que representa uma desvantagem do uso da técnica.

Uma outra desvantagem da nested PCR convencional é que os tubos onde ocorre a reação precisam ser abertos ao final da primeira amplificação, o que possibilita contaminação com DNA exógeno ou DNases, podendo levar a reações falso-positivas ou falso-negativas, respectivamente (ABATH et al, 2002).

2.7.3.2 Nested PCR em tubo único

Buscando minimizar os riscos de contaminação, e assim fornecer resultados mais confiáveis, vários estudos de padronização de nested PCR realizadas em um mesmo tubo têm sido desenvolvidos. Na grande maioria deles, a troca da atividade dos *primers* externos pelos internos se dá por mudança na temperatura de anelamento dos ciclos (YLITALO et al, 1995; HERRMANN et al, 1996; MATHIS, et al, 1996; LLOP et al, 2000; GOOKIN et al, 2002).

Berg et al (2001) descreveram uma nested PCR no mesmo tubo, onde os *primers* internos são separados dos externos por uma camada de óleo mineral e, ao final da primeira

etapa de amplificação, após centrifugação, os *primers* internos, “entram” na mistura de reação.

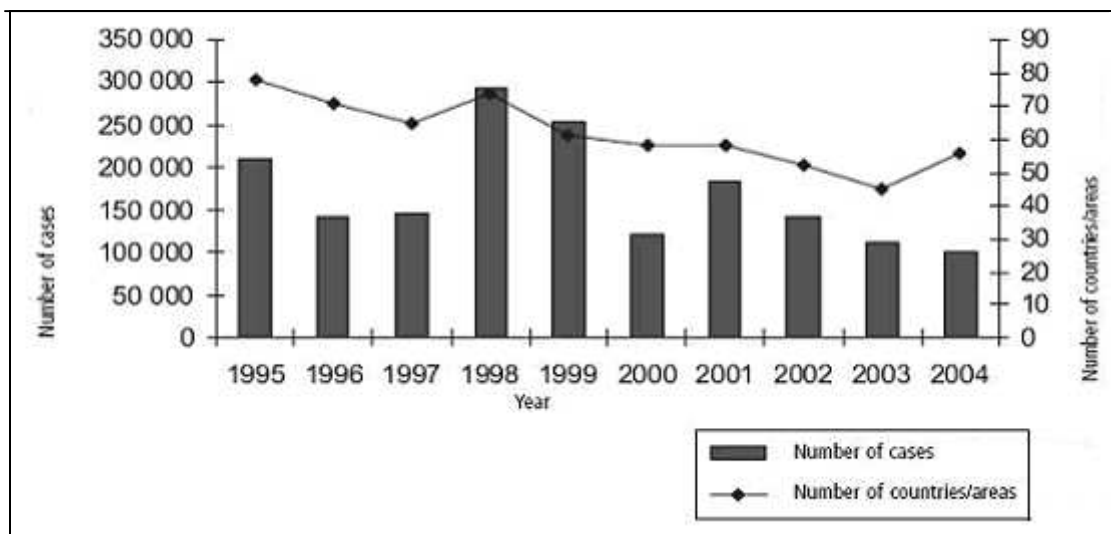
Olmos et al (1999) patentearam uma técnica na qual a mistura de reação da segunda etapa de amplificação é “compartimentalizada” dentro da ponta de uma ponteira plástica que é colocada dentro do tubo onde ocorre a reação.

Neste contexto, Abath et al (2002) desenvolveram uma nested PCR em tubo único (STNPCR), onde o par de *primers* internos é fixado por evaporação na interface interna da tampa do tubo de amplificação. No interior do tubo, além dos *primers* externos, são adicionados os outros reagentes necessários à reação de PCR. Após a primeira etapa de amplificação, o tubo é invertido várias vezes para eluição dos *primers* internos na mistura de reação e tem início a segunda rodada de amplificação.

A grande vantagem desta técnica, além de sua alta sensibilidade, é que uma vez que os tubos não necessitam ser abertos após a primeira etapa de amplificação, o risco de contaminação é muito pequeno. Assim, produtos de amplificação indesejados que poderiam levar a um resultado falso-positivo, podem ser evitados (KWOK; HIGUCHI, 1989; ABATH et al, 2002).

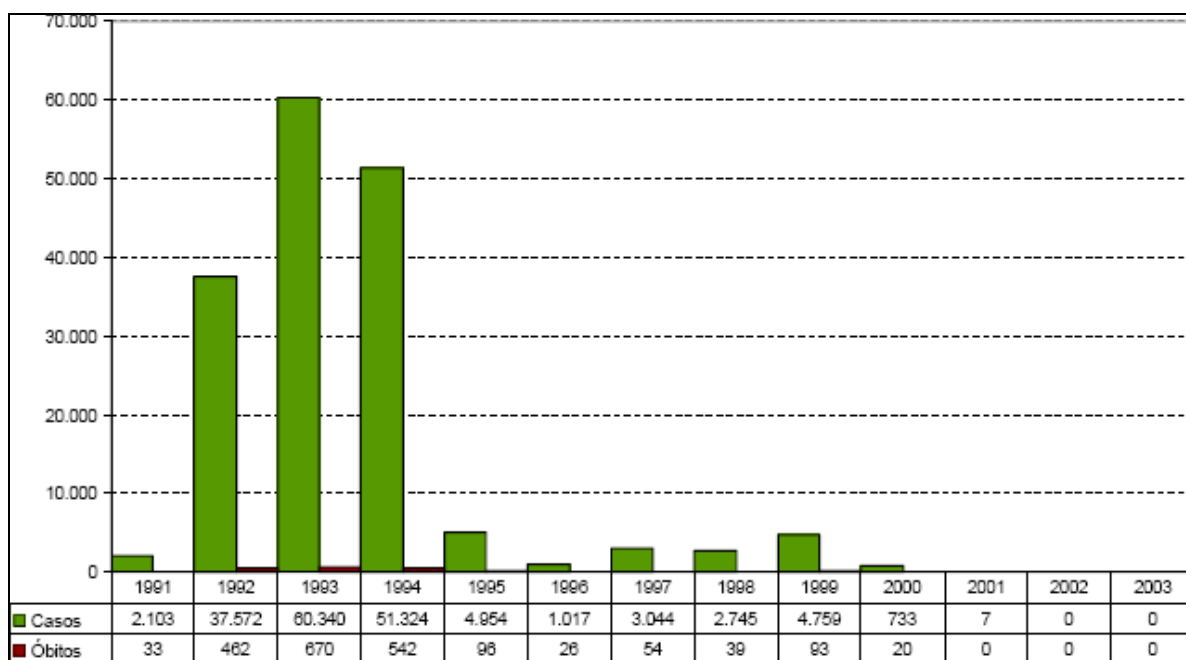
No entanto, uma vez que o material inicial que contém o DNA não é diluído, os impedimentos que, porventura, estiverem presentes na reação podem interferir na atividade da enzima *Taq* polimerase. Nesse caso, a sensibilidade da técnica fica um pouco menor quando comparada com a nested PCR convencional (MENDES; LEAL, 2005).

Quando realizada com DNA de *V. cholerae* O1, esta técnica apresentou alta sensibilidade, detectando até 1 pg do DNA do bacilo (MENDES; LEAL, 2005). Na figura 9 está mostrado em qual etapa da identificação de *V. cholerae*, a STNPCR pode ser utilizada a fim de agilizar os resultados dos testes. A possibilidade de realizar a técnica sem prévia extração de DNA, aumenta ainda mais a rapidez do diagnóstico.



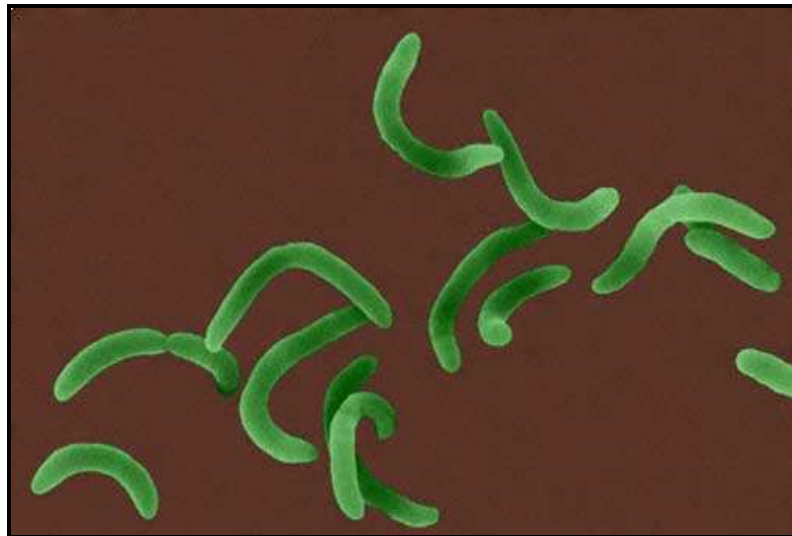
Fonte: WHO, 2005.

Figura 1. Número de casos e de países que notificaram cólera por ano, de 1995 a 2004.



Fonte: SVS.

Figura 2: Série histórica de casos e óbitos por cólera. Brasil, 1991-2003.



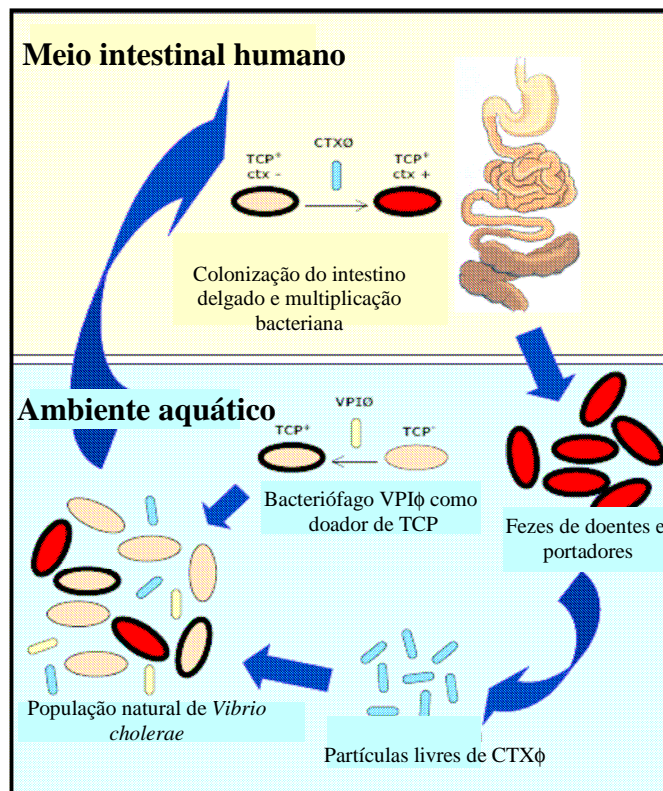
Fonte: <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab1/dkVibrio.html>

Figura 3. Microscopia eletrônica do bacilo em forma de vírgula de *V. cholerae*.



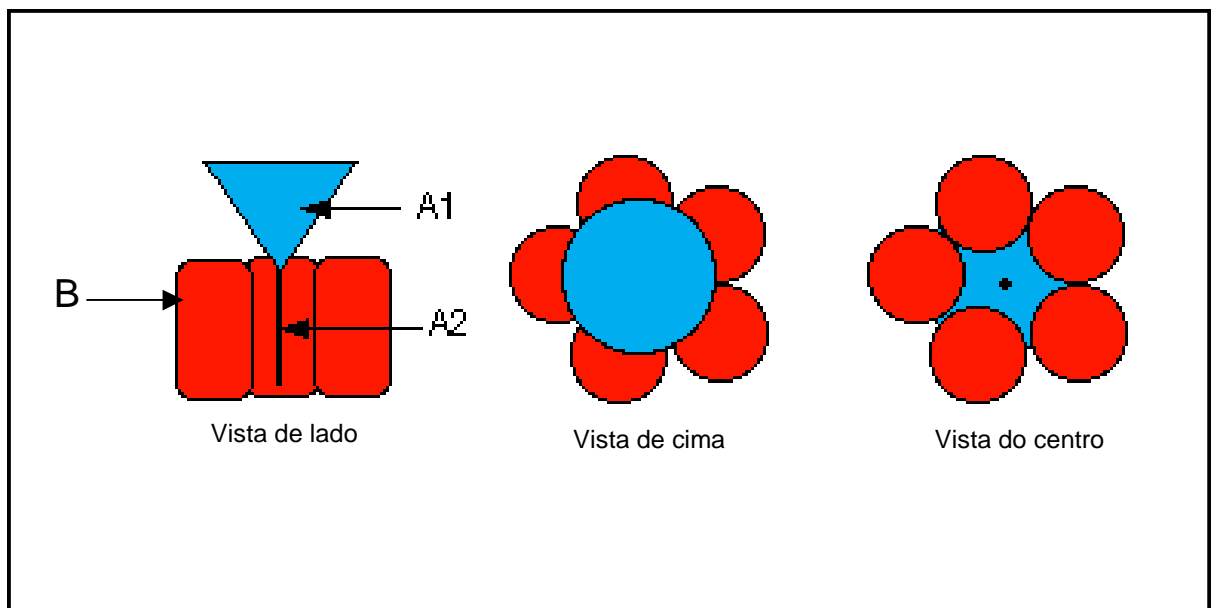
Fonte: University of Wisconsin – Internet

Figura 4. *Vibrio cholerae* com seu flagelo polar característico.



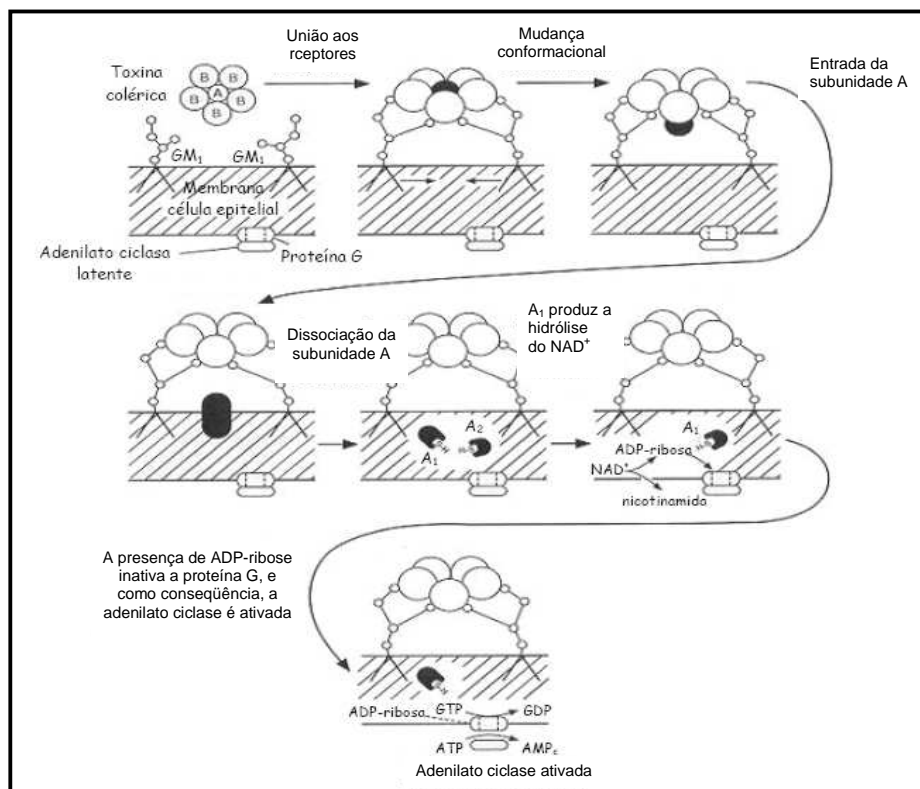
Fonte: http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0103103-095654//tesis.pdf

Figura 6. Aquisição por *V. cholerae* do gene cluster TCP no ambiente aquático e infecção da bactéria pelo fago CTX ϕ no meio intestinal.



