



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



Ana Paula Rocha da Costa

**Estudo molecular dos elementos genéticos CTX
e VPI em cepas de *Vibrio cholerae* O26,
isoladas de processos entéricos humanos no Brasil**

RECIFE
2009

Ana Paula Rocha da Costa

**Estudo molecular dos elementos genéticos CTX e VPI
em cepas de *Vibrio cholerae* O26,
isoladas de processos entéricos humanos no Brasil**

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

Orientadora: Dra Nilma Cintra Leal

Recife
2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C837e Costa, Ana Paula Rocha da.

Estudo molecular dos elementos genéticos CTX e VPI em cepas de *Vibrio cholerae* O26, isoladas de processos entéricos humanos no Brasil/ Ana Paula Rocha da Costa. — Recife: A. P. R. Costa, 2009.

86 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Nilma Cintra Leal.

1. Cólera. 2. *Vibrio cholerae*. 3. Fatores de virulência. I. Leal, Nilma Cintra. II. Título.

CDU 616.932

Ana Paula Rocha da Costa

Estudo molecular dos elementos genéticos CTX e VPI em cepas de *Vibrio cholerae* O26, isoladas de processos entéricos humanos no Brasil

Dissertação apresentada ao nome do curso ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre

Aprovado em: 20 / 02 / 2009

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nilma Cintra Leal

(Orientadora)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz

Dr. Rafael Dhália

(Titular)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz

Dr. Franklin Barbalho Magalhães

(Titular)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha saúde e por sempre me indicar o melhor caminho a seguir, mesmo que às vezes eu não compreenda;

À minha família, por estar ao meu lado em todos os momentos. Aos meus pais, por minha educação e por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão pelo apoio e amizade;

À Dra Nilma pela oportunidade, por todos os ensinamentos, por sua confiança e incentivo. Por sua orientação humanizada, por sua dedicação e pelo carinho com que sempre me tratou;

A Francisco Cariri, Camylla Carvalho e Mariana Nunes por todo o auxílio na execução deste trabalho;

Ao Dr. Osvaldo Pompílio e ao Dr. Ernesto Hofer pela colaboração na realização deste trabalho;

Aos colegas do laboratório de Microbiologia, especialmente a Adelino, Ana Paula Campos, Carina, Christian, Danielle, Éden, Eduarda, Eduardo, Franklin, Janaína, Kelly, Larissa, Lívia, Mariana Marques, Mariana Nunes, Marília, Rodrigo, Tamara, Vladimir, Wagner, Wellington, e aos colegas do Departamento de Entomologia, Diogo, Lígia, Liliane, Mariana, Marina e Tatiany pelo convívio diário e por todas as experiências trocadas;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Bruna, Cláudio, Édson, Fernanda, Isaac, Laís, Nelson, Niedja, Rita, Silvana e Yara pelo auxílio diário;

Ao Dr. Franklin Magalhães, membro da pré-banca, pelas sugestões dadas a esta dissertação;

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde PDTIS-Fiocruz, especialmente a Dra Cássia Docena e a Viviane de Carvalho, pelas reações de sequenciamento;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infra-estrutura, disponibilidade de recursos e pela bolsa de estudos concedida;

Aos órgãos de fomento (CNPq, FIOCRUZ e FACEPE), pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos;

E a todos que não foram citados, mas foram igualmente importantes nesta jornada.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver..."

Martin Luther King

"E ainda que tivesse o dom da profecia, e
conhecesse todos os mistérios da ciência, e
ainda que tivesse toda a fé, sem amor nada
seria"

ICo 13:2

COSTA, A. P. R. **Estudo molecular dos elementos genéticos CTX e VPI em cepas de *Vibrio cholerae* O26, isoladas de processos entéricos humanos no Brasil. 2009.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

RESUMO

A cólera é uma doença reemergente que tem como agente etiológico o *Vibrio cholerae* O1, biotipo El Tor. Atualmente a doença encontra-se sob controle no país, no entanto, o risco de sua re-introdução continua presente tendo em vista que persistem as baixas coberturas de saneamento e o *V. cholerae* O1 continua sendo isolado de águas ambientais, mesmo esporadicamente. Apesar de já terem sido identificados mais de 200 sorogrupos de *V. cholerae*, somente os sorogrupos O1 e O139 são responsáveis por epidemias. Os demais sorogrupos podem ser patogênicos e estar associados a surtos de diarreia. A patogenicidade de *V. cholerae* epidêmico está relacionada a duas regiões do cromossomo maior do vibrio, o elemento genético CTX e a ilha de patogenicidade de *Vibrio* (VPI) que devido as suas características de bacteriófago podem ser transferidos horizontalmente conferindo virulência às cepas receptoras. Neste estudo descrevemos a caracterização parcial dos elementos genéticos CTX e VPI de cepas de *V. cholerae* O26 isoladas no Brasil entre os anos de 1992 e 2000. Através da amplificação dos genes *cep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *cxtA*, *ctxB*, *rstA*, *rstB*, *rstR* presentes no profago CTX ϕ foi visto que oito cepas possuem o profago CTX ϕ completo e sete o profago incompleto (pré-CTX). Os genes *aldA*, *tagA*, *tcpPH* e *int* das regiões TAG, ACF e TCP da VPI estão presentes na maioria das cepas, no entanto, somente duas (151 e 168) apresentam o gene *tcpA* El Tor. O sequenciamento dos genes *rstR* do profago CTX ϕ e *tcpA* da VPI mostrou que o tipo e alelo para os dois genes detectados na maioria das cepas O26 corresponde a variante presente em cepas ambientais de sorogrupos não-O1/ não-O139. Os alelos presentes nas cepas 151 e 168 correspondem ao do *V. cholerae* O1 El Tor. Conclui-se que há especificidade entre o tipo de gene *tcpA* e o profago CTX ϕ de cada cepa. Nesse estudo identificamos a existência de cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 isoladas no Brasil que possuem todo o conjunto de genes de virulência presentes nos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* e que são negligenciadas no diagnóstico tradicional da cólera. Desta forma, recomenda-se que além dos testes de triagem tradicionais, indispensáveis para a classificação do *V. cholerae*, sejam realizados métodos moleculares complementares que permitam a identificação de cepas carreando genes de virulência.

Palavras-chave: Cólera, *Vibrio cholerae*, Fatores de virulência

COSTA, A. P. R. **Molecular study of the genetic elements CTX and VPI in *Vibrio cholerae* O26 strains, isolated from human enteric process in Brazil.** Dissertation (Master of PublicHealth) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

Cholera is a reemerging disease that has as the etiological agent the *Vibrio cholerae* O1, biotype E1 Tor. Currently, the disease has been kept under control in our country, however, the risk of its re-introduction remains, since the low sanitation services are common and the *V. cholerae* O1 keeps on being isolated from environmental waters, although occasionally. Even though more than 200 serogroups have already been identified, only the serogroups O1 and O139 are responsible for the epidemics. The other serogroups can be pathogenic and be related to diarrhea outbreaks. The pathogenicity of the epidemic *V. cholerae* is related to two regions in the large chromosome of the vibrio, the genetic element CTX and the *Vibrio* pathogenicity island (VPI), that due to its bacteriophage characteristics can be transferred horizontally conferring virulence to the receptor strains. In this study, we describe the partial characterization of the genetic elements CTX and VPI from *V. cholerae* O26 strains isolated in Brazil, from 1992 to 2000. Through the amplification of the genes *cep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxA*, *ctxB*, *rstA*, *rstB*, *rstR* present in the CTX ϕ it could be seen that eight strains have the CTX ϕ complete prophage and seven the incomplete prophage (pre-CTX). The genes *aldA*, *tagA*, *tcpPH* e *int* from the regions TAG, ACF e TCP from VPI, are present in most strain, however, only two strains (151 and 168) present the *tcpA* gene E1 Tor. The sequencing of the *rstR* genes of the CTX ϕ prophage and the *tcpA* of the VPI showed that the type and allele for the two genes detected in most O26 strains corresponds to the variant present in environmental strains of non-O1/non-O139 serogroups. The alleles present in strains 151 and 168 correspond to the O1 E1 Tor. It is concluded that there is specificity between the type of *tcpA* and prophage CTX ϕ of each strain. Therefore, we identify in this study the existence of non-O1/non-O139 *V. cholerae* strains isolated in Brazil, holder of the whole set of virulence genes present in epidemic *V. cholerae* serogroups. Thus, it is recommended that screening tests further on traditional tests, essential for the classification of *V. cholerae* are carried out complementary molecular methods to identify the strains carried virulence genes.

Keywords: Cholera, *Vibrio cholerae*, Virulence factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do mecanismo de ação da toxina colérica (CT) nos enterócitos.	18
Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a morfologia do <i>V. cholerae</i>	19
Figura 3: Esquema do método tradicional de diagnóstico da cólera	24
Figura 4: Número de casos de cólera no Brasil e taxa de mortalidade, entre 1991 e 2006	25
Figura 5: Número de casos e de países que reportaram casos de cólera por ano, de 1996 a 2007	27
Figura 6: Esquema da Ilha de Patogenicidade de <i>Vibrio</i>	31
Figura 7: Esquema do profago CTX ϕ	32
Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos metodológicos realizados neste estudo	38
Figura 9: Esquema representativo da estratégia de amplificação dos genes <i>rstA</i> , <i>rstB</i> e <i>rstR</i> presentes na região RS2 do profago CTX ϕ	42
Figura 10: Esquema representativo da estratégia de amplificação dos genes <i>rstA</i> , <i>rstB</i> , <i>rstC</i> e <i>rstR</i> presentes na região RS1	42
Figura 11: Esquema representativo da estratégia de sequenciamento da região IgF-ace	44
Figura 12: Esquema representativo da estratégia de sequenciamento da região RsR-IgF	45
Figura 13: Esquema representativo da estratégia de sequenciamento do gene <i>tcpA</i>	45
Figura 14: Amplificação da região gênica IgF-ace em cepas de <i>V. cholerae</i> O26 pré-CTX	48
Figura 15: Amplificação da região gênica IgF-ace em cepas de <i>V. cholerae</i> O26 que possuem o profago CTX completo	49
Figura 16: Amplificação da região gênica RsR-IgF	49
Figura 17: Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>rstR</i> , no programa Mega 4	50
Figura 18: Amplificação da região externa ao gene <i>tcpA</i> utilizando os primers tcpA4-tcpH1	52
Figura 19: Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene <i>tcpA</i> no programa Mega 4	53
Figura 20: Alinhamento da seqüência do gene <i>tcpA</i> na região de pareamento do primer tcpA R El Tor	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenciação entre os biotipos clássico e El Tor de <i>V. cholerae</i> O1	20
Tabela 2: As sete pandemias de cólera, períodos de ocorrência e agentes etiológicos	21
Tabela 3: Cepas de <i>V. cholerae</i> utilizadas neste estudo, evidenciando o sorogrupo, ano e local de isolamento	39
Tabela 4: Lista de primers específicos para genes presentes no profago CTX ϕ e na VPI	41
Tabela 5: Identificação dos genes presentes na região central do profago CTX ϕ	47
Tabela 6: Identificação de genes presentes na ilha de patogenicidade de <i>Vibrio</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Água peptonada alcalina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CT	Toxina colérica
CRNCEB	Centro de Referência Nacional de Cólera e Enteroinfecções Bacterianas
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido desoxirribonucléico
LACEN-PE	Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco
LB	Luria Bertani
NCBI	National center for biotechnology information – Centro nacional de informação biotecnológica
ORF	<i>Open reading frame</i> – Quadro aberto de leitura
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
SES-PE	Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco
TBE	<i>Tris borate</i> EDTA – Tris ácido bórico EDTA
TCBS	Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TCP	<i>Toxin coregulated pilus</i> – Pilus corregulador de toxina
VCN	Viáveis mas não cultiváveis
VPI	<i>Vibrio pathogenicity island</i> – Ilha de patogenicidade de <i>Vibrio</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL	17
2.1 A Cólera	17
2.2 Agente etiológico	18
2.3 Histórico da doença	20
2.4 Diagnóstico da cólera	22
2.5 A cólera no Brasil	24
2.6 Situação atual da doença	26
2.7 Epidemiologia	28
2.8 Fatores de virulência	30
2.8.1 Ilha de patogenicidade de <i>Vibrio</i>	30
2.8.2 Profago CTX ϕ	32
3 JUSTIFICATIVA	34
4 PERGUNTA CONDUTORA	35
5 HIPÓTESE	36
6 OBJETIVOS	37
6.1 Objetivo Geral	37
6.2 Objetivos específicos	37
7 METODOLOGIA	38
7.1 Desenho do estudo	38
7.2 Cepas de <i>V. cholerae</i>	39
7.3 Condições de crescimento e extração do DNA	40
7.4 Reações de PCR	40
7.4.1 Amplificação dos genes regulatórios do profago CTX ϕ	42
7.4.2 Amplificação dos genes regulatórios do elemento RS1	42

7.5 Clonagem	43
7.6 Sequenciamento	43
7.6.1 Sequenciamento dos genes presentes na região RS2 do profago CTX ϕ	44
7.6.2 Sequenciamento dos genes presentes na região RS1 do profago CTX ϕ	44
7.6.3 Sequenciamento do gene tcpA	45
7.6.4 Análise <i>in silico</i>	46
8 RESULTADOS	47
8.1 Profago CTXϕ	47
8.1.1 Amplificação de genes presentes na região central do profago CTX ϕ	47
8.1.2 Amplificação de genes presentes na região RS2 do profago CTX ϕ	48
8.1.3 Amplificação de genes presentes no elemento RS1	49
8.1.4 Sequenciamento do gene rstR	50
8.2 Ilha de patogenicidade de <i>Vibrio</i>	51
8.2.1 Amplificação de genes presentes na VPI	51
8.2.2 Sequenciamento do gene <i>tcpA</i>	52
9 DISCUSSÃO	54
10 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE	69
APÊNDICE A: Artigo Científico	69
ANEXO	86
ANEXO A: Parecer do CEP/ CPqAM	86

1 INTRODUÇÃO

A cólera, doença re-emergente que atingiu o continente sul-americano e o território brasileiro em 1991, encontra-se em sua sétima pandemia. A magnitude da doença no território brasileiro esteve relacionada às más condições de vida da população, tendo encontrado nas regiões Norte e Nordeste situações favoráveis à sua implantação e disseminação. Foi desenvolvida uma campanha nacional de combate à cólera, e a doença começou a retroceder. Em 2001, foram registrados sete casos confirmados, em 2002 e em 2003 não foram notificados casos de cólera no país (BRASIL, 2006). No primeiro semestre de 2004, foram registrados 18 casos da doença no município de São Bento do Una, em Pernambuco (HOFER *et al.*, 2006). Nesse município houve confirmação de mais quatro casos em 2005, ano em que também foi registrado um caso no município de Recife (BRASIL, 2005b). Atualmente a cólera encontra-se sob controle no país, no entanto, o risco de sua re-introdução em áreas já atingidas ou ainda indenes continua presente tendo em vista que persistem as baixas coberturas de saneamento e o *Vibrio cholerae* O1 continua sendo isolado de águas ambientais, mesmo esporadicamente (LEAL, *et al.*, 2008).

O *V. cholerae* é classificado em sorogrupos de acordo com as diferenças na composição da parede celular, especificamente no antígeno somático O. Embora existam mais de 200 sorogrupos, somente os sorogrupos O1 e O139 são responsáveis por epidemias de cólera (LI *et al.*, 2003). O *V. cholerae* O139 foi isolado de uma epidemia na Índia e em Bangladesh em 1992. Antes de sua descoberta, somente o sorogrupo O1 era conhecido como causa de cólera epidêmica. Os demais sorogrupos, embora não envolvidos em epidemias, podem ser patogênicos e estar associados a pequenos surtos de diarreia (SACK *et al.*, 2004).

A patogenicidade de *V. cholerae*, em nível molecular, é um processo multifatorial e envolve genes que codificam diferentes proteínas que atuam na colonização, na coordenação da expressão de diversos fatores e na ação tóxica (SACK *et al.*, 2004). Análises genéticas revelaram a presença de dois importantes elementos, primariamente encontrados em cepas epidêmicas dos sorogrupos O1 e O139: o elemento genético CTX (PEARSON *et al.*, 1993) e a ilha de patogenicidade de *Vibrio* (VPI) (KARAOLIS *et al.*, 1998). Estas duas regiões constituem o genoma de dois bacteriófagos filamentosos - CTX ϕ e VPI ϕ - que estão integrados ao cromossomo maior de *V. cholerae* e são capazes de serem transferidos horizontalmente, conferindo virulência às cepas receptoras (KARAOLIS *et al.*, 1999; WALDOR; MEKALANOS, 1996). Na VPI encontram-se os genes que codificam o pilus

corregulador de toxina (TCP), requerido para a eficiente colonização do epitélio intestinal humano pelo microrganismo. O TCP juntamente com a toxina colérica (CT), codificada por genes presentes no profago CTX ϕ , constituem os dois principais fatores de virulência em *V. cholerae* (KAPER; MORRIS, JR; LEVINE, 1995). Além de permitir a colonização do epitélio intestinal pelo *V. cholerae*, o TCP é o receptor para a entrada do profago CTX ϕ em novas células. Desta forma observa-se uma situação onde um fago serve de receptor para um segundo fago, em um processo de infecção sequencial que resulta na virulência do microrganismo (KARAOLIS et al., 1999).