Fonte: <http://www.ualberta.ca/~mimi/faculty/garmstrong/405b.html>

Figura 7. Estrutura em anel da molécula da toxina colérica. Em azul a subunidade A e, em vermelho, os monômeros da subunidade B.



Fonte: <http://textbookofbacteriology.net/cholera.html>

Figura 8. Mecanismo de ação da toxina colérica no epitélio intestinal.

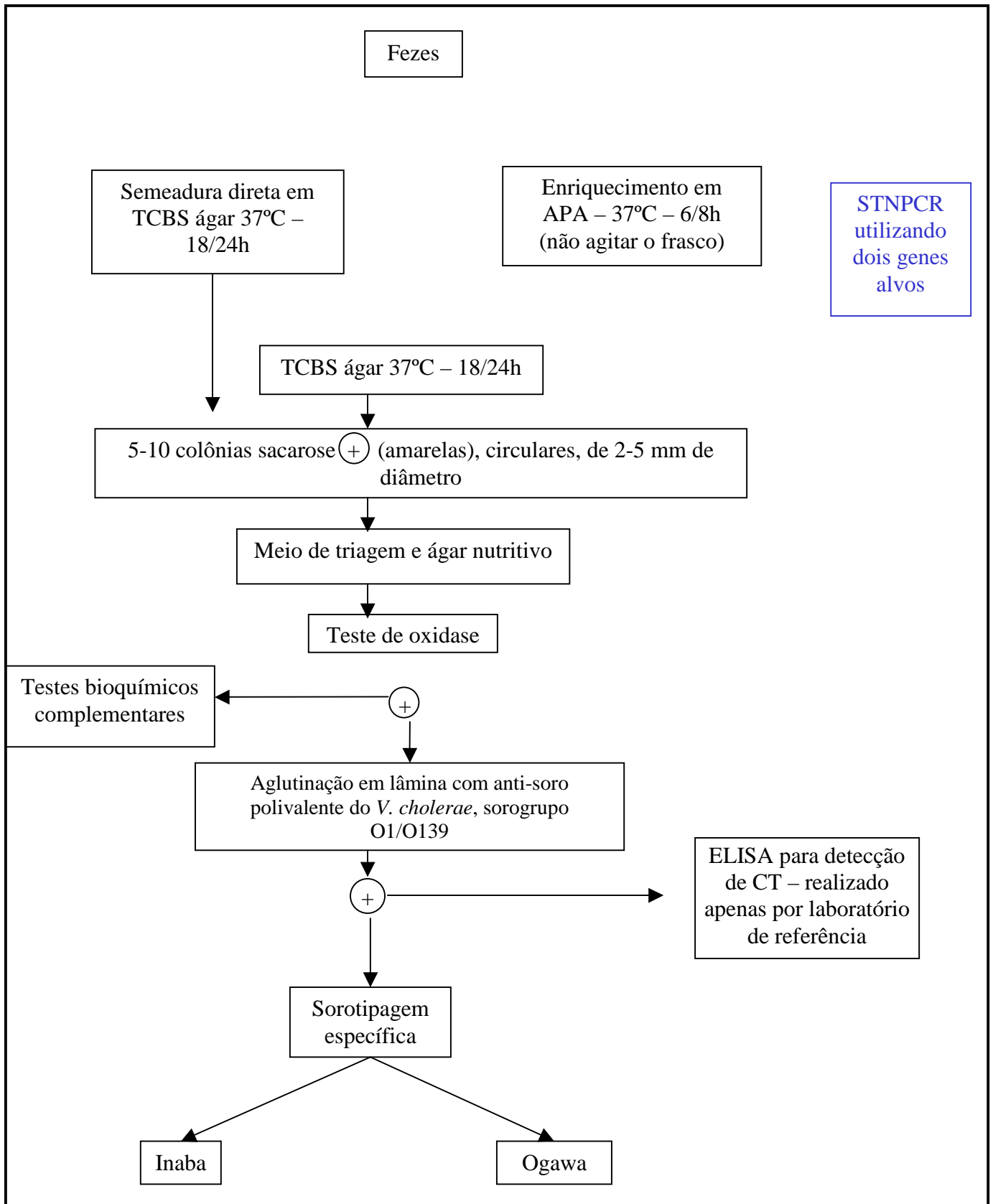


Figura 9. Representação esquemática das etapas realizadas para isolamento e identificação de *V. cholerae* O1 a partir de amostra de fezes.

Tabela 1. Casos e óbitos por cólera notificados à WHO em 2004.

Continente	Casos	Casos importados	Óbitos
África	95.560	0	2.331
Américas	36	8	0
Ásia	5.764	69	14
Europa	21	21	0
Oceania	2	2	0
Total	101.383	100	2.345

Tabela 2. Resultados de vários testes bioquímicos para *V. cholerae*.

Provas Bioquímicas	Resultado
Lactose	-
Glicose (sem gás)	+
Indol	+/-
Lisina descarboxilase	+
Urease	-
L-triptofano desaminase	-
Sacarose	+
H ₂ S	-
Citocromo-oxidase*	+

* A produção de citocromo-oxidase distingue *V. cholerae* das enterobactérias.

Tabela 3. Características fenotípicas dos biotipos clássico e El Tor de *V. cholerae* O1.

Prova	Biotipo	
	<u>Clássico</u>	<u>El Tor</u>
β -hemólise em ágar sangue de carneiro	-	+
Reação de Voges-Proskauer	-	+
Aglutinação de eritrócitos de galinha	-	+
Sensibilidade a polimixina B (50U)	S	R
Lise pelo fago IV	S	R
Lise pelo fago V	R	S

R: Resistente; S: Sensível.

3 JUSTIFICATIVA

É de grande importância a utilização de um método que detecte, com alta sensibilidade, além de bactérias no estado VNC, cepas de *V. cholerae* O1 toxigênicas ou não, identificando o microrganismo diretamente da cultura, não sendo necessária a extração de DNA genômico da bactéria.

A cultura bacteriana, método considerado padrão-ouro para diagnóstico da cólera, requer um número relativamente grande de bactérias presentes na amostra, além de não ser capaz de isolar cepas de *V. cholerae* O1 no seu estado VNC. A STNPCR, um método de diagnóstico molecular altamente sensível, pode detectar bactérias em ambos os casos. Contudo, não permite detectar cepas não-toxigênicas desta bactéria, quando utiliza apenas os genes de virulência como alvo. A introdução de um outro par de *primers* a esta reação, específico para o sorogrupo O1 de *V. cholerae*, possibilita a identificação do vibrião independentemente de sua toxigenicidade.

Além disso, como o resultado do diagnóstico através da nested PCR em tubo único que utiliza dois genes alvos (MSTNPCR) ocorre mais rapidamente que o método tradicional, o tratamento pode ser iniciado mais precocemente, o que ajuda na diminuição da mortalidade, e medidas sanitárias adequadas podem ser mais rapidamente acionadas a fim de evitar a disseminação da doença.

Uma vez que a MSTNPCR é capaz de detectar cepas potencialmente toxigênicas, pode portanto, ser usada pelo programa de monitoramento ambiental que pesquisa a presença do vibrião colérico em água de mananciais de regiões endêmicas, acionando medidas de controle que reduzam o risco de recrudescimento da epidemia, antes mesmo da emergência de casos da doença.

4 PERGUNTA CONDUTORA

A técnica de MSTNPCR é capaz de detectar *V. cholerae* O1 diretamente do meio de cultura?

5 HIPÓTESE

A técnica de MSTNPCR é capaz de detectar *V. cholerae* O1 com alta sensibilidade, diretamente do meio de cultura.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a técnica de nested PCR em tubo único utilizando dois genes alvos (MSTNPCR) na detecção de *V. cholerae* O1 diretamente do meio de cultura.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a adição dos *primers* direcionados ao gene *rfbN* à reação de nested PCR em tubo único, considerando os parâmetros temperatura de anelamento e concentração dos *primers*.
- Determinar o limiar de detecção de *V. cholerae* O1 da MSTNPCR, a partir do DNA bacteriano e diretamente do meio de cultura.
- Avaliar a especificidade para *V. cholerae* O1 da MSTNPCR, frente a outras bactérias enteropatogênicas.
- Montar *kit* diagnóstico e avaliar a sua estabilidade quando estocado a -20°C.
- Confirmar a identidade dos fragmentos obtidos pela MSTNPCR.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 BACTÉRIAS E EXTRAÇÃO DE DNA

A cepa de referência de *V. cholerae* O1 569B Clássico/Inaba, cedida pelo Laboratório de Referência em cólera do Instituto Oswaldo Cruz - RJ, foi utilizada como padrão em todas as etapas do trabalho. Para avaliar a especificidade da técnica, foram utilizados os seguintes microrganismos da bacterioteca do Departamento de Microbiologia do CPqAM: *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *V. alginolyticus*, *V. mimicus* e *V. parahaemolyticus*. Para extração do DNA genômico das bactérias, foi seguido o protocolo descrito por Ausubel et al (1987), e modificado por Leal et al (2004).

7.2 PRIMERS

Foram utilizados um par de *primers* descrito por Keasler e Hall (1993), correspondente ao par interno, e um outro par incluindo o *primer sense* descrito por Li et al (2002) e um *nonsense* desenhado com a ajuda do programa DNASTAR a partir da sequência do gene *ctxA* do Gene Bank, (nº de acesso: AF452584). Estes últimos correspondem ao par externo. Estes dois pares de *primers* têm como alvo o gene *ctxA*.

Foram utilizados também *primers* específicos para o gene *rfbN*, que codifica o antígeno “O” de *V. cholerae* O1 (ISLAM, et al, 2004). As sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados, bem como o tamanho do fragmento amplificado estão mostrados na tabela 4, e a localização deles no genoma de *V. cholerae* está mostrada na figura 10.

7.3 PADRONIZAÇÃO DA MSTNPCR

O trabalho realizado por Mendes e Leal (2005) descreve a padronização da técnica de STNPCR utilizando apenas o gene *ctxA* como alvo para detecção de DNA de *V. cholerae* O1. O objetivo principal do presente estudo foi adicionar aos componentes da reação já padronizada, um outro par de *primers*, direcionados ao gene *rfbN*, possibilitando a detecção de cepas não-toxigênicas.

Inicialmente, foram realizadas reações com diferentes temperaturas de anelamento (TM) dos *primers* e concentrações, através de PCR simples para verificar a TM ótima. Os ensaios foram realizados com TM de 50 °C, 52 °C, 54 °C e 55 °C. A TM ótima foi de 54 °C, assim, as etapas seguintes foram realizadas com esta temperatura.

A mistura de reação da PCR simples continha Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTP's 200µM, 20 pmol de cada *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) e 20 ng de DNA de *V. cholerae* O1, para um volume total de 25 µL.

O segundo passo foi avaliar a melhor forma de adicionar os *primers* *rfbN* à reação em tubo único na qual as concentrações de *primers* *ctxA* internos e externos já estavam estabelecidas: 40 pmol dos internos fixados na tampa do tubo, e 2 pmol dos externos na mistura de reação. Assim, foi realizada STNPCR de três formas distintas para adição dos *primers* *rfbN*: a primeira com 20 pmol dos *primers* fixados na face interna da tampa do tubo; a segunda com 20 pmol na face interna da tampa e 20 pmol na mistura de reação, totalizando 40 pmol; e a terceira variação com 20 pmol na mistura de reação (figura 11). Os tubos abertos permaneceram por, aproximadamente, 40 minutos em capela de fluxo laminar para evaporação e fixação dos *primers* colocados na face interna da tampa.

A mistura de reação consistiu de Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTP's 200μM, 2U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), 2 pmol de *primers* *ctxA* externos e 20 ng de DNA de *V. cholerae* O1, para um volume total de 50 μL.

Uma vez estabelecida a forma de adição dos *primers* *rfbN* à reação, foi realizada MSTNPCR utilizando diferentes proporções de *primers* *ctxA* e *rfbN*, como está mostrado na tabela 5.

7.4 PROGRAMAS DE AMPLIFICAÇÃO

7.4.1 PCR simples

O DNA foi amplificado durante 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto na temperatura de anelamento e 1 minuto a 72 °C. Após esses ciclos, os tubos permaneceram a 72°C por 7 minutos para a extensão final. Para anelamento dos *primers*, foram testadas diferentes TM, como descrito no item 7.3.

7.4.2 MSTNPCR

O programa de amplificação compreendeu duas etapas, onde na primeira, foram 15 ciclos de: 1 minuto a 90 °C, 1 minuto a 54 °C e 1 minuto a 72 °C, seguidos de 7 minutos a 72°C para extensão final. Depois de, aproximadamente, 1 minuto a 90 °C, os tubos foram invertidos várias vezes para eluição dos *primers* anteriormente fixados na tampa do tubo.

Após breve centrifugação, os tubos foram colocados novamente no termociclador para o segundo ciclo de amplificação, que consistiu de 45 ciclos de 1 minuto a 90 °C, 1 minuto a 54 °C e 1 minuto a 72 °C, seguidos de 7 minutos a 72 °C para extensão final.

Tanto na PCR simples quanto na MSTNPCR, a mistura de reação foi recoberta com óleo mineral para evitar a evaporação da amostra e a amplificação ocorreu em um termociclador Biometra TRIO-Thermoblock. Os produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose 1%, submetidos a eletroforese a 100 v durante 1 hora, corados com brometo de etídio e visualizados através do programa Kodak 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Co., New Haven, CT, USA).

7.5 LIMIAR DE DETECÇÃO DE *V. cholerae* O1 PELA MSTNPCR

7.5.1 Utilizando DNA purificado

Para avaliar a quantidade mínima de DNA de *V. cholerae* O1 amplificada na MSTNPCR, foi realizada uma diluição seriada 1:10 do DNA bacteriano. Partindo da concentração de 5 ng/μL, o DNA foi diluído até 0,5 fg/μL e foram utilizados 2μL de cada diluição na reação de MSTNPCR.

No tubo contendo os *primers* *ctxA* internos fixados na tampa, foram colocados dois pmol dos *primers* *ctxA* externos e 20 pmol dos *primers* *rfbN*, bem como os demais reagentes necessários à reação, Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTP's 200μM, 2U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), além de 2μL da solução de DNA-alvo nas concentrações anteriormente citadas, para um volume final de 50μL.

7.5.2 Diretamente da cultura em meio de enriquecimento

A cepa de *V. cholerae* O1 clássico 569B foi reativada em APA pH 8,6, semeada em meio seletivo para microrganismos do gênero *Vibrio* (TCBS) e incubada a 37 °C durante 24

horas. Após este período, uma colônia foi retirada da placa, colocada em APA pH 8.6 e incubada a 37 °C durante 24 horas. A cultura em APA foi diluída (1:10), de 10 até 10⁻⁸, e 10µL de cada diluição foram semeados em meio TCBS, para posterior contagem de colônias.