A estrutura da VPI e do profago CTX ϕ sugere a transferência horizontal de genes como possível mecanismo para a origem de novos clones patogênicos de *V. cholerae*. Além disso, estudos têm indicado que os genes de virulência ou seus homólogos estão dispersos entre cepas ambientais de diversos sorogrupos, constituindo assim, um reservatório desses genes, o que dá suporte a hipótese de origem ambiental de *V. cholerae* patogênico (BOYD; WALDOR, 2002; CHAKRABORTY et al., 2000; DAALSGAARD, et al., 2001; MUKHOPAHYAY et al., 1995; MUKHOPADHYAY et al., 2001, , THEOPHILO et al., 2006).

Theophilo et al. (2006) analisaram 179 amostras de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, a maioria isolada de casos clínicos, compreendendo 54 diferentes sorogrupos. As amostras de sorogrupo O26 representaram 8,4%, sem nenhuma correlação quanto à fonte de origem ou local de isolamento e apenas nesse sorogrupo foi evidenciado o gene *ctxA* presente no profago CTX ϕ (em alguns dos outros sorogrupos foram encontrados *zot* e *ace*). Apesar de 14 cepas possuírem genes presentes no profago CTX ϕ , somente em cinco cepas foi detectado o gene *tcpA* utilizando-se *primers* para o alelo El Tor. Uma vez que o gene *tcpA* é o receptor celular do profago CTX ϕ , a ausência na detecção do gene *tcpA* sugere a presença de um alelo variante nas cepas em questão.

Devido à presença de genes de virulência característicos dos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* em cepas do sorogrupo O26 este trabalho teve como objetivo caracterizar molecularmente o profago CTX ϕ e a VPI presente nessas cepas, buscando identificar o grau de proximidade dos profagos presentes nas cepas em relação aos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO-CONCEITUAL

2.1 A Cólera

A cólera é uma doença diarréica aguda causada pela enterotoxina do *Vibrio cholerae* (NITRINI et al., 1997). Reconhecida como um dos grandes flagelos da humanidade apresenta grande poder de disseminação, sendo registrada em todos os continentes (KAPER; MORRIS JR; LEVINE, 1995). Considerada uma doença reemergente, continua impondo desafios tanto em função das características do agente, como pela vulnerabilidade de grande parcela da população mundial que sobrevive em condições de extrema pobreza (BRASIL, 2006).

As manifestações clínicas da cólera variam de infecções inaparentes e quadros leves, a quadros mais graves, que se caracterizam por início repentino de diarréia aquosa e abundante, sem dor e com vômitos ocasionais, que podem levar à desidratação grave, acidose metabólica e choque, resultando em morte se o tratamento não for prontamente iniciado (NITRINI et al., 1997). As fezes possuem o aspecto característico “água de arroz” e o indivíduo portador da forma grave da doença pode eliminar de 500 a 1000mL de fezes por hora (SACK et al., 2004).

A cólera é o protótipo das síndromes diarréicas nas quais a enfermidade não é causada pela invasão tecidual do organismo, mas através da produção de toxinas que inibem as trocas normais de água e eletrólitos culminando em diarréia que pode levar rapidamente à desidratação e à acidose metabólica (KAPER; MORRIS, JR; LEVINE, 1995). Sua patogenicidade é um processo complexo e envolve numerosos fatores que auxiliam o *V. cholerae* a colonizar o epitélio do intestino delgado e produzir a toxina colérica (CT). Embora a produção da CT seja diretamente responsável pela manifestação da diarréia, a dinâmica da doença requer a ação sinérgica de vários fatores de virulência (FARUQUE; ALBERT; MEKALANOS, 1998).

A infecção começa com a ingestão de água ou alimentos contaminados com o *V. cholerae*. Após atravessar a barreira ácida do estômago, o *V. cholerae* coloniza o epitélio do intestino delgado, por meio do Pílus Corregulador de Toxina (TCP) e outros fatores de colonização, multiplica-se no intestino delgado proximal e produz a toxina colérica. A CT secretada age sobre o mecanismo fisiológico de transporte de íons nas células do epitélio intestinal, elevando a concentração intracelular de cAMP, o qual aumenta a secreção do íon

cloro (Cl^-) e diminuir a absorção do íon sódio (Na^+) pelas células das vilosidades (KAPER; MORRIS, JR; LEVINE, 1995), formando um gradiente osmótico que contribui para perda de água intracelular e resulta na diarreia característica (Figura 1). O vibrião não é invasivo e permanece no lúmen do intestino durante toda a progressão da doença.

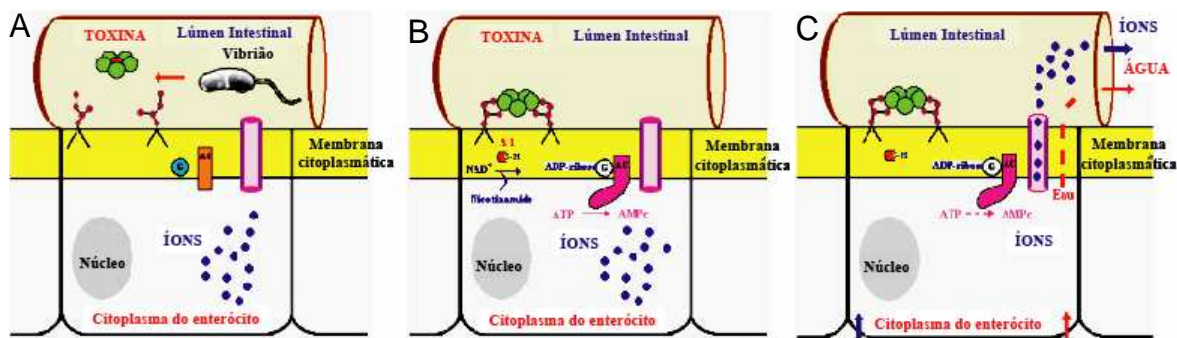


Figura 1: Esquema do mecanismo de ação da toxina colérica (CT) nos enterócitos:

Nota: **A** - Secreção da CT no lúmen intestinal; **B** - Aumento da concentração intracelular de cAMP; **C** - Secreção de sódio, cloro e água do meio intracelular para o lúmen.

Fonte: Adaptado de RUMMENS (2001).

O período de incubação da cólera varia de algumas horas a cinco dias após a ingestão de água ou alimento contaminado. O período de transmissibilidade dura enquanto houver eliminação do vibrião pelas fezes, em geral poucos dias após a cura (NITRINI et al., 1997). A severidade da infecção depende de muitos fatores, entre eles a resistência do hospedeiro mediada pela acidez gástrica e seu estado imunológico, o tamanho do inóculo ingerido, e o grupo sanguíneo do paciente. Por razões desconhecidas, indivíduos do grupo sanguíneo O possuem maior risco de ter cólera severa que os indivíduos dos demais grupos (; CLEMENS et al., 1989; GLASS et al., 1985).

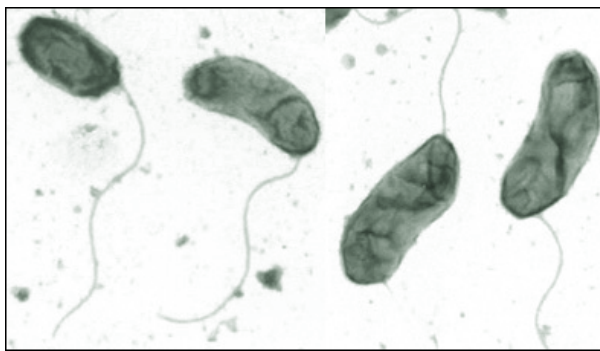
O tratamento da cólera consiste na reposição hidroeletrolítica adequada e imediata, de acordo com o grau de desidratação apresentado e antibioticoterapia (SÃO PAULO, 2001).

2.2 Agente etiológico

O agente etiológico da cólera foi descrito em 1854 na Itália por Pacini, que descreveu “um micróbio colerígeno” no intestino de vítimas de cólera, denominando-o *Vibrio cholerae*. O microrganismo foi isolado por Robert Koch, em 1883, a partir de amostras de fezes e de

peças de intestino de vítimas da doença, obtidas durante epidemias ocorridas em Alexandria e em Calcutá (KAPER; MORRIS JR; LEVINE, 1995).