Ao mesmo tempo, uma alíquota de cada uma destas diluições foi levada ao banho-maria a 100 °C, onde permaneceu durante 10 minutos para ruptura de membranas e exposição do material genético. As amostras foram colocadas, imediatamente, em gelo e foram utilizados 10µL de cada uma delas como DNA-alvo na reação de PCR.

A mistura de reação consistiu de Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTP's 200µM, 20 pmol dos *primers* rfbN, 2 pmol dos *primers* ctxA externos, 2U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) e 10µL do DNA-alvo das diluições anteriormente citadas, para um volume final de 50µL, em microtubos onde tinham sido previamente fixados na face interna da tampa 40 pmol dos *primers* internos.

7.6 ESPECIFICIDADE DA MSTNPCR

Para avaliar a especificidade da MSTNPCR para *V. cholerae* O1, foram utilizados 20ng do DNA purificado de alguns microrganismos enteropatógenos, além de outras espécies do gênero *Vibrio*. A técnica foi realizada com TM de 54 °C, como o restante do trabalho, e com TM de 60 °C quando foi necessária uma maior estringência na reação.

A mistura de reação consistiu de Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTP's 200µ, 20 pmol dos *primers* rfbN, 2 pmol dos *primers* externos, 2U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) e 20 ng do DNA genômico do microrganismo, para um volume final de 50µL. Uma das amostras consistiu de uma mistura do DNA de todos os microrganismos citados, juntamente com DNA de *V. cholerae* O1, com a finalidade de avaliar se a técnica detectaria o DNA do vibrião na mistura.

7.7 MONTAGEM DE *KIT* DIAGNÓSTICO

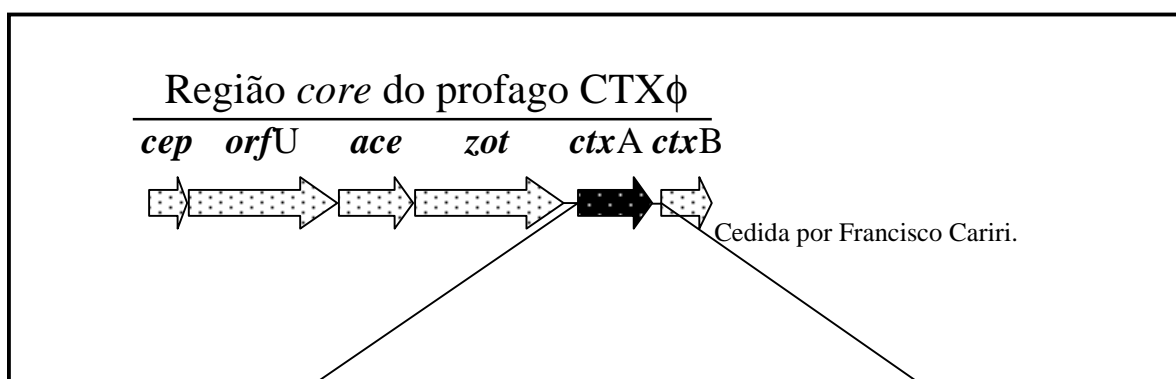
Foi montado um *kit* contendo tubos com *primers* *ctxA* internos fixados na tampa e um tubo à parte contendo a mistura de reação com tampão, MgCl₂, dNTP's, *primers* *ctxA* externos e *rfbN*, nas concentrações anteriormente citadas. Optou-se por não acrescentar a *Taq* DNA polimerase por receio de que a enzima perdesse sua atividade polimerásica. O *kit* foi armazenado a -20 °C e, uma vez por mês, durante quatro meses, foi avaliada a sua estabilidade.

7.8 REPRODUTIBILIDADE

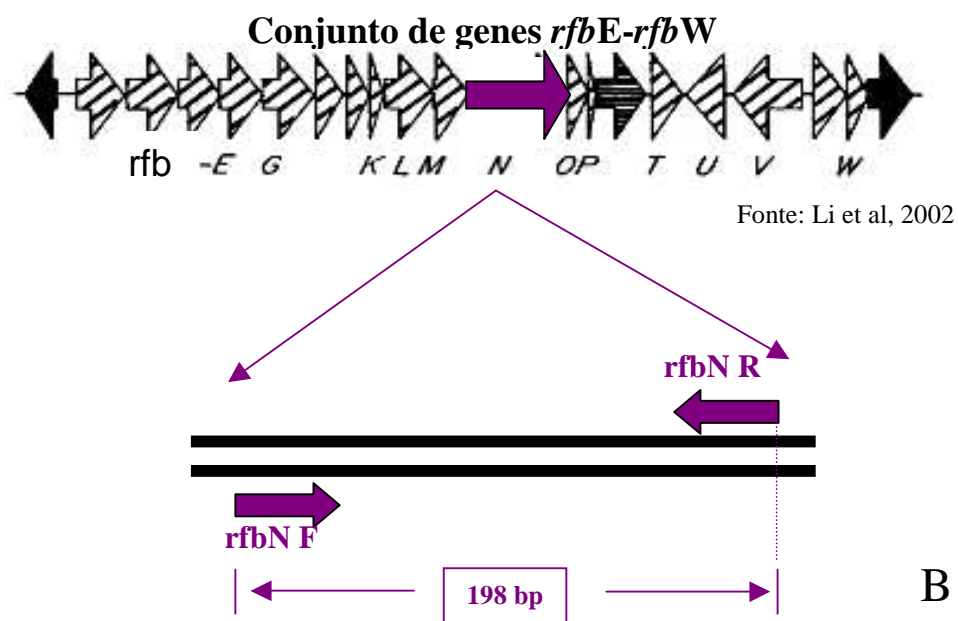
Todas as etapas do trabalho foram realizadas em triplicatas para avaliar a reprodutibilidade da técnica.

7.9 SEQÜENCIAMENTO

A identidade dos produtos da MSTNPCR foi confirmada por seqüenciamento utilizando o *kit* Purelink™ PCR Purification Kit (Invitrogen) para purificação dos fragmentos e o *kit* Big Dye Terminator v.3.1, Applied Biosystems para mistura do seqüenciamento. A reação ocorreu em seqüenciador automático (Genetic Analyser ABI Prism 3100, Applied Biosystems). Foram utilizados os *primers* para os genes *ctxA* (internos) e *rfbN*, tanto no sentido *forward* como *reverse* em tubos individuais. Após seqüenciamento, os segmentos gênicos de 302 pb (*ctxA*) e 198 pb (*rfbN*) foram alinhados pelo programa BLAST para verificar a sua identidade.



A



B

Figura 10. Esquema representativo das regiões do profago CTX ϕ e do conjunto de genes *rfb*. **A:** Região *core* do profago CTX ϕ e localização dos *primers* *ctxA* internos e externos. **B:** Conjunto de genes *rfbE-rfbW* e localização dos *primers* *rfbN*.

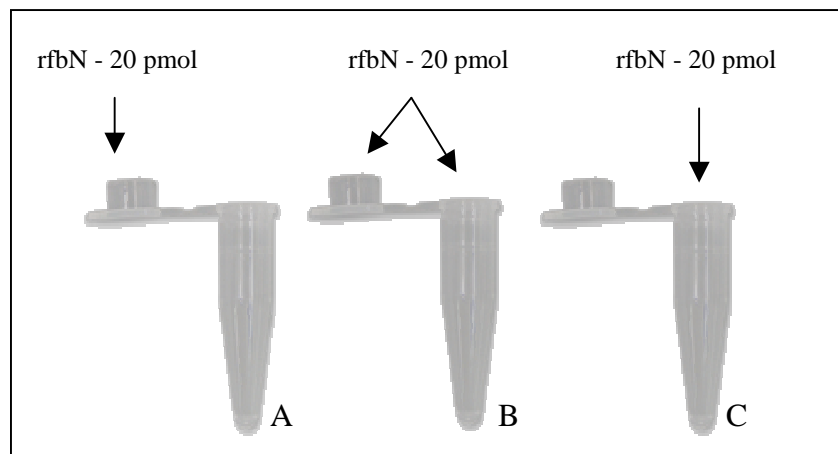


Figura 11. Esquema representativo das formas de adição dos *primers* rfbN à STNPCR utilizando um gene alvo. A: 20 pmol na tampa do tubo; B: 20 pmol na tampa e 20 pmol na mistura de reação e C: 20 pmol na mistura de reação.

Tabela 4. Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados e tamanho dos fragmentos amplificados.

<i>Primers</i>	Seqüência nucleotídica	Tamanho (pb)	Fonte
rfbN	F 5' GTT TCA CTG AAC AGA TGG G 3' R 5' GGT CAT CTG TAA GTA CAA C 3'	198	Islam et al, 2004.
ctxA internos	F 5' ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC 3' R 5' CTT TTA ACT TTA GAT TGG TAT TC 3'	301	Keasler; Hall, 1993.
ctxA externos	F 5' CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG 3' R 5' TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG 3'	600	Li et al, 2002 Mendes; Leal, 2005.

Tabela 5. Proporções entre *primers* *ctxA* externos, *ctxA* internos e *rfbN* utilizadas no trabalho.
Em destaque, a proporção que apresentou melhor reprodutibilidade.

<i>ctxA</i> interno (pmol)	<i>ctxA</i> externo (pmol)	<i>rfbN</i> (pmol)
20	2	20
40	2	20
20	2	10

8 RESULTADOS

8.1 PADRONIZAÇÃO DA MSTNPCR

Quando foi realizada PCR simples para avaliação da TM ótima, foi observado que a 50 °C, com os *primers* rfbN não houve amplificação do fragmento desejado, enquanto que os *primers* ctxA funcionaram nesta temperatura (figura 12A). Por outro lado, com 55 °C de temperatura anelamento, ocorreu o inverso: houve amplificação do segmento rfbN, enquanto o segmento ctxA não foi amplificado (figura 12B). Utilizando TM de 52 °C e 54 °C os fragmentos dos genes *rfbN* e *ctxA* foram amplificados (dados não mostrados). Contudo, tendo em vista que quanto mais alta a TM dos *primers*, maior é a especificidade destes pelo fragmento alvo, todos os passos restantes deste trabalho foram realizados com TM de 54 °C.

A adição dos *primers* rfbN foi realizada de três maneiras (figura 13): fixados na tampa do tubo, juntamente com os *primers* ctxA internos (linha 1); tanto fixados na tampa, quanto dentro do tubo de reação ao mesmo tempo (linha 3) e apenas dentro do tubo de reação, junto com os *primers* ctxA externos (linha 5).

Uma vez que a reação só mostrou-se satisfatória no último caso, ou seja, com os *primers* rfbN adicionados somente dentro do tubo (figura 13, linha 5), todos os passos seguintes foram realizados desta forma.

Quando a MSTNPCR foi realizada com diferentes proporções de *primers* ctxA internos, ctxA externos e rfbN (figura 14), a reprodutibilidade e a sensibilidade da técnica foram maiores quando se utilizou 40 pmol de *primers* ctxA internos, 2 pmol dos *primers* ctxA externos e 20 pmol de *primers* rfbN e desta forma, o restante do trabalho foi realizado com estas concentrações.

8.2 LIMIAR DE DETECÇÃO DE *V. cholerae* O1 DA MSTNPCR

8.2.1 Com DNA purificado

A adição de outro par de *primers* à reação não alterou o limiar da técnica que utiliza apenas um gene alvo (MENDES; LEAL, 2005), sendo capaz de demonstrar amplificação visível até 1 pg de DNA da bactéria (figura 15).

8.2.2 Diretamente da cultura em meio de enriquecimento

O limiar de detecção da MSTNPCR foi de três UFC, quando a técnica foi realizada diretamente da cultura em APA (figura 16, linha 8). Houve amplificação visível mesmo quando não foi verificado crescimento de UFC no meio de cultura em placa de Petri (figura 16, linha 9). A tabela 6 mostra a quantidade de UFC presente em cada diluição e a localização do produto amplificado a partir destas diluições na figura 16.

Ainda na figura 16, pode ser observado que, à medida que a concentração de bactérias presentes na amostra diminuiu, foi surgindo uma banda menor que 100 bp, que foi ficando cada vez mais forte. Além disso, quando havia DNA-alvo em excesso na reação, algumas bandas inespecíficas também surgiram (linhas 2, 3, 4 e 5).

8.3 ESPECIFICIDADE DA MSTNPCR

A MSTNPCR foi específica para *V. cholerae* O1, demonstrando amplificação apenas com este microrganismo, mesmo quando seu DNA foi misturado ao DNA de outras bactérias (figura 17). Na figura 17, a linha 12 corresponde ao controle positivo da reação (DNA da cepa de *V. cholerae* O1 569B) e a amostra da linha 11 continha DNA de todos os outros microrganismos misturados ao de *V. cholerae* O1. Houve surgimento de bandas inespecíficas

(linhas 2, 3, 4, 7 e 9) que diminuíram significativamente quando a TM foi aumentada para 60 °C (dados não mostrados).

8.4 ESTABILIDADE DE *KIT* DIAGNÓSTICO

O *kit* congelado continuou estável durante os quatro meses testados e o limiar de detecção de 1 pg permaneceu o mesmo.

8.5 REPRODUTIBILIDADE

As triplicatas de todas as reações do trabalho mostraram os mesmos resultados.

8.6 SEQÜENCIAMENTO

Os segmentos gênicos de 302 bp e 198 bp previamente amplificados pela MSTNPCR foram submetidos a seqüenciamento e alinhamento pelo programa BLAST. As seqüências apresentaram identidade com as regiões do genoma de *V. cholerae* correspondente aos genes *ctxA* e *rfbN*, com 99% e 97% de similaridade, respectivamente (figuras 18 e 19).

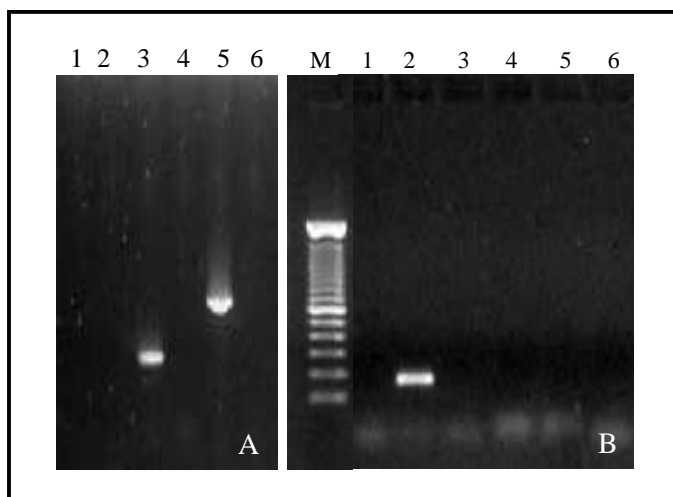


Figura 12. Reação de PCR simples com temperatura de anelamento de 50 °C (A) e 55 °C (B). **A:** Linhas: 1: CP rfbN; 2: CN rfbN; 3: CP ctxA interno; 4: CN ctxA internos; 5: CP ctxA externos; 6: CN ctxA externos. **B:** Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: CN rfbN; 2: CP rfbN; 3: CN ctxA interno; 4: CP ctxA internos; 5: CN ctxA externos; 6: CP ctxA externos. CP: controle positivo; CN: controle negativo.