O *V. cholerae* pertence à família Vibrionaceae que é composta por bacilos Gram-negativos, retos ou curvos, móveis por meio de flagelo polar, não formadores de esporos (Figura 2). São quimiorganotróficos e possuem metabolismo oxidativo e fermentativo. É uma espécie bem definida com base em características bioquímicas e em estudos de homologia do DNA, no entanto não é homogênea quando se considera seu potencial patogênico (FARUQUE; ALBERT; MEKALANOS, 1998).



Fonte: www.wadsworth.org/databank/vibrio.htm

Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a morfologia do *V. cholerae*.
Fonte: Adaptado de NYS *Department of health* (2007).

A estrutura antigênica da espécie é caracterizada de acordo com as diferenças na composição da parede celular, especificamente no antígeno somático O que constitui a base do esquema de classificação que já identificou 206 sorogrupos (LI et al., 2002). Esse antígeno, de natureza lipopolissacarídica é formado por três frações denominadas A, B e C.

Em meados da década de 1930, verificou-se que todas as cepas pandêmicas eram aglutinadas por um único anti-soro, designado O1. Por outro lado cepas possuindo as mesmas características bioquímicas e de cultivo, diferindo apenas por não serem aglutináveis pelo anti-soro, foram denominadas não-O1 (NITRINI et al., 1997).

Com base em características fenotípicas o sorogrupo O1 de *V. cholerae* pode ser subdividido em dois biotipos, Clássico e El Tor (Tabela 1) (MOOI; BIK, 1997). Há ainda a subdivisão em sorotipos ou sorovares, na dependência da associação da fração B ou da fração C (sorotipo-específicas) com a estrutura antigênica A (característica do sorogrupo O1) sendo identificados três sorotipos Ogawa (AB), Inaba (AC) e Hikogima (ABC).

Tabela 1 – Diferenciação entre os biotipos clássico e El Tor de *V. cholerae* O1

Prova bioquímica	Clássico	El Tor
Reação de Voges-Proskauer	-	+
Produção de β -hemólise em ágar sangue de carneiro	-	+
Hemaglutinação de eritrócitos de galinha	-	+
Sensibilidade à polimixina (50U)	S	R
Lise pelo fago IV	+	-
Lise pelo fago V	-	+

Nota: S: sensível; R: resistente; +; positivo; -: negativo.

Fonte: Adaptado de GONÇALVES; HOFER (2005).

2.3 Histórico da doença

A existência da doença remonta à antiguidade, no entanto permaneceu restrita ao Oriente, sobretudo ao subcontinente indiano, até o final do século XV quando exploradores portugueses iniciaram as viagens comerciais à Índia. Nessa região, surtos esporádicos surgiam durante festivais hindus realizados às margens dos rios Ganges e Bamaputra, região conhecida como "berço da cólera". A disseminação da doença ocorria quando os infectados retornavam às suas comunidades de origem, espalhando a doença por toda a Índia e países vizinhos (BARUA, 1992). Assim, a doença permaneceu de forma endêmica nessa região até o século XIX quando começaram a ocorrer as pandemias (Tabela 2).

As seis primeiras pandemias foram ocasionadas pelo biotipo clássico de *V. cholerae* O1. A primeira se estendeu ao longo do rio Ganges e restringiu-se a algumas regiões da Ásia e África. Durante as quatro pandemias posteriores, a propagação deveu-se às rotas de comércio, migrações, deslocamento de exércitos, alcançando além da Ásia e África, a Europa e as Américas (KAPER; MORRIS JR; LEVINE, 1995). A sétima e atual pandemia diverge das demais por ser mais extensa com relação à expansão geográfica, duração e por ser a primeira causada pelo biotipo El Tor de *V. cholerae* O1 (KAPER; MORRIS, JR; LEVINE, 1995). Este biotipo foi isolado em 1906, em peregrinos examinados na estação de quarentena de El Tor, no Egito. Esta pandemia teve origem nas ilhas Celebes (antigas Sulawesi), na Indonésia, no ano de 1961 (FINELLI *et al.*, 1992, GLASS *et al.*, 1991).

Tabela 2: As sete pandemias de cólera, períodos de ocorrência e agentes etiológicos

Pandemia	Período	Agente etiológico
Primeira	1817-1823	<i>V. cholerae</i> O1 biotipo clássico
Segunda	1826-1837	<i>V. cholerae</i> O1 biotipo clássico
Terceira	1846-1862	<i>V. cholerae</i> O1 biotipo clássico
Quarta	1864-1875	<i>V. cholerae</i> O1 biotipo clássico
Quinta	1887-1896	<i>V. cholerae</i> O1 biotipo clássico
Sexta	1899-1923	<i>V. cholerae</i> O1 biotipo clássico
Sétima	1961- até o presente	<i>V. cholerae</i> O1 biotipo El Tor

Fonte: Adaptado de NITRINI et al., (1997)

Com o envolvimento do *V. cholerae* O1 biotipo El Tor como agente etiológico, um novo perfil epidemiológico se desenvolveu ao longo da sétima pandemia, caracterizado pelo processo de endemização, em que exacerbações epidêmicas são intercaladas por períodos silenciosos, seguindo um padrão sazonal. Maior proporção de casos leves, moderados e de infecção assintomática é observada quando comparada com a doença causada pelo *V. cholerae* O1 biotipo clássico (WOODWARD; MOSLEY, 1972).

Em 1992, uma severa epidemia de cólera foi registrada em Madras, uma cidade ao sul da Índia, e ao sul de Bangladesh (ALBERT, 1994). O agente responsável pela epidemia possuía as mesmas características bioquímicas e culturais do *V. cholerae* O1, mas não aglutinava com nenhum dos 138 anti-soros disponíveis para as cepas descritas até então, sendo por isso denominado O139 ou Bengal, devido ao local de seu isolamento. Antes da emergência do *V. cholerae* O139, os sorogrupos não-O1 não tinham sido associados a epidemias de cólera. Desde então, o *V. cholerae* O139 persiste como segundo agente etiológico da doença. Atualmente *V. cholerae* O1 e O139 são associados a epidemias, e a simples distinção entre O1 e não-O1 considerando o potencial epidêmico tornou-se obsoleta (FARUQUE et al., 2002a).

Cepas do sorogrupo O139 produzem os principais fatores de virulência de *V. cholerae* O1, como a toxina colérica e o pilus corregulador de toxina (NAIR et al., 1994). Essas cepas estão relacionadas filogeneticamente ao biotipo El Tor, contudo, apresentam algumas características fenotípicas distintas como a capacidade de sintetizar cápsula e um antígeno O que não reage com os anticorpos induzidos pelo antígeno O1. O lipopolissacarídeo exibe uma variedade de açúcares diferentes dos que integram o antígeno somático do sorogrupo O1 (MOOI; BIK, 1997).

A emergência do *V. cholerae* O139 despertou a atenção mundial, particularmente por ser o primeiro sorogrupo não-O1 associado a epidemias de cólera (NAIR *et al.*, 1994). Extensivos surtos têm ocorrido em várias regiões da Índia e Bangladesh, e infecções causadas por *V. cholerae* O139 foram relatadas no Paquistão, Nepal, China, Tailândia, Cazaquistão, Afeganistão e Malásia (NAIR *et al.*, 1994; FARUQUE *et al.*, 2002a). Casos importados foram notificados nos Estados Unidos e no Reino Unido (NAIR *et al.*, 1994; SWERDLOW; RIES, 1993), evidenciando como essa doença infecciosa pode se espalhar rapidamente ao redor do mundo. Epidemias de cólera causadas por este sorogrupo continuam a ocorrer, e alguns autores sugerem que, caso surtos de cólera devido a este sorogrupo atinjam novos países possa se tratar da oitava pandemia (FARUQUE; ALBERT; MEKALANOS, 1998; SWERDLOW; RIES, 1993).

Dois hipóteses são sugeridas para explicar a origem do sorogrupo O139. Poderia ser derivado de um sorogrupo não-O1 que adquiriu o potencial de causar epidemias, devido à aquisição dos fatores de virulência (BHATTACHARYA *et al.*, 1993; MORRIS JR *et al.*, 1995) ou teria derivado do sorogrupo O1 e sofrido alteração no antígeno O (FARUQUE *et al.*, 2002a). Diversos estudos têm revelado que cepas O139 são mais intimamente relacionadas ao *V. cholerae* O1 biotipo El Tor do que às cepas do biotipo clássico e algumas evidências indicam que o sorogrupo O139 surgiu a partir de cepas do biotipo El Tor por aquisição de DNA exógeno envolvido na síntese do antígeno O e da cápsula (LI *et al.*, 2002). Além disso, cepas de *V. cholerae* O139 possuem todos os fatores de virulência normalmente encontrados em cepas do biotipo El Tor, e ambos causam cólera de comparável severidade clínica (BHATTACHARYA *et al.*, 1993; MORRIS JR *et al.*, 1995).