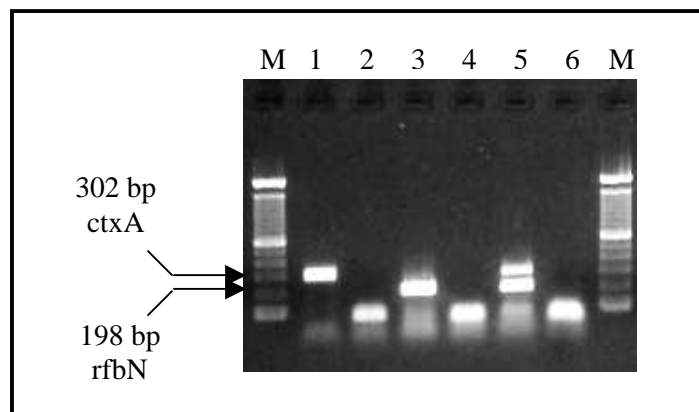


Figura 13. Adição dos *primers* rfbN à STN-PCR. Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: 20 pmol de rfbN na tampa do tubo; 3: 20 pmol de rfbN na tampa e 20 pmol na mistura de reação; 5: 20 pmol de rfbN na mistura de reação; 2, 4 e 6: controles negativos.

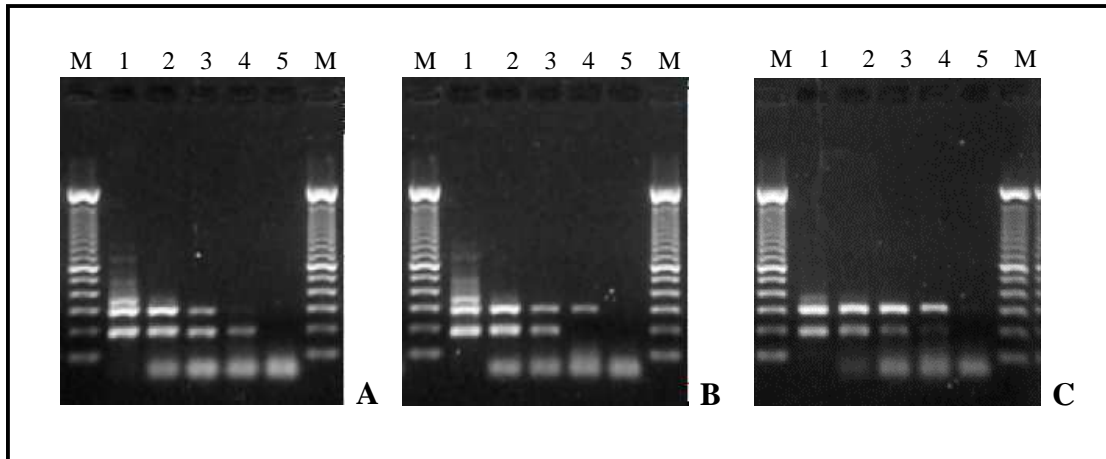


Figura 14. Proporção entre *primers* *ctxA* internos (*ctxAi*); *ctxA* externos (*ctxAe*) e *rfbN* (pmol): A: 40:2:20 (*ctxAi*:*ctxAe*:*rfbN*, respectivamente); B: 20:2:20 (*ctxAi*:*ctxAe*:*rfbN*, respectivamente) e C: 20:2:10 (*ctxAi*:*ctxAe*:*rfbN*, respectivamente). Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: 20ng; 2: 100pg; 3: 10pg; 4: 1pg e 5: CN. CN: controle negativo.

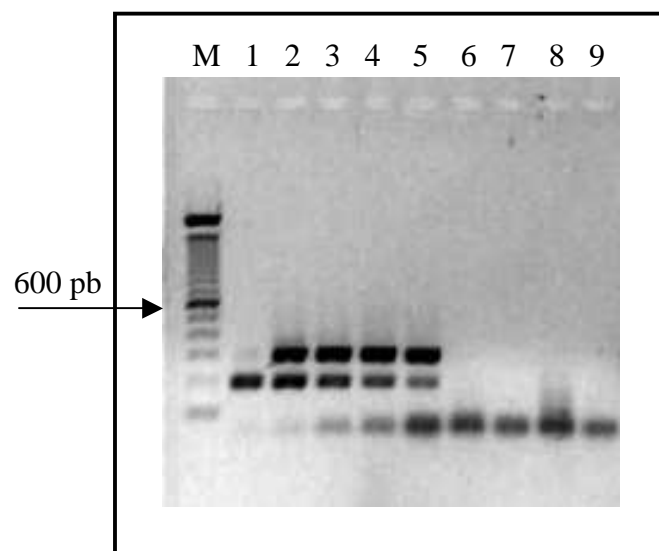


Figura 15. Limiar de detecção de DNA de *V. cholerae*, através da MSTNPCR. Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 1 fg e 9: CN (controle negativo).

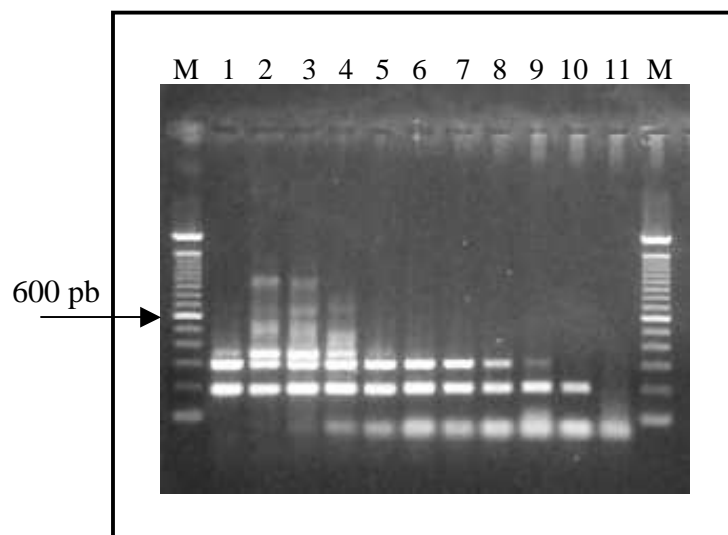


Figura 16. Limiar de detecção da MSTNPCR, quando a técnica foi realizada diretamente da cultura em APA.
Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: CP; 2: 10^0 ; 3: 10^{-1} ; 4: 10^{-2} ; 5: 10^{-3} ; 6: 10^{-4} ; 7: 10^{-5} ;
8: 10^{-6} ; 9: 10^{-7} ; 10: 10^{-8} ; 11: CN.
CP: controle positivo; CN: controle negativo.

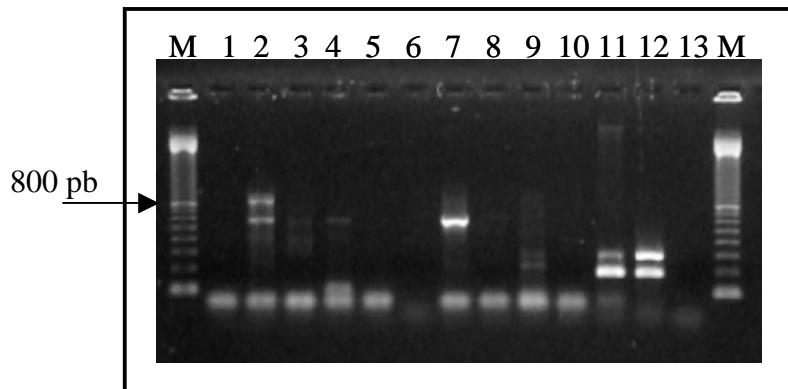
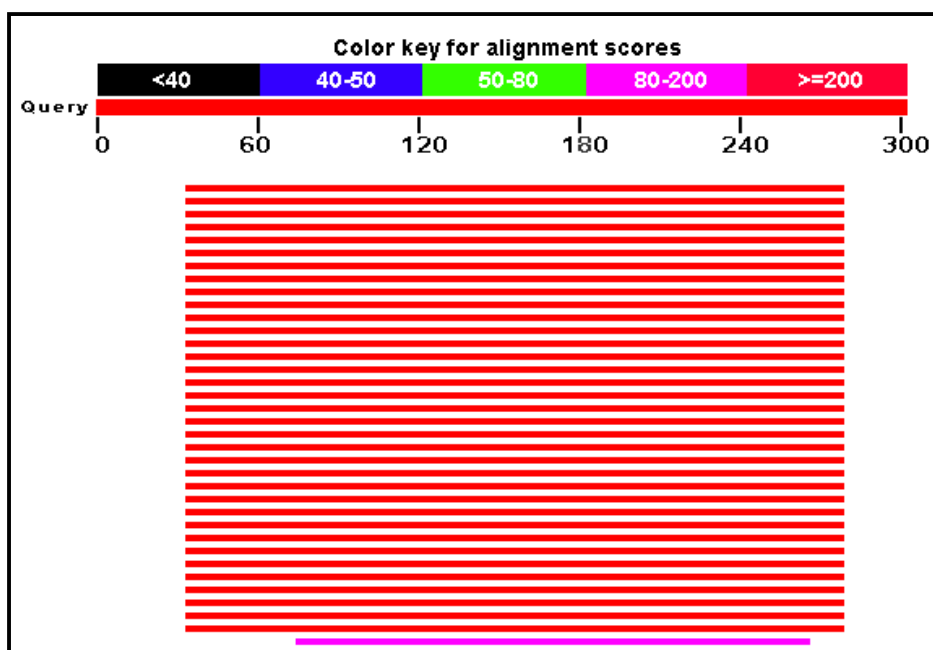


Figura 17. Especificidade da MSTN-PCR. Linhas: M: marcador de peso molecular (100 bp); 1: *Aeromonas* sp.; 2: *E. coli*; 3: *Enterobacter* sp.; 4: *Klebsiella* sp.; 5: *Pseudomonas* sp.; 6: *Salmonella* sp.; 7: *Shigella* sp.; 8: *V. alginolyticus*; 9: *V. mimicus*; 10: *V. parahaemolyticus*; 11: DNA de todas as bactérias, inclusive de *V. cholerae* O1; 12: CP e 13: CN. CP: controle positivo; CN: controle negativo.



[Distance tree of results](#) ^{NEW}

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 109704781 gb DQ774432.1 Synthetic construct Vibrio cholera...	476	2e-131
gi 9655952 gb AE004224.1 Vibrio cholerae O1 biovar eltor str...	476	2e-131
gi 24437189 gb AF542089.2 Vibrio phage CTX RstA2 (rstA2) gen...	476	2e-131
gi 24438360 gb AF542088.2 Vibrio phage CTX RstA2 (rstA2) gen...	476	2e-131
gi 24440227 gb AF414369.2 Vibrio phage CTX RstA2 (rstA2) gen...	476	2e-131
gi 21898568 gb AY101181.1 Vibrio cholerae strain JS9803 prop...	476	2e-131
gi 21668019 gb AF516349.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21668015 gb AF516348.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21668011 gb AF516347.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21668002 gb AF516345.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21667998 gb AF516344.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21667994 gb AF516343.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21667990 gb AF516342.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21637276 gb AF510998.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21637272 gb AF510997.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21637268 gb AF510996.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21637264 gb AF510995.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 21637260 gb AF510994.1 Vibrio phage CTX Zot (zot) gene, p...	476	2e-131
gi 20502728 gb AF390572.1 Vibrio cholerae serogroup O27 chol...	476	2e-131

Figura 18. Alinhamento pelo programa BLAST da seqüência correspondente ao fragmento ctxA.

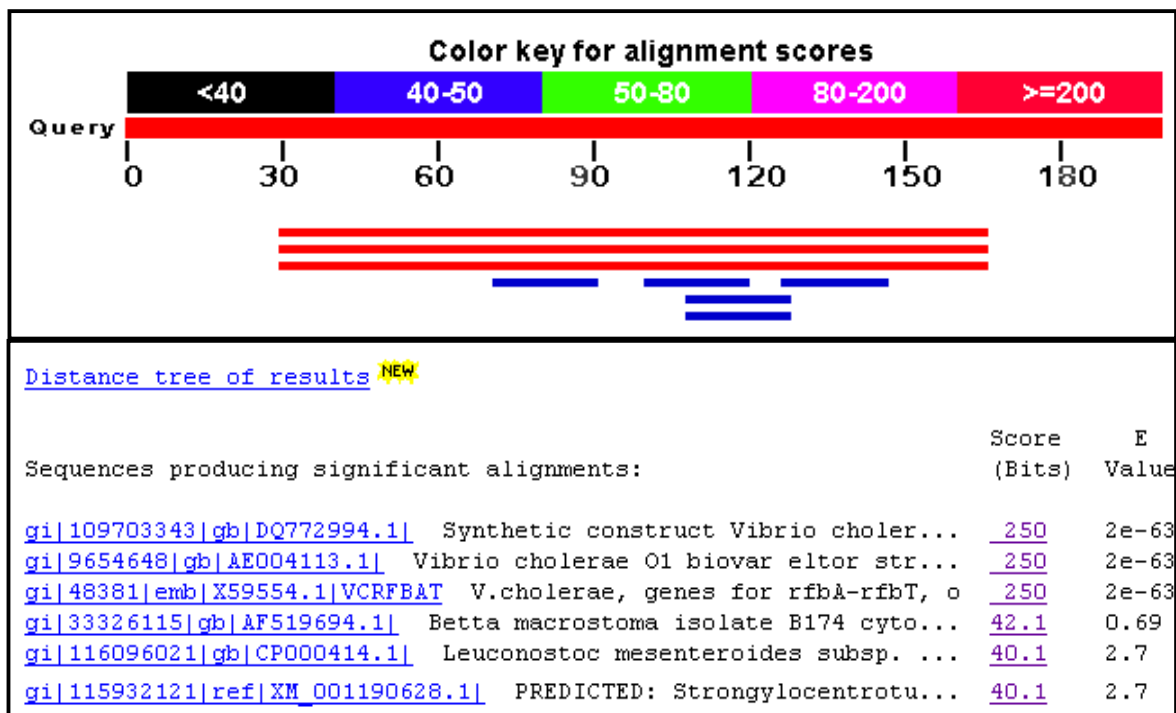


Figura 19. Alinhamento pelo programa BLAST da seqüência correspondente ao fragmento rfbN.

Tabela 6. Quantidade das unidades formadoras de colônias presentes em cada diluição e sua localização na figura 16.

Linha	DILUIÇÃO DA CULTURA	UFC
	PURA	
1	DNA	CP
2	10	Incontáveis
3	10^{-1}	Incontáveis
4	10^{-2}	Incontáveis
5	10^{-3}	Incontáveis
6	10^{-4}	~300
7	10^{-5}	~ 180
8	10^{-6}	3
9	10^{-7}	Não houve formação de colônias
10	10^{-8}	Não houve formação de colônias
11	-----	CN

CP: controle positivo; CN: controle negativo.

9 DISCUSSÃO

A cólera ainda acomete um grande número de indivíduos em todo o mundo, sendo que um total de 131.943 casos foi notificado à WHO em 2005, incluindo 2.272 mortes (WHO, 2006b). Muitas tentativas têm sido introduzidas com o propósito de controlar a doença, incluindo a utilização de vacinas, sejam elas produzidas com microrganismos vivos, atenuados ou mesmo recombinantes (HILL et al, 2006).

Contudo, as vacinas disponíveis não promovem imunidade duradoura (em média 10 semanas) e, muitas vezes, não são eficazes em crianças e indivíduos que vivem em regiões não-endêmicas, justamente os mais susceptíveis às formas graves da cólera (HILL et al, 2006).

Desta forma, a utilização de vacinas ainda não pode ser vista como uma boa estratégia para a erradicação da doença. Além disso, tendo em vista que a cólera está relacionada a condições precárias de saneamento básico, são necessárias mudanças estruturais não apenas no âmbito da saúde, mas principalmente, em nível social, o que dificulta ainda mais o controle do número de casos.