2.4 Diagnóstico da cólera

O diagnóstico da cólera é a peça fundamental para o êxito das atividades de prevenção e controle da doença. Os países recém-afetados pela cólera, quando não estabelecem o diagnóstico laboratorial nos primeiros casos, prejudicam consideravelmente a implantação de medidas sanitárias indispensáveis ao controle da doença (BRASIL, 1992). Portanto, este diagnóstico deve ser utilizado para investigação de todos os casos suspeitos, principalmente, quando a área é considerada livre de circulação do *V. cholerae* (BRASIL, 2005a).

Os métodos tradicionais de diagnóstico, tanto em fezes, quanto em material proveniente do ambiente (água do mar, de rios e alimentos) consistem em análises bacteriológicas que visam isolar e identificar o *V. cholerae*, baseando-se nas características fenotípicas do microrganismo (BRASIL, 2005a). O diagnóstico laboratorial é utilizado para a investigação em todos os casos suspeitos quando a área é considerada livre de circulação do agente. Em outra situação, é utilizado em conjunto com o critério clínico-epidemiológico, que correlaciona as variáveis clínicas e epidemiológicas dos casos de diarreia, sendo capaz de definir o diagnóstico, sem investigação laboratorial (BRASIL, 2005a).

O *V. cholerae* pode ser isolado a partir de cultura de amostras de fezes de doentes ou portadores assintomáticos ou ainda de amostras ambientais. A coleta do material pode ser feita por swab retal ou fecal, fezes *in natura* ou em papel de filtro. As amostras analisadas pelo método tradicional passam por dois enriquecimentos sucessivos do vibrião em água peptonada alcalina (APA) e semeio em ágar TCBS, meio seletivo e indicador (Figura 3). Posteriormente, são realizados testes bioquímicos para confirmação da espécie e é verificada a capacidade de produzir a toxina colérica, através de ensaios imunoenzimáticos. Além disso, são realizados testes sorológicos, com reações de soroaglutinação frente aos antissoros polivalentes O1 e O139 para identificação do sorogrupo e com antissoros monovalentes (Inaba e Ogawa) para a identificação do sorotipo (BRASIL, 1992).

Esses métodos tradicionais demandam em torno de 72 horas e tem como desvantagem o fato de não detectarem bactérias mortas ou viáveis mas não cultiváveis (VNC). Assim métodos moleculares são mais sensíveis para detecção do *V. cholerae* diretamente de amostras biológicas ou amostras de águas ambientais, uma vez que podem detectar o microrganismo sob essas condições. Muitas técnicas moleculares baseadas na amplificação de DNA foram desenvolvidas para detecção de *V. cholerae* (BLACKSTONE *et al.*, 2007; KEASLER, HALL, 1993; MENDES, ABATH, LEAL, 2008) e visam principalmente identificar o potencial de produção da CT, através da presença de genes codificadores de toxinas.

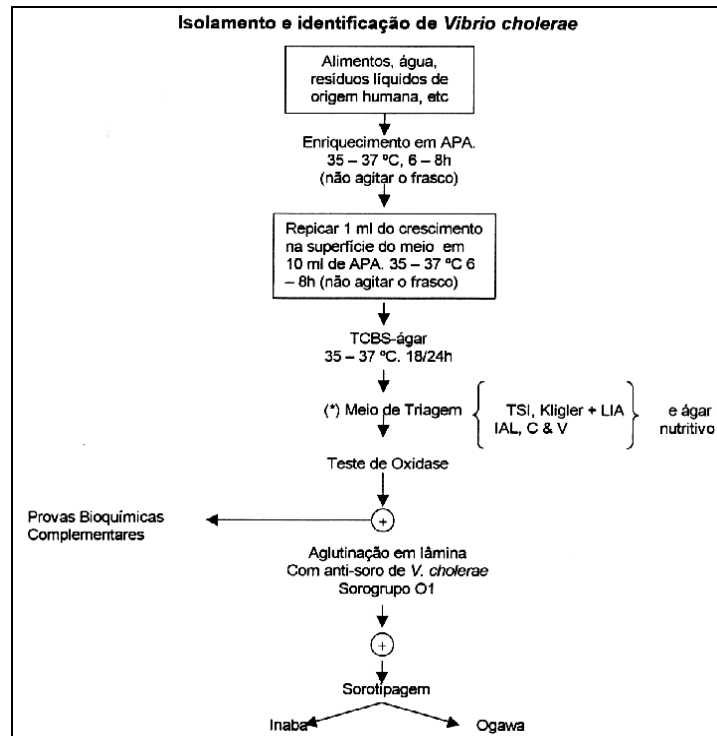


Figura 3: Esquema do método tradicional de diagnóstico da cólera.

Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde (BRASIL, 1992).

2.5 A cólera no Brasil

O continente americano foi atingido no decorrer da terceira pandemia, sendo registrado os primeiros casos no Brasil em 1855, no estado do Pará. A doença atingiu outras regiões brasileiras até o ano de 1868. Em 1869, atingiu o Peru e a Bolívia, sendo o primeiro aparecimento da cólera na costa ocidental da América do Sul. No decorrer da quinta pandemia, novos surtos ocorreram no Brasil, de 1887 a 1895, quando a doença se disseminou de várias localidades de São Paulo, no Vale do Paraíba, ao Estado do Rio de Janeiro (GONÇALVES; HOFER, 2005).

Após um século sem registros no continente, em janeiro de 1991, a doença atingiu a América do Sul, tendo sido introduzida através do litoral peruano. Os primeiros casos no Brasil foram registrados em abril de 1991, no estado do Amazonas, nos municípios de Benjamin Constant e Tabatinga, ambos na fronteira com a Colômbia e o Peru, e a partir destes casos, expandiu-se pelo país (MUJICA et al., 1994). No final de 1991, atingiu o município de São Luiz no Maranhão e no final de 1992 todos os estados do Nordeste já haviam sido

atingidos. Em 1993 e 1994 foram registrados casos em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (GEROLOMO; PENA, 1999).

Num período de aproximadamente três anos, compreendido entre abril de 1991 e abril de 1994, o *V. cholerae* conseguiu atingir todas as regiões brasileiras (GEROLOMO; PENA, 1999). A epidemia alcançou o ápice em 1993, quando foram detectados 60.340 casos (Figura 4). Em 1994 foi desenvolvida uma campanha nacional de combate à cólera e a doença começou a retroceder (GUTHMANN, 1995; NITRINI et al., 1997). A partir de 1995 a incidência foi reduzida significativamente, tendendo a limitar-se às regiões Norte e Nordeste, onde prevalecem condições socioeconômicas menos satisfatórias, favorecendo a endemização da doença (BRASIL, 2000).

Do início da epidemia até o primeiro semestre de 2001, foram notificados 168.598 casos, com 2.035 óbitos (BRASIL, 2005a). Em 2002 e em 2003, não foram notificados casos de cólera no país. No primeiro semestre de 2004, foram registrados 21 casos de cólera no município de São Bento do Una, em Pernambuco (HOFER et al., 2006). Nesse município houve confirmação de mais quatro casos em 2005, ano em que também foi registrado um caso no município de Recife (BRASIL, 2005b).

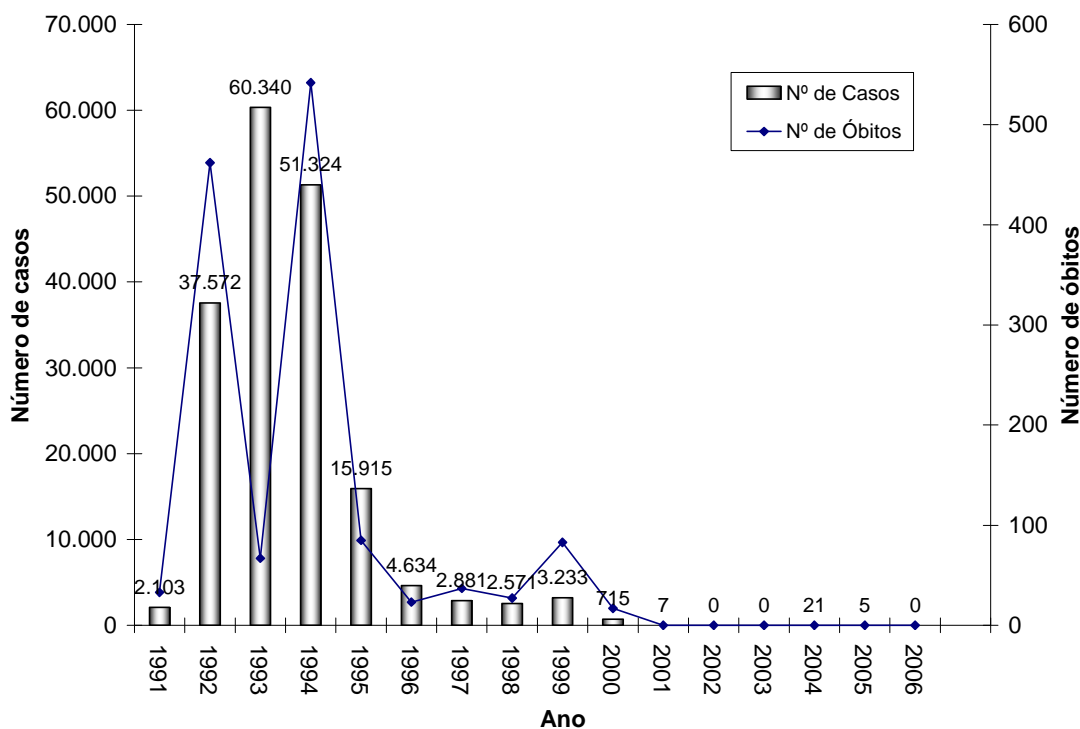


Figura 4: Número de casos de cólera no Brasil e taxa de mortalidade, entre 1991 e 2006.
Fonte: Adaptado de BRASIL (2002)

Após o término da epidemia o estado de Pernambuco foi o único a manter uma vigilância ativa para a cólera. Na tentativa de prevenir uma epidemia e de controlar o número de casos, implantou um programa de investigação epidemiológica que pesquisa a presença do vibrião em mananciais aquáticos no estado. Esse programa de investigação isolou em dezembro de 2006 uma cepa de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, toxigênica no rio Capibaribe, em Recife. Neste ano não houve nenhum caso confirmado da doença. Em 2007, foram isoladas pelo LACEN-PE quatro cepas de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor nos rios Ipojuca, Una e Bituri nas imediações dos municípios de Sanharó e Belo Jardim, no Agreste, em Palmares, na Zona da Mata e em Ipojuca, no Grande Recife. Em 2008 foram isoladas duas cepas de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, nos municípios de Lagoa do Carro e Bom Jardim. As cepas isoladas em 2007 e 2008 diferenciam-se das isoladas no estado por serem do sorotipo Inaba, enquanto as demais eram do sorotipo Ogawa. Uma das cepas isoladas em 2007 e as duas isoladas em 2008 são toxigênicas (Dados não publicados). Esses achados corroboram a hipótese da endemização da doença, uma vez que o isolamento de cepas toxigênicas sugere a existência de pacientes, não detectados pelos serviços de saúde, eliminando o vibrião nas águas ambientais.

2.6 Situação atual da doença

Surtos de cólera podem ocorrer esporadicamente em qualquer parte do mundo onde haja condições sanitárias e práticas de higiene inadequadas. Comunidades sem infra-estrutura sanitária e que consomem águas não tratadas são as mais frequentemente afetadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001). O controle da doença é o principal problema de saúde pública em vários países da Ásia e África. Somente no ano 2000 mais de 140.000 casos, com aproximadamente 5.000 mortes foram oficialmente notificados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001).

Em 2004 foram identificados casos de cólera em todos os continentes, com notificação em 56 países. A grande maioria dos casos ocorreu na África, sendo Moçambique e Zâmbia os países mais afetados. A Índia reportou 4.695 casos, com sete óbitos, no entanto acredita-se que esses valores não representem a verdadeira situação da doença, visto que nesse país a doença permanece de forma endêmica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005). Em 2005 houve um aumento de 30% no número de casos notificados da doença em relação a

2004. A cólera foi notificada em 52 países, com significantes surtos na África, onde 14 países foram afetados, o que representou um total de 58% dos casos relatados mundialmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006).

A re-emergência da cólera foi confirmada em 2006 em paralelo ao aumento da proporção de populações vulneráveis vivendo sob condições sanitárias insatisfatórias. O número de casos de cólera notificados à Organização Mundial de Saúde em 2006 aumentou drasticamente, atingindo níveis similares aos notificados no final da década de 1990 (Figura 5). Um total de 236.896 casos foram notificados em 52 países, incluindo 631 mortes, um aumento de 79% quando comparado com os casos reportados em 2005. Esse maior número de casos foi resultado de vários surtos que ocorreram em países onde casos não eram notificados a vários anos. A África notificou um total de 234.349 casos, um aumento de 87% quando comparado com 2005, representando 99% do total de casos de cólera notificados oficialmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007).

Em 2007 a Organização Mundial de Saúde registrou um total de 177.963 casos incluindo 4.031 mortes. Esses valores representaram um decréscimo de 25% no número oficial de casos notificados quando comparados com 2006, mas um aumento de 46% quando comparados com os casos notificados entre os anos de 2002 e 2005. Em 2007 um total de 53 países registraram casos de cólera em todos os continentes com exceção da América Central e América do Sul (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008).

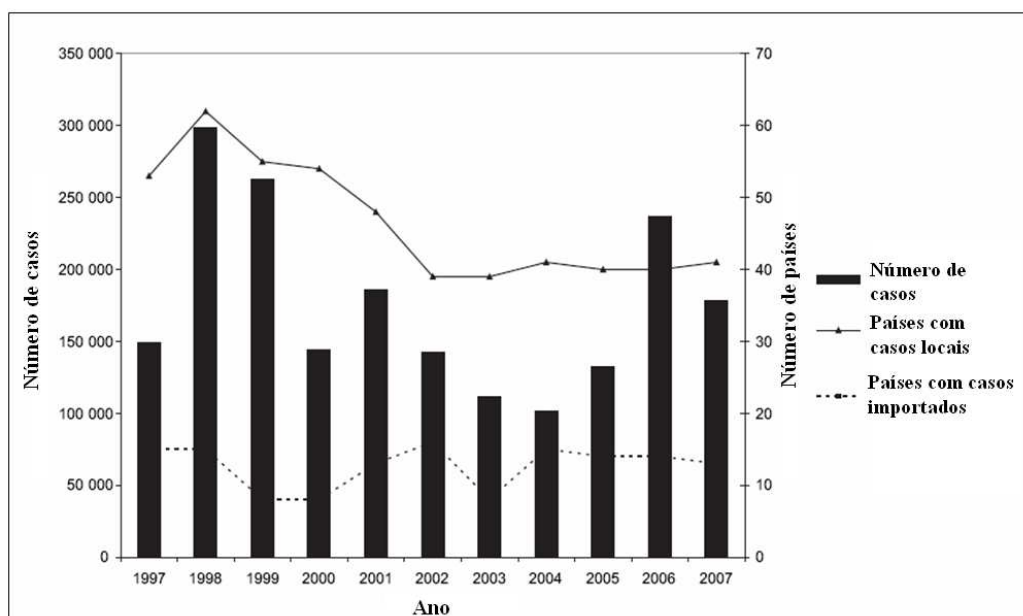


Figura 5: Número de casos e de países que reportaram casos de cólera por ano, de 1996 a 2007.

Fonte: Adaptado da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2008).

Embora tenha havido um decréscimo no número de casos registrados no último ano, a cólera permanece como uma ameaça global a saúde pública e pode ser considerado um dos indicadores chave de desenvolvimento social. Enquanto a doença está longe de ser uma ameaça em países com mínimos padrões de higiene, permanece um desafio nos países onde o acesso a água tratada e adequadas condições sanitárias não podem ser garantidas para todos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008).

2.7 Epidemiologia

A cólera é freqüentemente descrita como uma doença associada à água. Essa descrição simplifica a transmissão da doença, já que o *V. cholerae* também pode ser transmitido por alimentos contaminados, onde a água contaminada (misturada aos alimentos) atua como veículo. Na maioria dos países desenvolvidos, alimentos contaminados, especialmente frutos do mar, são um veículo para transmissão, enquanto a transmissão por água contaminada é mais comum em países em desenvolvimento (SHAPIRO et al., 1999).

A dinâmica de transmissão da cólera envolve a ingestão de água e alimentos contaminados, colonização da mucosa do intestino delgado e eliminação fecal do *V. cholerae*, tornando possível a contaminação ambiental e a disseminação secundária. Condições precárias de saneamento básico, com escassez de água tratada e de rede de esgotos são fatores condicionantes desses eventos (GONÇALVES; HOFER, 2005).