Assim sendo, o Sistema de Saúde de regiões endêmicas adotou o monitoramento e a investigação epidemiológica como ferramentas principais para o controle da incidência e disseminação da cólera (MS, 1992).

“A Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas - MDDA, atualmente implantada em 4.227 municípios do país, representa a mais importante estratégia para a detecção precoce de casos de cólera. A manutenção deste sistema de vigilância epidemiológica integrado e o fortalecimento do sistema de vigilância de controle da qualidade da água para consumo humano são as principais ações que garantirão que a cólera se mantenha sob controle no país” (SVS, 2006).

O monitoramento consiste em avaliar a frequência de cepas de *V.cholerae* com potencial epidêmico através de pesquisa direta do vibrião em ambientes aquáticos de regiões endêmicas para cólera. Além de auxiliar na compreensão da dinâmica da epidemia, a pesquisa ambiental possibilita controlar a disseminação destas cepas, mesmo antes da ocorrência de casos da infecção.

Entretanto, a identificação de cepas potencialmente epidêmicas é limitada pela falta de técnicas capazes de detectar tanto um número pequeno de cepas (FARUQUE et al, 2005), quanto bactérias no estado VNC presentes nas amostras de águas ambientais, tornando difícil a eliminação total de casos.

Técnicas que agilizem o resultado do diagnóstico são de fundamental importância já que o método de diagnóstico tradicional, embora de baixo custo, além destas limitações expostas, requer um período de, no mínimo, 48 horas, para disponibilizar o resultado do teste. A agilidade dos resultados é primordial uma vez que, diagnosticado um caso da doença, o tratamento deve ser administrado imediatamente, a fim de diminuir a mortalidade e impedir a transmissão da cólera. Diversos trabalhos baseados em técnicas moleculares para o diagnóstico da cólera, principalmente através de PCR, demonstram as vantagens destes métodos em relação à cultura bacteriana (KEASLER; HALL, 1993; SHANGKUAN et al, 1995; BINSZTEIN et al, 2004).

A STNPCR que utiliza como alvo apenas o gene *ctxA*, além de ser bastante sensível, possibilitando a detecção de até 1 pg de DNA de *V. cholerae* O1, fornece o resultado do teste dentro de poucas horas (MENDES; LEAL, 2005). Porém, ela não detecta cepas de *V. cholerae* O1 não-toxigênicas e, desta forma, não é muito útil no monitoramento ambiental, já que a maioria das cepas presentes no ambiente não são toxigênicas (RIVERA et al, 2001). Tais cepas, entretanto, podem ser convertidas em toxigênicas por aquisição dos bacteriófagos CTX ϕ e VPI ϕ , codificadores de virulência, que estejam presentes na sua forma livre no mesmo ambiente (JENSEN et al, 2006).

A introdução de *primers* que têm como alvo a região relacionada ao antígeno “O” do LPS de *V. cholerae* do sorogrupo O1 possibilita a identificação de cepas independentemente da sua toxigenicidade, bem como de bactérias no estado VNC, com alta sensibilidade.

Inicialmente, foram otimizadas a temperatura de anelamento (TM) e a concentração dos *primers* utilizados, através de PCR simples. A TM é um dos parâmetros mais importantes em um trabalho de padronização de PCR. Henegariu et al (1997) afirmaram que, enquanto alvos individuais (PCR simples) podem ser amplificados a 56 °C - 60 °C, quando se utiliza multiplex PCR, a diminuição da temperatura em 4 °C - 6 °C é necessária.

Diferentemente do que foi observado no início do trabalho, quando a TM ótima da MSTNPCR foi estabelecida em 54 °C, ao término do estudo, quando se realizou o teste de especificidade, a reação funcionou conforme esperado com TM de 60 °C. Talvez a qualidade do DNA utilizado foi melhorada, favorecendo este achado.

Na padronização da STNPCR utilizando apenas um gene alvo realizada por Mendes e Leal (2005), a proporção ideal entre os *primers* *ctxA* internos e externos foi de 10:2 pmol quando o teste foi realizado com DNA de *V. cholerae* O1.

Entretanto, quando foi realizado diretamente da cultura em APA, surgiu uma banda inespecífica nas amostras cuja concentração bacteriana era maior (dados não mostrados). Através de análise da localização dos *primers* no genoma de *V. cholerae* pelo programa DNASTar, é possível sugerir que isto acontece devido a amplificação gerada pelos *primers* *ctxA* internos *forward* e externos *reverse*.

O ideal é que o par de *primers* externos utilizados na STNPCR seja esgotado na primeira fase de amplificação, impedindo que eles inibam a atividade dos *primers* internos. No entanto, foi observado que a diminuição dos *primers* *ctxA* externos acarretou em perda de sensibilidade do teste. Assim, optou-se por aumentar a concentração de *primers* *ctxA* internos, a fim de diminuir a competição destes com os *primers* *ctxA* externos, o que estaria levando à formação da banda inespecífica.

Desta forma, foi realizado um teste com diferentes proporções de *primers* para verificar qual proporção levaria a um melhor resultado em termos de sensibilidade e reprodutibilidade, tendo sido adotada a proporção de 40:2 pmol entre *primers* *ctxA* internos e externos.

Para introdução de um segundo alvo na STNPCR já estabelecida, foi considerada que a melhor forma de adição dos *primers* *rfbN* à reação seria colocando 20 pmol na mistura de reação, juntamente com 2 pmol dos *primers* *ctxA* externos. Utilizando 20 pmol de cada *primer* *rfbN* na tampa, mais 20 pmol dentro do tubo (totalizando 40 pmol), houve amplificação apenas do fragmento correspondente à região do gene *rfbN*. O mesmo ocorreu quando 20 pmol dos *primers* *rfbN* foram fixados na tampa do tubo, juntamente com os *primers* *ctxA* internos.

Tendo em vista que a proporção entre *primers* *ctxA* internos, *ctxA* externos e *rfbN* que apresentou resultados mais consistentes, do ponto de vista de reprodutibilidade, foi de 40:2:20 pmol, esta proporção foi adotada no restante do trabalho.

Embora a amplificação do fragmento do gene *ctxA* tenha sido obtida por uma nested PCR, e portanto, deveria ser mais sensível, a intensidade da banda referente a este gene foi menor do que a do gene *rfbN* (PCR simples).

Henegariu et al (1997) descreveram que quando mais de um alvo é amplificado simultaneamente (multiplex PCR), o alvo mais eficientemente amplificado apresenta influência negativa na amplificação do alvo menos eficiente, devido à competição dos produtos pela enzima e pelos nucleotídeos. Desta forma, é possível que neste caso, os *primers* *rfbN* concorram com os *primers* *ctxA* pelos componentes da reação, levando vantagem na competição.

Isto também pode ser explicado devido ao alto número de ciclos a que os *primers* *rfbN* são expostos na MSTNPCR. Enquanto os *primers* *ctxA* externos são submetidos a 15 ciclos

de amplificação e os internos, a 45 ciclos, os *primers* rfbN passam por 60 ciclos de amplificação, o que justificaria sua maior eficácia.

Em relação ao limiar de detecção, quando realizada com DNA de *V. cholerae* O1, a MSTNPCR demonstrou a mesma sensibilidade que a técnica utilizando apenas um gene alvo (1 pg), como observado por Mendes e Leal (2005).

Também foi muito sensível quando foi efetuada diretamente da cultura em meio de enriquecimento líquido (APA), apresentando limiar de detecção de 3 UFC. A amplificação visível nas amostras cujas culturas em placa não apresentaram crescimento bacteriano, pode ser atribuída à presença de bactérias mortas na cultura (figura 16, linhas 9 e 10).

Os resultados obtidos são similares aos da maioria dos trabalhos descritos na literatura. Varela et al (1994) desenvolveram uma técnica de heminested PCR capaz de detectar *V. cholerae* a partir de amostras de *swabs* de fezes, com sensibilidade de até uma UFC, e Theron et al (2000) padronizaram uma semi-nested PCR que foi sensível quando pelo menos quatro UFC estavam presentes na amostra, após enriquecimento da mesma em meio de cultura.

Shangkuan et al (1995) descreveram uma nested PCR capaz de detectar até três UFC/g de ostras contaminadas com *V. cholerae*, da mesma forma que Falklind et al (1996) conseguiram detectar até uma UFC da bactéria presente na amostra. A grande vantagem da técnica padronizada neste trabalho é que, uma vez que é realizada em um mesmo tubo, ela diminui as chances de contaminação, evitando tanto resultados falso-positivos, como falso-negativos.

Quando a técnica foi realizada diretamente da cultura, surgiram bandas inespecíficas que parecem ter sido provocadas devido ao excesso de DNA-alvo na amostra, visto que à medida que a concentração de DNA diminuiu, as bandas extras desapareceram gradativamente.

No outro extremo, nas amostras contendo baixas concentrações de DNA houve formação de uma banda menor que 100 bp que pode ser atribuída à formação de dímeros de *primers* resultantes de anelamento entre os *primers*, o que permite à *Taq* polimerase promover a extensão do fragmento formado. Em reações onde há excesso de *primers* na amostra, em relação à quantidade de DNA-alvo, a dimerização de *primers* é um achado comum (MACKAY, 2006).

Apesar de não ter sido objetivo do trabalho, observou-se com surpresa que, quando foi utilizado termociclador que não exige o uso de óleo encobrindo a mistura de reação, a sensibilidade da MSTNPCR aqui descrita passou de 1 pg para 1 ng. Acredita-se que isto tenha ocorrido devido à alta temperatura (90 °C) na tampa do bloco do termociclador, necessária para que a mistura de reação não evapore. Talvez o excesso de calor tenha desnaturado os *primers* fixados na tampa, embora o mesmo não tenha ocorrido nas outras padronizações da STNPCR (ABATH et al, 2002; SOUSA et al, 2005; MELO et al, 2006).

Mudanças como modelo do termociclador, lote e fabricante da enzima *Taq* polimerase utilizados na reação, são variáveis que podem alterar o limiar de detecção da técnica (CAETANO-ANOLLE'S et al, 1992; HE et al, 1994). Desta forma, a otimização das concentrações dos reagentes e da TM talvez seja necessária a cada troca de lote ou de fabricante de componentes da reação, bem como do modelo de termociclador utilizado. Contudo, para afirmar isto com mais segurança, seriam necessárias mais repetições dos testes.

Quando a MSTNPCR foi realizada com microrganismos diferentes de *V. cholerae*, surgiram algumas bandas inespecíficas. Contudo, ao aumentar as condições de estrigência da reação através da elevação da temperatura de anelamento dos *primers* nas duas etapas de amplificação, as bandas indesejadas diminuíram significativamente (dados não mostrados).

Visto que estas bandas apresentam tamanho diferente dos fragmentos desejados, e uma vez que não são reprodutíveis, sua presença não representa desvantagem. Desta forma, além

de sensível, a técnica foi específica para *V. cholerae* O1, inclusive quando o DNA deste microrganismo estava misturado ao genoma de outras bactérias.

Apesar do sistema não ter se mostrado muito robusto em relação a mudanças de termociclador e de lote de *primers* e enzima, e mesmo apresentando bandas inespecíficas e dímeros de *primers*, ele foi bastante sensível e específico para *V. cholerae* O1.

Além disso, a estabilidade do *kit* diagnóstico durante quatro meses representa uma grande vantagem da MSTNPCR, tendo em vista que este *kit* facilita o manejo do teste e agiliza o resultado do mesmo. Uma vez que a técnica apresentou boa sensibilidade e reprodutibilidade quando realizada diretamente da cultura, e que é capaz de detectar bactérias toxigênicas ou não e no estado VNC, acredita-se que ela pode ser uma ferramenta útil na investigação de *V. cholerae* O1 em mananciais aquáticos de regiões endêmicas, servindo como método complementar à cultura bacteriana.

Com isso, pretende-se disponibilizar *kits* diagnósticos aos Laboratórios Centrais para que sejam utilizados pelos serviços de monitoramento e investigação epidemiológica que pesquisam a presença do vibrião colérico em mananciais aquáticos.

Além disso, a MSTNPCR pode ser utilizada em substituição ao teste de ELISA para pesquisa da toxina colérica, sendo realizada 6 horas (enriquecimento em APA) após o recebimento da amostra pelo laboratório, agilizando o diagnóstico e reduzindo os custos do mesmo.

Outra vantagem da técnica é a possibilidade de identificar o potencial toxigênico de cepas de *V. cholerae* que se mostram auto-aglutináveis em suspensão salina (cepas rugosas) e que não podem ser classificadas através de sorologia para o sorogrupo, não sendo submetidas ao teste de ELISA para detecção da toxina.

Embora a presença de dímeros de *primers* e de bandas inespecíficas não represente prejuízo ao teste, tendo em vista que os fragmentos desejados podem ser facilmente

visualizados e identificados, pode-se prevenir a formação de produtos indesejados através de alterações na ciclagem (*hot start* PCR) e nas concentrações dos componentes de reação (BIRCH et al, 1996; HENEGARIU et al, 1997; KAINZ et al, 2000). Tais modificações serão, possivelmente, testadas no intuito de aperfeiçoar o teste.

A padronização da MSTNPCR diretamente de amostras de fezes contaminadas está em andamento e, uma vez que apresente resultados satisfatórios, poderá ser utilizada para agilizar a detecção de casos de cólera.

10 CONCLUSÕES

1. A técnica desenvolvida neste trabalho é capaz de detectar, diretamente da cultura, até 3 UFC de *V. cholerae* O1, seja a bactéria toxigênica ou não, com a vantagem de reduzir a possibilidade de contaminação com DNA-alvo ou DNAsas, o que levaria a resultados falso-positivos e falso-negativos, respectivamente.
2. A adição de *primers* direcionados a um segundo gene não alterou o limiar de detecção da técnica que utiliza apenas um gene como alvo, quando realizada com DNA de *V. cholerae* O1.
3. A MSTNPCR apresentou especificidade para *V. cholerae* O1, amplificando os fragmentos de tamanho desejado quando o DNA desta bactéria estava presente na amostra, mesmo na presença de outras bactérias.
4. O *kit* diagnóstico manteve-se estável durante quatro meses, até então, o que possibilita o fornecimento do mesmo aos laboratórios interessados na pesquisa do vibrião colérico, a partir de águas ambientais contaminadas com o bacilo.
5. Os fragmentos obtidos pela MSTNPCR apresentaram identidade com as regiões genômicas de *V. cholerae* O1 correspondentes aos genes *ctxA* e *rfbN*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABATH, F.G. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal *primers*. **BioTechniques**, v.33, p.1210–1214, 2002.
2. ALDOVA, E. et al. Isolation of nonagglutinable *Vibrios* from an enteritis outbreak in Czechoslovakia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 118, p. 25-31, 1968.
3. AUSUBEL, F.M. et al. **Current Protocol in Molecular Biology**, Wiley, New York, 1987.
4. BARUA, D.; GREENOUGH, W.B. in **Current Topics in infectious disease**, p. 372, Ed. Plenum, New York, 1991.
5. BERG, J. et al. Single-tube two-round polymerase chain reaction using the LightCycler™ instrument. **Journal of Clinical Virology**, v. 20, p. 71-75, 2001.
6. BERTOLINI, E. et al. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by Nested PCR in a single closed tube. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, p. 261-266, 2003.
7. BINSZTEIN, N. et al. Viable but non culturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 7481-7486, 2004.
8. BIRCH, D.E. et al. Simplified hot start PCR. **Nature**, v. 381, p. 445-446, 1996.
9. CAETANO-ANOLLE´S et al. Primer template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. **Molecular & General Genetics**, v. 235, p. 157-165, 1992.
10. CARRILLO, L. et al. Rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 in stools of Peruvian cholera patients by using monoclonal immunodiagnostic kits. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 856-857, 1994.
11. CDC – Centers for Disease Control. **Métodos de laboratório para el diagnóstico de *Vibrio cholerae***, 148 p., 1994.
12. CDC – Centers for Disease Control. **Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera**, cap. 6, p. 41-51, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera/ch6.pdf>>. Acesso em: 28 de junho de 2005.
13. CDC – Centers for Disease Control. Cholera Epidemic Associated with Raw Vegetables - Lusaka, Zambia, 2003–2004, **Morbidity and mortality weekly report**, v. 53(34), p. 783-786, 2004. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5334a2.htm>>. Acesso em: 01 de março de 2006.