A principal característica epidemiológica da cólera é aparecer com regular padrão sazonal em áreas de infecção endêmica e em explosivos surtos freqüentemente se iniciando em distintos focos simultaneamente (FARUQUE et al., 1998b), indicando um possível papel dos fatores ambientais na manutenção do processo endêmico. Na epidemiologia da doença duas propriedades críticas são levadas em consideração, devido ao seu significado em saúde pública: a produção da toxina colérica, a principal responsável pela severa diarreia, e a presença dos antígenos O1 e O139, que atuam como marcadores de potencial epidêmico. Em adição aos genes codificadores da CT, todas as cepas capazes de causar cólera invariavelmente carregam genes para o fator de colonização, TCP, e uma proteína regulatória, ToxT, que corregula a expressão de CT e TCP (DIRITA et al., 1991). No entanto a patogênese da cólera é resultante de efeitos sinérgicos de vários fatores de patogenicidade produzidos por *V. cholerae* toxigênico (FARUQUE et al., 1998b).

O *V. cholerae* é um habitante natural de ambientes aquáticos e sistemas de estuários podendo viver em associações ecológicas com zooplânctons e vários animais marinhos, como moluscos (MOOI; BIK, 1997). Embora o *V. cholerae* seja encontrado em rios e áreas de estuários, cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 são mais comumente isoladas do ambiente do que cepas dos sorogrupos O1 e O139. Além disso, fora de áreas epidêmicas e longe de áreas que possam ser contaminadas por pacientes com cólera, isolados ambientais de *V. cholerae* O1 comumente encontrados são CT negativos (FARUQUE et al., 1998b).

A sobrevivência e persistência do *V. cholerae* O1 ou O139 toxigênico no ecossistema aquático depende de vários fatores, como a ocorrência de particulares condições físico-químicas, específicas associações do *V. cholerae* com plantas aquáticas ou animais. Há ainda a existência de associações ecológicas envolvendo vários componentes do ambiente aquático, estando estas variações relacionadas com a multiplicação e a reativação do potencial infeccioso e patogênico do microrganismo (GONÇALVES; HOFER, 2005).

Há evidências de que sobre determinadas condições os vibriões são convertidos a um estado viável, mas não cultivável (VNC), forma em que não podem ser isolados por técnicas de cultivo padrão, mas que são capazes de causar infecção (GONÇALVES et al., 2004; HUQ et al., 1983) constituindo um importante fator de disseminação da doença. Fatores ambientais e climáticos diversos como pH, salinidade e temperatura da água exercem influência nesse processo (GONÇALVES; HOFER, 2005). Além disso, células de *V. cholerae* VNC pode se associar na forma de biofilmes constituindo um fator de sobrevivência sob condições adversas. O papel dos biofilmes na epidemiologia da cólera não é claro, mas presume-se que essas células podem se converter em bactérias ativas e causar surtos da doença (FARUQUE et al., 2006).

Recentemente, foi observado o papel de bacteriófagos e sua ação sobre *V. cholerae*, principalmente em cepas virulentas de sorogrupos O1 e O139, relacionando-os à incidência de cólera e a prevalência de cepas ambientais de *V. cholerae* (FARUQUE et al., 2005a). Períodos interepidêmicos são caracterizados por conter bacteriófagos em amostras de água, e não bactérias cultiváveis. O processo de aquisição dos fagos pelas bactérias pode ocorrer no ambiente ou no intestino humano por ingestão da água levando a epidemia. No final da epidemia esse processo se inverte possivelmente pela conversão da fase lisogênica em fase lítica. Assim, no período posterior ao pico da epidemia a concentração de fagos aumenta rapidamente e a concentração de cepas epidêmicas diminui fechando o ciclo sazonal da doença (FARUQUE et al., 2005b). Desta forma, a presença dos fagos livres pode ter um papel

na emergência de novos clones e sorogrupos pandêmicos de *V. cholerae* (FARUQUE et al., 2005a).

2.8 Fatores de virulência

A patogenicidade de *V. cholerae*, em nível molecular, é um processo multifatorial e envolve genes que codificam diferentes fatores que atuam na colonização, na coordenação da expressão de diversos fatores e na ação tóxica (SACK et al., 2004). Análises genéticas revelaram a presença de dois importantes elementos, primariamente encontrados em cepas epidêmicas dos sorogrupos O1 e O139: o elemento genético CTX (PEARSON et al., 1993) e a ilha de patogenicidade de *Vibrio* (VPI) (KARAOLIS et al., 1998).

Estas duas regiões constituem o genoma de dois bacteriófagos - CTX ϕ e VPI ϕ - que estão integrados ao cromossomo maior de *V. cholerae* (HEIDELBERG et al., 2000) e são capazes de serem transferidos horizontalmente, conferindo virulência às cepas receptoras (KARAOLIS et al., 1999; WALDOR; MEKALANOS, 1996). A estrutura da VPI e do elemento genético CTX sugere a transferência horizontal de genes como possível mecanismo para a origem de novos clones patogênicos de *V. cholerae*. Além disso, estudos têm indicado que esses genes de virulência ou seus homólogos estão dispersos entre cepas ambientais de diversos sorogrupos, constituindo assim, um reservatório desses genes, o que dá suporte a hipótese de origem ambiental de *V. cholerae* patogênico (BOYD; WALDOR, 2002; CHAKRABORTY et al., 2000; DAALSGAARD, et al., 2001; MUKHOPADHYAY et al., 1995; MUKHOPADHYAY et al., 2001, THEOPHILO et al., 2006).

2.8.1 Ilha de patogenicidade de *Vibrio*

O pilus corregulador de toxina (TCP), um dos principais fatores de virulência em *V. cholerae*, é requerido para a eficiente colonização do epitélio intestinal humano pelo microrganismo. Embora a principal subunidade do TCP seja codificada pelo gene *tcpA*, a biogênese e regulação da produção de TCP envolve no mínimo 15 genes presentes no *cluster tcp* (MANNING, 1997). O *cluster tcp* é parte de uma ilha de patogenicidade denominada

elemento TCP-ACF ou ilha de patogenicidade de *Vibrio* (VPI) (BROWN; TAYLOR, 1995; KARAOLIS et al., 1998). A VPI compreende os conjuntos de genes TAG, ACF e TCP (Figura 6) que codificam o fator de colonização e genes de regulação que atuam em cascata (SKORUPSKI; TAYLOR, 1997).

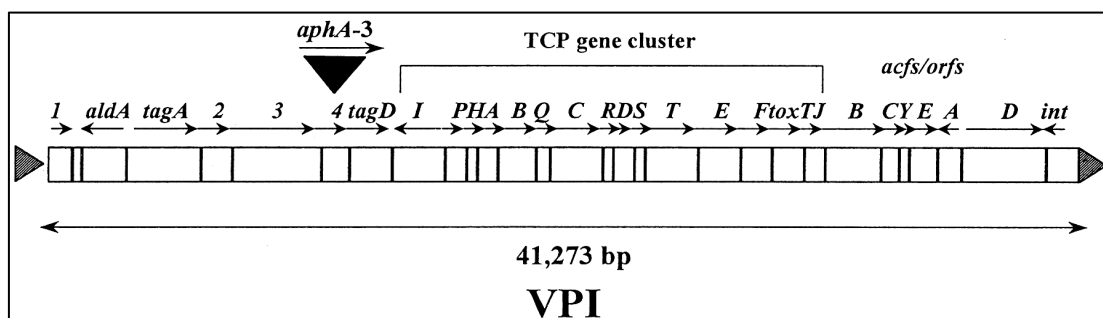


Figura 6: Esquema da Ilha de Patogenicidade de *Vibrio* destacando o conjunto de genes TCP, responsável pela expressão do fator de colonização e demais genes envolvidos com a regulação.

Fonte: ZHANG et al. (2003)

O TCP além de permitir a colonização do epitélio intestinal pelo *V. cholerae*, é o receptor para a entrada do profago CTX ϕ em novas células. Desta forma observa-se uma situação onde um fago serve de receptor para um segundo fago, em um processo de infecção sequencial que resulta na virulência do microrganismo (KARAOLIS et al., 1999). Uma vez que CTX ϕ usa TCP como receptor, acredita-se que a aquisição da VPI seja o evento genético inicial requerido para a evolução de cepas epidêmicas. Além disso, a colonização é um pré-requisito para o estabelecimento da infecção por *V. cholerae* (FARUQUE; MEKALANOS, 2003).

Devido ao interesse em fatores e processos envolvidos na emergência, patogênese, persistência e expansão de *V. cholerae* epidêmico cepas representativas das sexta e sétima pandemias foram sequenciadas e comparadas (KARAOLIS et al., 2001). Foi demonstrado que a maioria das divergências entre as VPI de cepas da sexta e sétima pandemias estão localizadas no gene *tcpA* ou ao seu redor, que corresponde a região central da VPI (KARAOLIS et al., 2001). Comparações de diversidade genética da VPI entre isolados de *V. cholerae* nos locus *tcpA* e *aldA*, revelaram que sequências de *tcpA* são muito mais variáveis que de outros loci. Muito provavelmente essa diversidade seja reflexo da seleção na adaptação à resposta imune do hospedeiro ou a suscetibilidade a CTX ϕ (BOYD; WALDOR, 2002).