14. CHAKRABORTY, S. et al. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4022-4028, 2000.
15. COLWELL, R.R. et al. Development and evaluation of a rapid, simple, sensitive, monoclonal antibody-based co-agglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97, p. 215-220, 1992.
16. COLWELL, R.R. Global climate change and infectious diseases: the cholera paradigm. **Science**, v. 274, p. 2025-2031, 1996a.
17. COLWELL, R.R. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 12, p. 28, 1996b.
18. DAKIN, W.P. et al. Gastroenteritis due to non-agglutinable (non-cholera) Vibrios. **The Medical Journal of Australia**, v.2, p. 487-490, 1974.
19. DALSGAARD, A. et al. Clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* serogroup O141 carry the CTX phage and the genes encoding the toxin-coregulated pili. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4086-4092, 2001.
20. FALKLIND, S. et al. Cloning and Sequencing of a Region of *Vibrio cholerae* O139 Bengal and Its Use in PCR-Based Detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2904-2908, 1996.
21. FALLARINO, A.C. et al. Identification of additional genes required for O-antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 2147-2153, 1997.
22. FARUQUE, S.M. et al. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 1301-1314, 1998.
23. FARUQUE, S.M. et al. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: role of host-mediated amplification of phage. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 102, p. 6119-6124, 2005.
24. FINKELSTEIN, R.A. 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 de 2006.
25. FROST, W.H. Introdução. In: **Sobre a maneira de transmissão do cólera**. Snow, J. 2ª ed., Hucitec-Abrasco, São Paulo – Rio de Janeiro, p.27-35, 1999.
26. GHOSH, C. et al. A search for cholera toxin (CT), toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element ToxR and other virulence factors in non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 22, p. 199-208, 1997.
27. GONÇALVES, E.G.; HOFER, E. Cólera. In: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Edt. Guanabara Koogan, cap. 114, p. 1367-1373, Rio de Janeiro, 2005.

28. GOOKIN, J.L. et al. Single-tube nested PCR for detection of *Trichomonas faetus* in feline feces. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 4126-4130, 2002.
29. GUTHMAN, J. Epidemic cholera in Latin America: spread and routes of transmission. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, p. 419-427, 1995.
30. HASAN, J.A.K. et al. A novel kit for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 249-252, 1994.
31. HE, Q. et al. Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular and Cellular Probes*, v. 8, p. 155-159, 1994.
32. HEIDELBERG, J. F. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, v. 406, p. 477- 484, 2000.
33. HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: clinical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, v. 23, p. 504-511, 1997.
34. HERRMANN, B. et al. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* from air-dried genital samples by single-tube nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p. 2548-2551, 1996.
35. HERRINGTON, D.A. et al. 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, 1988.
36. HILL, D.R. Oral cholerae vaccines: use in clinical practice. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, p. 361-373, 2006.
37. HOFER, E. Cholera in Brazil: analysis of some bacteriologic clinical, and epidemiologic characteristics. In: Pestana de Castro, A.F.; Almeida, W.F. Cholera on the American Continents, *International Life Sciences Institute*, p. 167-170, 1993.
38. ISLAM, M.S. et al. 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, p. 160-163, 1992.
39. ISLAM, M.S. et al. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: a review. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*. v. 12, p. 87-96, 1994.
40. ISLAM, M.S. et al. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiology and Immunology*, v. 48, p. 229-235, 2004.
41. JENSEN, M.A. et al. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, p. 4652-4657, 2006.

42. KAINZ, P. et al. Specificity-enhanced hot-start PCR: addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature. **BioTechniques**, v. 28, p. 278-282, 2000.
43. KARAOLIS, D.K.R. et al. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3134-3139, 1998.
44. KARAOLIS, D.K.R. et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and phage receptor in cholera bacteria. **Nature**, v. 399, p. 375-379, 1999.
45. KEASLER, S.P.; HALL, R.H. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. **The Lancet**, v.341, p.1661, 1993.
46. KO, W.C. et al. Infections due to non-O1 *Vibrio cholerae* in southern Taiwan: predominance in cirrhotic patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p. 774-780, 1998.
47. KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ª ed., Edt. Medsi, Rio de Janeiro, 2001.
48. KONG, R.Y. et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR, **Water Research**, v. 36, p. 2802-2812, 2002.
49. KWOK, S. & HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, p. 237-238, 1989.
50. LACEY, S.W. Cholera: calamitous past, ominous future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 409, 1995.
51. LEAL, N.C. et al. A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 38, p.371-373,1996.
52. LEAL, N.C. et al. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil, **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 447-454, 2004.
53. LI, M. et al. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2441-2453, 2002.
54. LLOP, P. et al. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2071-2078, 2000.
55. MACKAY, I.M. PCR down under. Disponível em: <http://www.uq.edu.au/vdu/PCRDownUnder.htm>. Acesso em: 23 de outubro de 2006.
56. MATHIS, A. et al. Reliable one-tube nested PCR for detection and SSCP-typing of *Pneumocystis carinii*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, p. 7S, 1996.

57. MELO, F.L. et al. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 1049-55, 2006.
58. MENDES, C.L.; LEAL, N.C. **Padronização da técnica de Nested PCR em tubo único para diagnóstico de cólera**. Recife: UPE, 2005. Originalmente apresentada como dissertação de curso de especialização, 39 p. Universidade de Pernambuco, 2005.
59. MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS, Brasil. **Cólera: Transmissão e Prevenção em Alimentos e Ambiente**, 1992.
60. MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS, Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Cólera**, cap. 5. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GVE/GVE0502d.htm>>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2006.
61. MONTENEGRO, L. M. et al. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 10, p. 619-625, Oct. 2004.
62. MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.
63. NATO, F. et al. One-step immunochromatographic dipstick test for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 476-478, 2003.
64. OLMOS, A. et al. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 1564-1565, 1999.
65. PANICKER, G. et al. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 7436-7444, 2004.
66. RAHMAN, M. et al. Rapid identification of *Vibrio cholerae* O1 from primary isolation plates by coagglutination test. **Journal of Medical Microbiology**, v. 28, p. 38-41, 1989.
67. REIDL, J., KLOSE, K.E. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 125-139, 2002.
68. RICE, E.W. et al. *Vibrio cholerae* O1 can assume a ‘rugose’ survival form that resists killing by chlorine, yet retains virulence. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 3, p. 89-98, 1993.

69. RIVERA, I.N.G. et al. Genotypes associated with the virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2421-2429, 2001.
70. RIVERA, I.N.G. et al Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 5, p. 599-606, 2003.
71. ROCHETTA, H.L. et al. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 523-553, 1999.
72. ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology Reviews**, v. 51, pg. 365-379, 1987.
73. SACK, D.A. et al. Cholera. **The Lancet**, v. 363, p. 223-233, 2004.
74. SACK, R.B.; MILLER, C.E. Progressive changes in *Vibrio* serotypes in germ-free mice infected with *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v. 99, p. 688-695, 1969.
75. SES - SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. São Paulo. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água**, 2003. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/IF_514COL.htm>. Acesso em: 23 de agosto de 2005.
76. SHANGKUAN, Y.H. et al. Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 264-273. 1995.
77. SHIMADA, T. et al. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. **The Lancet**, v. 341, p. 1347, 1993.
78. SNOW, J.M.D. **Mode of communication of cholera**. 2nd edition, London, 1854.
79. SOUZA, G.T. et al. **Avaliação da técnica Nested – PCR Tbu para aplicação no diagnóstico da peste**. Recife: CPqAM, 2005. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, 64 p. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2005.
80. SVS – SERVIÇO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Cólera - Distribuição de casos confirmados por Unidade Federada de 1980 a 2003**. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/colera.pdf>>. Acesso em 06 de setembro de 2005, 2005a.
81. SVS – SERVIÇO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Cólera - Histórico da Doença**. Disponível em: <http://portalweb02.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21683>. Acesso em: 06 de setembro de 2005, 2005b.
82. SVS – SERVIÇO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Doenças Transmissíveis – Cólera**. Disponível em:

- <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21929>. Acesso em: 02 de março de 2006.
83. THERON, J. et al. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation pit-stop seminested PCR procedure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 539 - 546 , 2000.
 84. THOMAS, J. Données actuelles concernant la pathogenie, les signes cliniques et l'évolution du cholera. **Medicine Tropicale**, v. 31, p. 71, 1970.
 85. THOMPSON, F.L. et al. Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 403-431, 2004.
 86. VARELA, P. et al. Direct detection of *Vibrio cholerae* in stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1236-1248, 1994.
 87. VILCHIS-GUIZAR, A.E. et al. Características clínico-epidemiológicas de pacientes con cólera en la ciudad de México. **Salud Pública de México**, v. 41, p. 487-491, 1999.
 88. WALDOR, M.K.; MEKALANOS, J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, v. 272, p. 1910-1914, 1996.
 89. WHO - World Health Organization. Cholera, 2004. **Mozambique mass campaign tests the theory**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr3/en/>>. Acesso em: 02 de março de 2006.
 90. WHO - World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record**, v. 80, p. 261-268, 2005.
 91. WHO World Health Organization. Cholera, 2006. **Global epidemics and impact of cholera**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cholera/impact/en/index.html>>. Acesso em: 01 de março de 2006a.
 92. WHO – World Health Organization. **Weekly Epidemiological Record**, v. 81, p. 297-308, 2006b.
 93. YAMAI, S.O. et al. 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. **Kansenshogakee Zasshi**, v. 71, p. 1037-1045, 1997.
 94. YLITALO, N. et al. Detection of genital human papillomavirus by single-tube nested PCR and type-specific oligonucleotide hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1822-1828, 1995.

ARTIGO

DESENVOLVIMENTO DE UMA MULTIPLEX NESTED PCR PARA DETECÇÃO DE *Vibrio cholerae* O1

Carina L. Mendes ^{a,*}, Frederico G.C. Abath ^b, Nilma C. Leal ^a

^a Departamento de Microbiologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brasil.

^b Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brasil.

Manuscrito a ser submetido para publicação na revista “Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene”

DESENVOLVIMENTO DE UMA MULTIPLEX NESTED PCR PARA DETECÇÃO DE *Vibrio cholerae* O1

RESUMO

Um método molecular baseado na amplificação do DNA de *Vibrio cholerae* foi desenvolvido para utilização no diagnóstico da cólera e monitoramento de águas ambientais. O método consiste numa nested PCR realizada em um mesmo tubo, o que minimiza as chances de contaminação. Inicialmente foi padronizado com um só alvo (STNPCR) e teve seu limiar de detecção comparado ao da PCR simples e nested PCR convencional. Posteriormente foi adaptado para utilizar um segundo gene alvo (MSTNPCR), e o limiar de detecção foi avaliado com DNA e diretamente da cultura líquida do vibrião colérico. A STNPCR foi aproximadamente 100 vezes mais sensível do que a PCR simples e 10 vezes menos sensível do que a nested PCR convencional, detectando até 1 pg do DNA de *V. cholerae*. A adição de um segundo gene alvo à MSTNPCR não alterou o limiar de detecção de DNA do vibrião e foi capaz de detectar até 3 Unidades Formadoras de Colônia diretamente da cultura líquida. Além disso, foi específica para *V. cholerae*, inclusive quando o DNA do bacilo estava misturado ao DNA de outros microrganismos. Um kit diagnóstico foi montado e congelado a -20°C, permanecendo estável durante quatro meses. A detecção de *V. cholerae* O1 diretamente da cultura, além de agilizar os resultados, permite que a técnica seja utilizada em águas provenientes de mananciais de regiões endêmicas para a cólera. Ademais, uma vez que a técnica utilizada em amostras fecais seja satisfatória, poderá ser aplicada para diagnóstico da infecção e para complementar a identificação das cepas toxigênicas isoladas pela cultura.

Palavras-chave: multiplex, nested, PCR, cólera, diagnóstico.

*Autor Correspondente. Tel: 55 81 21012568. Fax: email: carina@cpqam.fiocruz.br

1 INTRODUÇÃO

A cólera ainda acomete um grande número de indivíduos em todo o mundo, sendo que um total de 131 943 casos foi notificado à WHO em 2005, incluindo 2 272 mortes (WHO, 2006). De 1991, quando a cólera foi reintroduzida no Brasil (Hofer, 1993; Guthmann, 1995), até 2001, foram registrados 168 624 casos humanos, dos quais 166 357 ocorreram na região nordeste (MS - Brasil, 2002). Novos casos foram notificados em 2004 (21) e 2005 (05) no estado de Pernambuco (MS - Brasil, 2005).

Durante a epidemia, a maioria dos casos teve confirmação laboratorial pelo método tradicional de diagnóstico como recomendado no Manual do Ministério da Saúde do Brasil (MS - Brasil, 1992). O método considerado padrão ouro para diagnóstico da cólera é o enriquecimento em água peptonada alcalina (APA) seguido da cultura em meio seletivo ágar TCBS (Tiosulfato Citrato Bile e Sacarose), técnica que além de exigir microrganismos vivos na amostra, não detecta bactérias no estado viável mas não cultivável – VNC (Binsztein et al, 2004), condição comum quando há privação de nutrientes e condições de estresse ambiental, como variação de pH e temperatura da água (Faruque; Nair, 2002). Colônias amarelas no meio TCBS, fermentadoras da sacarose, são repicadas para meio de triagem e submetidas ao teste da oxidase e, para identificação completa do *Vibrio cholerae* O1, são necessários testes complementares bioquímicos, sorológicos e de produção da toxina colérica (ELISA). É um procedimento demorado que chega a 72 horas (Gonçalves; Hofer, 2005).

Assim, em relação à cultura bacteriana, os testes moleculares rápidos e precisos são vantajosos para detecção do *Vibrio* diretamente da amostra biológica, água, fezes ou vômitos. Podem também substituir o teste de ELISA de identificação da toxina colérica na complementação do diagnóstico do *V. cholerae* isolado.

Técnicas moleculares baseadas na amplificação de DNA já foram desenvolvidas para diagnóstico do *V. cholerae* utilizando genes de virulência em uma reação de Multiplex PCR (Keasler; Hall 1993) e outros genes, através de PCR simples (Bravo et al, 1992; Israil et al, 2004), nested PCR (Varela et al, 1994;), hemi-nested-PCR (Theron et al, 2000), multiplex PCR (Mantri et al, 2006), PCR em tempo real (Blackstone et al, 2006; Gubala, 2006).

Em 2002, foi padronizada uma técnica de nested PCR em tubo único, desenvolvida por Abath et al (2002), em que os *primers* internos são imobilizados na face interna da tampa do tubo, diminuindo os riscos de contaminação interna. Esta técnica foi padronizada para detecção dos microrganismos *Schistosoma* (Abath et al, 2002; Melo et al, 2006), *Plasmodium* (Montenegro et al, 2004) e *Yersinia pestis* (Souza et al, submetido).

No presente trabalho, padronizamos a STNPCR para identificação do *V. cholerae* O1 toxigênico, comparando a técnica com PCR simples e nested PCR convencional, a partir do DNA de *V. cholerae* O1. Uma vez que a STNPCR só é capaz de detectar cepas toxigênicas, decidimos adicionar um segundo gene alvo à reação, transformando-a em uma multiplex nested PCR em tubo único (MSTNPCR) capaz de detectar *V. cholerae* O1 independentemente de sua toxigenicidade. Para isso, o gene de virulência *ctxA*, codificador da toxina colérica, foi amplificado com dois pares de *primers*, compondo a nested PCR, e o gene *rfbN*, específico para o sorogrupo O1 do vibrião colérico, foi amplificado com um par de *primers*. Uma vez que a maioria das cepas ambientais de *V. cholerae* são não toxigênicas, mas podem ser infectadas por fagos de virulência, a MSTNPCR é útil no monitoramento ambiental de regiões endêmicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CEPAS BACTERIANAS E EXTRAÇÃO DO DNA

A cepa de referência de *V. cholerae* O1 569B Clássico/Inaba foi utilizada como padrão em todos os passos do trabalho. Para avaliar a especificidade da MSTNPCR, foram utilizados os seguintes microrganismos: *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *V. alginolyticus*, *V. mimicus* e *V. parahaemolyticus*. Para extração do DNA das bactérias, foi seguido o protocolo descrito por Ausubel et al (1987), e modificado por Leal et al (2004), a partir de 1 mL da cultura em água peptonada alcalina (APA) para *Aeromonas* e microrganismos do gênero *Vibrio*, e em caldo BHI para as outras bactérias.

2.2 SELEÇÃO E SÍNTESE DOS *PRIMERS* PARA PCR

Os alvos da PCR foram os genes *ctxA*, codificador da subunidade A da toxina colérica (Mekalanos et al, 1983) e *rfbN* responsável pelo lipopolissacarídeo (LPS) específico do *V. cholerae* O1. Para o gene *ctxA* foram utilizados os *primers* internos 5'ACAGAGTGAGTACTTTGACC3' e 5'CTTTAACTTTAGATTGGTATTC3', descritos por Keasler & Hall (1993), e os *primers* externos 5'TCTATCTCTGTAGCCCCCTATTACG3' (obtido com o software DNASTAR) e 5'CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG3' (Li et al,

2002). Para o gene *rfbN* foram utilizados os *primers* 5'GTTTCACTGAACAGATGGG3' e 5'GGTCATCTGTAAGTACAA C3', referentes ao lipopolissacarídeo de *V. cholerae* O1 (Islam, et al, 2004). No primeiro passo da PCR com os *primers* externos direcionados para o gene *ctxA* amplifica-se um fragmento de 600 pb, em quantidade mínima que não é visualizada, enquanto o produto final da nested PCR é um fragmento de 302 pb. Em relação ao gene *rfbN*, é amplificado um segmento de 198 pb. Os *primers* foram sintetizados por Invitrogen do Brasil.

2.3 REAÇÕES DE PCR

Em todas as reações do trabalho, foi adicionado um controle negativo, sem DNA, e a mistura de reação foi recoberta com óleo mineral para evitar a evaporação da amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata para avaliar a reprodutibilidade da técnica e foi utilizado um termociclador Biometra TRIO-thermoblock.

2.3.1 PCR simples

A mistura de reação (volume final = 25 µL) continha Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 200 µM, *primers* externos 20 pmol cada, 1U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), e 20 ng do DNA de *V. cholerae* O1. O DNA foi amplificado durante 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54 °C e 1 minuto a 72 °C. Após esses ciclos, os tubos permaneceram a 72°C por 7 minutos para a extensão final.

2.3.2 Nested PCR convencional

A mistura de reação da nested PCR convencional foi a mesma da PCR simples, modificando os *primers* e o DNA-alvo. Neste caso, foram utilizados 20 pmol de cada um dos *primers* internos e 2 µL do produto de amplificação da PCR simples. As condições de ciclagem também foram as mesmas descritas para a PCR simples.

2.3.3 STNPCR

Para definir a proporção ótima de *primers* para a STNPCR foram testadas várias proporções (20:2, 20:1, 10:2 e 10:1, internos e externos. Foram utilizados 20 pmol de *primers*

internos, a mesma quantidade da PCR simples, fixados na tampa do tubo de amplificação por evaporação, juntamente com traços de azul de bromofenol. Dois pmol dos *primers* externos foram adicionados à mistura de reação, Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTP's 200µM, 2U de *Taq* DNA polimerase (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), e DNA alvo, para um volume final de 50µL.

Para amplificação foi adotado um ciclo térmico em duas etapas com os seguintes parâmetros: na primeira etapa, foram 15 ciclos de 1 minuto a 90 °C, 1 minuto a 54 °C e 1 minuto a 72 °C, após os quais os tubos permaneceram durante 7 minutos a 72 °C para extensão final. Depois de uma pausa de aproximadamente 1 minuto a 90 °C, os tubos foram invertidos várias vezes para eluição dos *primers* anteriormente fixados na tampa.

Após breve centrifugação, os tubos retornaram ao termociclador para a segunda etapa de amplificação, de 45 ciclos de 1 minuto a 90 °C, 1 minuto a 54 °C e 1 minuto a 72 °C. Depois os tubos permaneceram durante 7 minutos a 72 °C para extensão final.

2.4 INTRODUÇÃO DOS PRIMERS *rfbN* À STNPCR (MSTNPCR)

Primers para o gene *rfbN* foram adicionados à STNPCR de três formas distintas: na primeira, 20 pmol dos *primers* foram fixados na face interna da tampa do tubo, juntamente com 40 pmol de *primers* internos para o gene *ctxA*; na segunda, 20 pmol na face interna da tampa e 20 pmol na mistura de reação, totalizando 40 pmol; e na terceira, 20 pmol dos *primers* para o gene *rfbN* foram colocados na mistura de reação, juntamente com os *primers* externos do gene *ctxA*. As condições da reação foram as mesmas descritas anteriormente.

2.5 LIMIAR DE DETECÇÃO

Para a determinação do limite de detecção das técnicas baseadas em PCR, foram realizadas diluições seriadas, em escala decimal, do DNA de *V. cholerae* O1 iniciando em 1 ng até 0,01 fg.

Após padronizar a forma de adição dos *primers* para o gene *rfbN* à reação em tubo único, para amplificação do segundo alvo, foi avaliado o limiar de detecção da MSTNPCR, com DNA e com cultura em APA de *V. cholerae* O1 clássico 569B. A cepa foi reativada, semeada em TCBS e incubada a 37°C durante 24 horas. Uma colônia foi retirada da placa, inoculada em APA pH 8.6 e incubada a 37 °C durante 24 horas. A cultura em APA foi diluída (1:10), de 10 até 10⁻⁸, e 10 µL de cada diluição foram semeados em TCBS, para posterior

contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), ao mesmo tempo que uma alíquota de 100 µL foi levada ao banho-maria a 100°C, por 10 minutos para ruptura de membranas e exposição do material genético. As amostras foram colocadas, imediatamente, em gelo e 10µL de cada uma delas foram utilizados como alvo na reação de MSTNPCR.

2.6 SEQÜENCIAMENTO

A identidade dos produtos da MSTNPCR foi confirmada por seqüenciamento utilizando o *kit* Purelink™ PCR Purification Kit (Invitrogen) para purificação dos fragmentos e o *kit* Big Dye Terminator v.3.1, Applied Biosystems para mistura do seqüenciamento. A reação ocorreu em seqüenciador automático (Genetic Analyser ABI Prism 3100, Applied Biosystems). Foram utilizados os *primers* para os genes *ctxA* (internos) e *rfbN*, tanto no sentido *forward* como *reverse* em tubos individuais. Após seqüenciamento, os segmentos gênicos de 302 pb (*ctxA*) e 198 pb (*rfbN*) foram alinhados pelo programa BLAST para verificar a sua identidade.

2.7 CONFECÇÃO DE UM *KIT* DIAGNÓSTICO

Foi preparado um *kit* da MSTNPCR contendo tubos com *primers ctxA* internos fixados na tampa e um tubo à parte contendo a mistura de reação com tampão, dNTP's, e *primers* para os genes *ctxA* (externos) e *rfbN*, nas concentrações já padronizadas. Optou-se por não acrescentar a *Taq* DNA polimerase por receio de que a enzima perdesse sua atividade polimerásica. O *kit* foi armazenado a -20 °C e testado mensalmente para verificação da sua estabilidade.

Na utilização do *kit*, era adicionado ao tubo com *primers* internos para o gene *ctxA* na tampa: 1 µg do DNA ou 10 µL da cultura em APA, nas diversas diluições, 13 µL da mistura

de reação, 0,4 µL (2U) de *Taq* DNA polimerase e água deionizada estéril na quantidade necessária para completar o volume de 50 µL.

2.8 VISUALIZAÇÃO DOS AMPLICONS

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese a 100 v durante 60 minutos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, e visualizados através do programa Kodak 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Co., New Haven, CT, USA).

3 RESULTADOS

3.1 STNPCR

O limiar de detecção do DNA purificado de *V. cholerae* O1 na PCR simples foi de 100 pg, enquanto que na nested PCR convencional foi de 100 fg e da STNPCR utilizando um gene alvo, foi de 1 pg (figura 1).

3.2 INTRODUÇÃO DOS *PRIMERS* PARA O GENE *rfbN*

Os produtos de amplificação da MSTNPCR quando os *primers* direcionados ao gene *rfbN* foram adicionados à reação mostraram um fragmento de 198 pb referente à porção amplificada do gene *rfbN*, e o de 302 pb correspondente à região do gene *ctxA* (figura 2, linha 5). Como a amplificação conjunta dos dois genes só foi observada quando 20 pmol dos *primers* *rfbN* foram adicionados dentro do tubo, esta foi a condição adotada.

3.3 MSTNPCR

A adição de outro par de *primers* à reação de STNPCR não alterou o seu limiar de detecção de DNA de *V. cholerae* O1, amplificando uma banda visível até na quantidade de 1 pg (figura 3).

A MSTNPCR, quando foi realizada diretamente da cultura em APA apresentou amplificação visível até a diluição 10^{-7} , mas só foi observado crescimento de UFC no meio TCBS até a diluição 10^{-6} (figura 4).

3.4 ESPECIFICIDADE

Para avaliar a especificidade dos *primers* utilizados na MSTNPCR cada par de *primers* foi testado por PCR simples com DNA extraído e purificado de bactérias de 10 espécies enteropatogênicas. As análises indicaram que todos os pares de *primers* amplificaram segmentos dos tamanhos esperados só com o *V. cholerae* O1 (figura 5), inclusive quando o DNA da bactéria estava misturado ao genoma dos outros microrganismos utilizados no estudo (figura 5, linha 11). Houve surgimento de bandas inespecíficas (figura 5, linhas 2, 3, 4, 7 e 9), que ao aumentar a TM, diminuíram significativamente (dados não mostrados).

Para confirmar a identidade dos amplicons, eles foram seqüenciados e apresentaram identidade com as regiões do genoma de *V. cholerae* correspondente aos genes *ctxA* e *rfbN*, com 99% e 97% de similaridade, respectivamente.

3.5 REPRODUTIBILIDADE

As triplicatas de todas as reações do trabalho mostraram os mesmos resultados.

3.6 KIT DIAGNÓSTICO

O *kit* da MSTNPCR mantido a -20°C foi descongelado e aliquotado uma vez por mês, durante quatro meses, permanecendo estável e mantendo, inclusive, o mesmo limiar de detecção de 1 pg.

4 DISCUSSÃO

A variação de STNPCR desenvolvida por Abath et al (2002) apresenta duas principais vantagens. A primeira é a alta sensibilidade obtida sem risco de contaminação, evitando tanto resultados falso-positivos, como falso-negativos, que ocorre com frequência na nested PCR convencional quando se transfere seqüências já amplificadas para um segundo tubo de reação (Picken et al, 1996). A segunda é a possibilidade do uso de diversos *primers* sem modificação da temperatura de anelamento, condição que possibilita maior liberdade na escolha dos *primers*, quando se compara com outras técnicas de nested PCR em tubo único em que a seqüência dos *primers* necessita de temperaturas diferentes para que o anelamento ocorra com eficiência (Olmos et al, 1999). A exigência para o melhor desempenho da reação é estabelecer

a quantidade dos *primers* externos para que se esgotem antes da entrada dos *primers* internos na reação, a fim de que não interfiram na segunda amplificação.

Inicialmente, a técnica de STNPCR para diagnóstico de *V. cholerae* O1 foi padronizada com apenas um alvo, o gene *ctxA*, e teve seu limiar de detecção comparado ao da PCR simples e nested PCR convencional utilizando DNA de *V. cholerae* O1. A STNPCR utilizando um gene alvo foi aproximadamente 100 vezes mais sensível do que a PCR simples e 10 vezes menos sensível do que a nested convencional, como esperado, uma vez que os inibidores da enzima são diluídos na nested convencional, mas não na reação em tubo único. Em seguida, *primers* direcionados ao gene *rfbN*, específicos para o sorogrupo O1 do vibrião colérico, foram adicionados à reação. O limiar de detecção da técnica foi estabelecido com DNA purificado e com cultura em APA. A introdução de um segundo par de *primers*, focado na detecção de outro gene, conservou a sensibilidade da reação e demonstrou especificidade para *V. cholerae* O1. Assim, foi transformada em uma multiplex nested PCR (MSTNPCR).

A STNPCR que utiliza como alvo apenas o gene *ctxA*, além de ser bastante sensível, possibilitando a detecção de até 1 pg de DNA de *V. cholerae* O1, fornece o resultado do teste dentro de poucas horas. Porém, ela não detecta cepas de *V. cholerae* O1 não-toxigênicas e, desta forma, não é muito útil no monitoramento ambiental, já que a maioria das cepas presentes no ambiente não são toxigênicas (Rivera et al, 2001), mas podem ser convertidas em toxigênicas por aquisição dos bacteriófagos CTX ϕ e VPI ϕ , codificadores de virulência, que estejam presentes no mesmo ambiente (Jensen et al, 2006).

A introdução de *primers* que têm como alvo a região relacionada ao antígeno “O” do LPS de *V. cholerae* do sorogrupo O1 possibilita a identificação de cepas independentemente da sua toxigenicidade, bem como de bactérias no estado VNC, com alta sensibilidade.

Para introdução de um segundo alvo na STNPCR já estabelecida, utilizou-se 20 pmol dos *primers* para o gene *rfbN* na mistura de reação, juntamente com dois pmol dos *primers* externos para o gene *ctxA*. As outras condições de adição dos *primers* para o gene *rfbN* foram descartadas uma vez que utilizando 20 pmol de cada um destes *primers* na tampa, mais 20 pmol deles dentro do tubo

(totalizando 40 pmol), houve amplificação apenas do fragmento correspondente à região do gene *rfbN* e quando 20 pmol dos *primers* para o gene *rfbN* foram fixados na tampa do tubo, juntamente com os *primers* internos para o gene *ctxA*, houve amplificação apenas da região do gene *ctxA*.

Embora a amplificação do fragmento do gene *ctxA* tenha sido obtida por uma nested PCR, e portanto, deveria ser mais sensível, a intensidade da banda referente a este gene foi menor do que a do gene *rfbN*, obtido por uma PCR simples. Henegariu et al (1997) descrevem que quando mais de um alvo é amplificado simultaneamente (multiplex PCR), o alvo mais eficientemente amplificado apresenta influência negativa na amplificação do alvo menos eficiente, devido à competição dos produtos pela enzima e pelos nucleotídeos. Desta forma, é possível que neste caso, haja uma competição entre os *primers* para o gene *rfbN* e os *primers* para o gene *ctxA* pelos componentes da reação, e a amplificação do gene *rfbN* seja mais vantajosa. Isto também pode ser explicado devido ao alto número de ciclos a que os *primers* *rfbN* são expostos na MSTNPCR. Enquanto os *primers* *ctxA* externos são submetidos a 15 ciclos de amplificação e os internos, a 45 ciclos, os *primers* *rfbN* passam por 60 ciclos de amplificação, o que poderia justificar uma maior produção de amplicons.

Quando foi realizada MSTNPCR, a concentração de *primers* internos foi aumentada de 20 pmol para 40 pmol, a fim de minimizar a competição entre os *primers*. Além disso, a MSTNPCR também foi realizada com proporções variadas entre os *primers* internos, externos do gene *ctxA* e do gene *rfbN* de 40:2:20 pmol, 20:2:20 pmol e 20:2:10 pmol, respectivamente. A proporção de 40:2:20 pmol, por ter apresentado melhores resultados quando se associa sensibilidade e reprodutibilidade, foi utilizada no decorrer da padronização (dados não mostrados). Nestas condições a MSTNPCR detectou até 1 pg do DNA purificado, mostrando a mesma sensibilidade da STNPCR, e quando testada com cultura em APA, detectou até 3 UFC. Essa sensibilidade também foi relatada pela maioria dos trabalhos baseados em métodos moleculares para detecção de *V. cholerae* (Varela et al, 1994; Theron et al, 2000; Shangkuan et al, 1995; Falklind et al, 1996). O produto de amplificação visível nas amostras cujas culturas em placa não apresentaram crescimento bacteriano, pode ser atribuída à presença de bactérias mortas na cultura em APA.

As bandas inespecíficas que surgiram parecem ter sido provocadas devido ao excesso de DNA-alvo na amostra, visto que à medida que a concentração de DNA diminuiu, as bandas

extras desapareceram gradativamente. No outro extremo, nas amostras contendo baixas concentrações de DNA houve formação de uma banda menor que 100 bp que pode ser atribuída à formação de dímeros de *primers* resultantes de anelamento entre os *primers*, o que permite à *Taq* polimerase promover a extensão do fragmento formado. Em reações onde há excesso de *primers* na amostra, em relação à quantidade de DNA-alvo, a dimerização de *primers* é um achado comum (Mackay, 2006).

A especificidade da MSTNPCR foi estabelecida com DNA purificado de diferentes bactérias. Nas reações com outras espécies da família *Vibrionaceae*, diferentes de *V. cholerae* O1, surgiram algumas bandas inespecíficas. Contudo, ao aumentar as condições de estringência da reação através da elevação da temperatura de anelamento dos *primers* nas duas etapas de amplificação, as bandas espúrias diminuíram significativamente (dados não mostrados). Visto que estas bandas são de tamanho diferente do esperado e também não são reprodutíveis, consideramos que sua presença não representa um problema. Desta forma, além de sensível, a técnica foi específica para *V. cholerae* O1, inclusive quando o DNA deste microrganismo estava misturado ao genoma de outras bactérias.

Os reagentes apresentados na forma de um *kit* permitem um melhor controle de qualidade dos parâmetros da reação cuja estabilidade já testada por quatro meses mostra um desempenho promissor para sua utilização em laboratório de monitoramento e diagnóstico da cólera.

Nos países onde a cólera se encontra em fase não epidêmica, muitas tentativas têm sido introduzidas com o propósito de controlar a doença. Uma ação considerada como fundamental, o monitoramento bacteriológico de ecossistemas aquáticos é um dos pontos básicos para o rastreamento de *V. cholerae* O1 (Binsztein et al, 2004). Consiste em avaliar a frequência de cepas de *V. cholerae* com potencial epidêmico através de pesquisa direta do vibrião em ambientes aquáticos de regiões endêmicas para cólera. Além de auxiliar na compreensão da dinâmica da epidemia, a pesquisa ambiental possibilita controlar a disseminação destas cepas, mesmo antes da ocorrência de casos da infecção.

A identificação de cepas potencialmente epidêmicas é limitada pela falta de técnicas capazes de detectar tanto um número pequeno de células em uma amostra contendo outros microrganismos, quanto bactérias, no estado VNC presentes nas amostras de águas ambientais (Faruque et al, 2005), comuns em períodos inter-epidêmicos, tornando difícil a eliminação total de casos.

Técnicas que agilizem o resultado do diagnóstico são de fundamental importância já que, uma vez diagnosticado um caso da doença, o tratamento deve ser administrado imediatamente, a fim de diminuir a mortalidade e impedir a transmissão da cólera. O método de diagnóstico tradicional, embora de baixo custo, requer um período de até 72 horas para identificação *V. cholerae* O1. Outra vantagem da MSTNPCR é a possibilidade de identificar o potencial toxigênico de cepas de *V. cholerae* que se mostram auto-aglutináveis em suspensão salina (cepas rugosas) e que não podem ser classificadas através de sorologia para o sorogrupo, não sendo submetidas ao teste de ELISA para detecção da toxina.

A MSTNPCR pode ser utilizada com DNA purificado, diretamente da cultura do *V. cholerae* na fase enriquecimento em caldo ou diretamente da amostra biológica, agilizando o diagnóstico. É capaz de detectar cepas toxigênicas ou não e no estado VNC, com alta sensibilidade, podendo ser usada como complemento à cultura bacteriana. Acredita-se que a técnica aqui apresentada pode ser uma ferramenta útil na investigação de *V. cholerae* O1 em mananciais aquáticos de regiões endêmicas, como método complementar à cultura bacteriana e no diagnóstico da cólera se houver casos humanos.

Agradecimentos

Nossos sinceros agradecimentos ao Dr. Fábio Melo e à Ms. Gerlane Souza pelas contribuições ao longo do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Abath, F.G. et al, 2002. Single-tube nested PCR using immobilized internal *primers*. *Biotechniques*.33,1210–1214.
2. Ausubel, F.M. et al, 1987. *Current Protocol in Molecular Biology*, Wiley, New York.

3. Binsztein, N. et al, 2004. Viable but non culturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7481-7486.
4. Blackstone, G.M. et al, 2006. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay, *J. Microbiol. Methods.* Article in Press.
5. Bravo, L. et al, 1992. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 using Polimerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87, 443-444.
6. Falklind, S. et al, 1996. Cloning and Sequencing of a Region of *Vibrio cholerae* O139 Bengal and Its Use in PCR-Based Detection. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2904-2908.
7. Faruque, S.M. et al, 2005. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: role of host-mediated amplification of phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 6119-6124.
8. Faruque, S.M.; Nair, G.B, 2002. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*, *Microbiol. Immunol.* 46, 59-66.
9. Gonçalves, E.G.; Hofer, E, 2005. Cólera. In: Coura, J.R., *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, pp. 1367-1373.
10. Gubala, A.J, 2006. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *J. Microbiol. Methods.* 65, 278-293.
11. Guthman, J, 1995 Epidemic cholera in Latin America: spread and routes of transmission. *J. Trop. Med. Hyg.* 98, 419-427.
12. Hofer, E, 1993. Cholera in Brazil: analysis of some bacteriologic clinical, and epidemiologic characteristics. In: Pestana de Castro, A.F.; Almeida, W.F. (Eds.), *Cholera on the American Continents*. International Life Sciences Institute/ILSI Press, Washington, DC, pp. 167-170.
13. Henegariu, O. et al, 1997. Multiplex PCR: clinical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques.* 23, 504-511.
14. Islam, M.S. et al, 2004. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* 48, 229-235.
15. Israil, A. et al, 2004. Comparative study of different methods for detection of toxic and other enzymatic factors in *Vibrio cholerae* strains. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 63, 63-77.
16. Jensen, M.A. et al, 2006. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 4652-4657.
17. Keasler, S.P.; Hall, R.H, 1993. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. *Lancet.* 341, 1661.

18. Leal, N.C. et al, 2004. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. J. Appl. Microbiol. 96, 447-454.
19. Li, M. et al, 2002. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. Infect. Immun. 70, 2441-2453.
20. Mackay, I.M. PCR down under. <http://www.uq.edu.au/vdu/PCRDownUnder.htm>.
21. Mantri, C.K. et al, 2006. Septaplex PCR assay for rapid identification of *Vibrio cholerae* including detection of virulence and int STX genes. FEMS Microbiol. Lett. 265, 208-214.
22. Mekalanos, J.J. et al, 1983. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature. 36, 551-557.
23. Melo, F.L. et al, 2006. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100, 1049-55.
24. Montenegro, L. M. et al, 2004. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 98, 619-625.
25. MS - Ministério da Saúde, Brasil, 1992. Cólera: Transmissão e Prevenção em Alimentos e Ambiente.
26. MS - Ministério da Saúde, Brasil, 2002. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Fundação Nacional de Saúde, 2ª ed. Brasília – DF, Brasil.
27. MS - Ministério da Saúde, Brasil, 2005. Cólera – A situação da doença no Brasil. http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=216882005
28. Olmos, A. et al, 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. Nucleic Acids Res. 27, 1564-1565.
29. Picken, M.M. et al, 1996. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 489-498.
30. Rivera, I.N.G. et al, 2001. Genotypes associated with the virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*, Appl. Environ. Microbiol. 67, 2421-2429.
31. Shangkuan, Y.H. et al. 1995. Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1. J. Appl. Bacteriol. 79, 264-273.
32. Souza, G.T. et al. Development and evaluation of a Single Tube Nested PCR Based Approach (STNPCR) for the Diagnosis of Plague, 2006. Submitted.

33. Theron, J. et al, 2000. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation pit-stop seminested PCR procedure. J. Appl. Microbiol. 89, 539-546.
34. Varela, P. et al, 1994. Direct detection of *Vibrio cholerae* in stool samples. J. Clin. Microbiol. 32, 1236-1248.
35. WHO – World Health Organization, 2006. Wkly. Epidemiol. Rec. 81, 297-308.

Legendas das figuras

Figura 1. Limiar de detecção de DNA de *V. cholerae* O1. A: PCR simples. Linhas: M: marcador de peso molecular; 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: **100 pg**; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 1 fg; 9: 0,1 fg; 10: controle positivo e 11: controle negativo. B: nested PCR convencional. Linhas: M: marcador de peso molecular; 1: controle positivo da nested =10ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: **100 fg**; 7: 10 fg; 8: 1 fg; 9: 0,1 fg; 10: 0,01 fg; 11: controle negativo da nested; 12: controle positivo reação; 13: controle negativo reação. C: STNPCR. Linhas: 1: 1 ng; 2: 100 pg; 3: 10 pg; 4: **1 pg**; 5: 100 fg; 6: 10 fg; 7: 1 fg; 8: 0,1 fg; 9: 0,01 fg; 10: controle positivo e 11: controle negativo.

Figura 2. Produtos de amplificação após introdução dos *primers* para o gene *rfbN* na STNPCR. Linhas: 1 e 2: controle positivo e controle negativo da reação, quando os *primers* do gene *rfbN* foram fixados na tampa do tubo, juntamente com *primers* internos; 3 e 4: controle positivo e controle negativo da reação, quando os *primers* do gene *rfbN* foram fixados na tampa do tubo e também adicionados dentro do tubo; 5 e 6: controle positivo e controle negativo da reação, quando os *primers* do gene *rfbN* foram adicionados dentro do tubo onde ocorreu a reação.

Figura 3. Limiar de detecção de DNA de *V. cholerae* da MSTNPCR. Linhas: 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: **1 pg**; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 1 fg e 9: CN.

Figura 4. Limiar de detecção da MSTNPCR quando a técnica foi realizada diretamente da cultura em APA. Linhas: 1: CP; 2: 10; 3: 10^{-1} ; 4: 10^{-2} ; 5: 10^{-3} ; 6: 10^{-4} ; 7: 10^{-5} ; 8: 10^{-6} ; 9: 10^{-7} ; 10: 10^{-8} ; 11: CN.

Figura 5. Especificidade da MSTNPCR. Linhas: 1: *Aeromonas* sp.; 2: *E. coli*; 3: *Enterobacter* sp.; 4: *Klebsiella* sp.; 5: *Pseudomonas* sp.; 6: *Salmonella* sp.; 7: *Shigella* sp.; 8: *V. alginolyticus*; 9: *V. mimicus*; 10: *V. parahaemolyticus*; 11: DNA de todas as bactérias, inclusive de *V. cholerae* O1; 12: CP e 13: CN.

Figuras

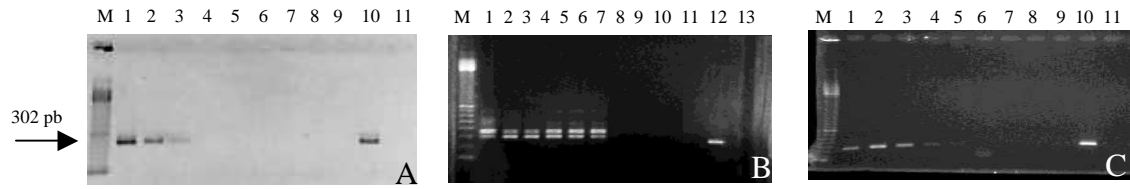


Figura 1.

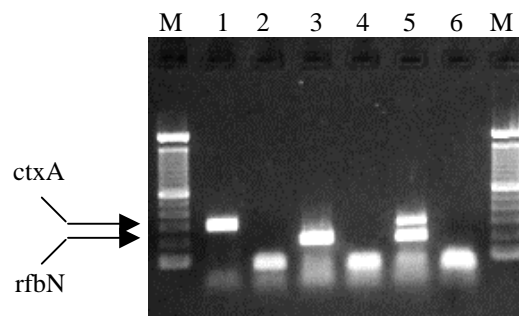


Figura 2.

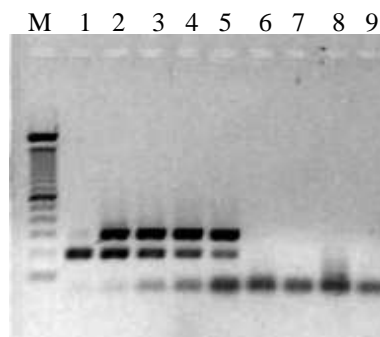


Figura 3.

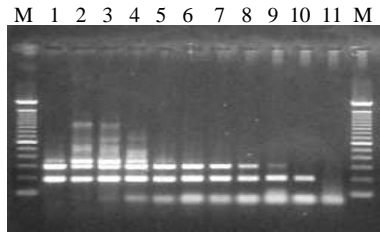


Figura 4.

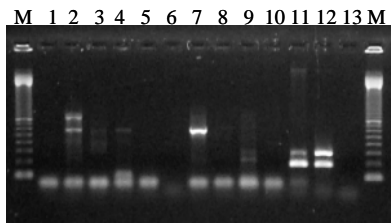


Figura 5.