O polimorfismo do gene *tcpA*, que codifica um produto que é imunogênico e que pode interagir diretamente com o hospedeiro humano, sugere fortemente que esse gene seja sujeito à seleção natural, e que isso possa dirigir a substituição e recombinação da região central da

VPI. É possível que diferenças na proteína TcpA afete interações com vários fagos que o utilizem como receptor em vias que são sujeitas à seleção (KARALIS et al., 2001).

2.8.2 Profago CTX ϕ

O genoma do profago CTX ϕ tem uma estrutura composta por dois domínios funcionais distintos, a região central e a RS2 (Figura 7). Na região central localizam-se os genes *ctxA* e *ctxB*, que codificam a toxina colérica, principal fator de virulência do *V. cholerae*, e os genes *cep*, *orfU*, *ace* e *zot* que codificam proteínas relacionadas a capacidade infecciosa do microrganismo (WALDOR; MEKALANOS, 1996). O gene *zot* codifica uma proteína conhecida como *zonula occludens toxin*, que aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal por afetar a estrutura da junção intercelular (FASANO et al., 1991). A enterotoxina colérica acessória, a terceira toxina descrita, é capaz de induzir acúmulo de fluidos no íleo de coelhos (TRUCKSIS et al., 1993).

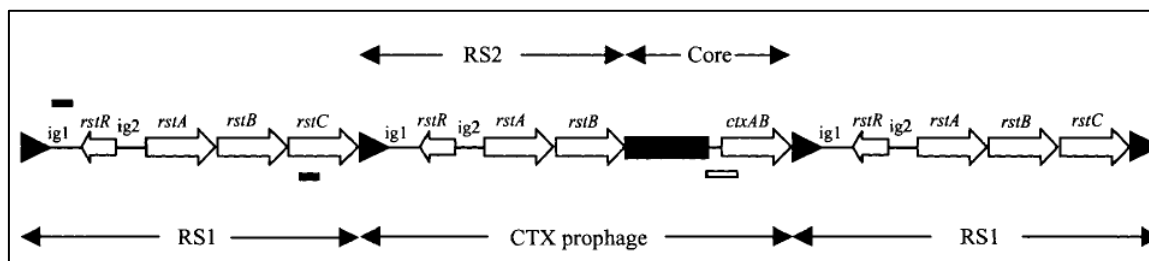


Figura 7: Esquema do profago CTX ϕ evidenciando a região central e a região RS2, flanqueado pelo elemento RS1.

Fonte: NANDI et al. (2003).

A região RS2 é composta pelos genes *rstA*, *rstB* e *rstR*, que codificam produtos requeridos para a replicação, integração e regulação do profago, respectivamente, além de duas regiões intergênicas, *ig1* e *ig2* (WALDOR et al., 1997).

O profago CTX ϕ se integra ao cromossomo de *V. cholerae* em um sítio específico denominado *attRS1* (PEARSON et al., 1993). Em *V. cholerae* toxigênico o profago CTX ϕ integrado ao cromossomo é flanqueado por uma sequência repetitiva referida como elemento RS1 (DAVIS; WALDOR, 2000; PEARSON et al., 1993). O elemento RS1 é muito similar à região RS2 do profago CTX ϕ sob aspectos genéticos e funcionais, mas possui uma ORF adicional, *rstC*, que é ausente na região RS2 (WALDOR et al., 1997). A função de *rstC* ainda

não é clara, mas parece provável que *rstC* codifique produtos requeridos para a morfogênese do elemento RS1. O elemento RS1 também corresponde a um fago satélite que utiliza os genes de morfogênese do profago CTX ϕ para produzir partículas de RS1 ϕ (FARUQUE et al., 2002b).

Cepas de *V. cholerae* toxigênico carregam uma ou mais cópias do elemento genético CTX ϕ . Sobre apropriadas condições essas cepas são induzidas a produzir partículas extracelulares do profago que pode ser transmitido para cepas receptoras, nas quais se integra ao cromossomo, ou pode manter-se extra-cromossomicamente em uma forma replicativa do fago (FARUQUE et al., 1998a, WALDOR; MEKALANOS, 1996). Em condições naturais cepas não toxigênicas de *V. cholerae* podem ser infectadas pelo profago CTX ϕ e convertidas em cepas com potencial epidêmico (FARUQUE et al., 1998b).

É possível que fatores ambientais não identificados induzam o *V. cholerae* toxigênico a entrar em um ciclo lítico resultando na liberação de partículas extracelulares do CTX ϕ no ambiente aquático. Os profagos livres participam da emergência de novas cepas toxigênicas de *V. cholerae* através de interações com cepas não toxigênicas que existem no ambiente e com a população humana que consome essas águas. Foi demonstrado que o profago CTX ϕ infecta células receptoras mais eficientemente no ambiente intestinal onde fatores de virulência como TCP são adequadamente expressos (FARUQUE et al., 1998b). Enquanto a conversão de *V. cholerae* não toxigênico é favorecida pelo trato gastrointestinal do hospedeiro, a seleção natural e persistência das novas cepas toxigênicas podem envolver tanto fatores intestinais quanto ambientais, a condição imunológica da população e as propriedades antigênicas das novas cepas patogênicas (FARUQUE; NAIR, 2002).

Variantes do profago CTX ϕ foram descritos e nomeados CTX^{ET} ϕ , derivado de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, CTX^{CLASS} ϕ , de *V. cholerae* clássico, CTX^{CALC} ϕ , de *V. cholerae* O139 (DAVIS et al., 1999), CTX^{ENV} ϕ , derivado de *V. cholerae* não-O1, não-O139 (MUKHOPADHYAY et al., 2001) e CTX^{VAR} ϕ presente em *V. cholerae* pré-O139 El Tor (*V. cholerae* El Tor isolada antes do aparecimento de *V. cholerae* O139) (NANDI et al., 2003). A diversidade de CTX ϕ entre diferentes biotipos é devida principalmente a extensas variações no elemento RS2, particularmente na região do gene *rstR* (DAVIS et al., 1999; KIMSEY et al., 1998). O significado epidemiológico da diversidade de fagos CTX ϕ , não é claramente reconhecido, mas os dois últimos períodos de explosivo recrudescimento da cólera na região endêmica da Índia e Bangladesh, foram associados a cepas mostrando mudanças no tipo de *rstR* presente no fago (NUSRIN et al., 2004).

3 JUSTIFICATIVA

Theophilo et al. (2006) analisaram 179 amostras de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, a maioria isolada de casos clínicos, compreendendo 54 diferentes sorogrupos. As amostras de sorogrupo O26 representaram 8,4%, sem nenhuma correlação quanto à fonte de origem ou local de isolamento. Curiosamente, apesar dessas 14 cepas possuírem genes presentes no profago CTX ϕ , somente em cinco cepas foi detectado o gene tcpA utilizando-se primers para o alelo El Tor.

Cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, apesar de seu limitado poder toxigênico, podem adquirir genes de virulência por mecanismos de transferência horizontal e se tornarem cepas com potencial epidêmico, como o ocorrido com o sorogrupo O139. Como em sua maioria corresponde a cepas ambientais, geralmente não toxigênicas, são descartadas dos métodos de triagem como possíveis agentes de cólera, não sendo levado em conta a capacidade dessas cepas adquirirem os fatores de virulência dos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* e se tornarem cepas patogênicas.

As cepas de *V. cholerae* O26 constituem o primeiro relato da presença de genes de virulência dos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* em cepas não-O1/ não-O139 no Brasil. No entanto sua origem e a relação molecular existente entre essas cepas e os sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* não está totalmente esclarecido até o momento.

O estudo dos profagos presentes nas cepas *V. cholerae* O26 pode esclarecer a origem dessas cepas com potencial epidêmico no país, reforçando a importância para o monitoramento de cepas não-O1/ não-O139, devido ao seu potencial como futuras causadoras de epidemias de cólera no Brasil.

4 PERGUNTA CONDUTORA

É possível correlacionar as cepas de *Vibrio cholerae* O26 com os sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* através da análise dos fagos presentes nessas cepas?

5 HIPÓTESE

Há relação molecular entre os fagos presentes nas cepas de *V. cholerae* O26 e em cepas epidêmicas de *V. cholerae*.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Correlacionar cepas de *V. cholerae* O26 com os sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* O1 através da análise do profago CTX ϕ e da VPI.

6.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a presença dos genes *ctxA*, *ctxB*, *ace*, *zot*, *cep*, *orfU*, da região gênica *IgF-ace* do profago CTX ϕ e da região gênica RsR-IgF da região RS1;
- b) Verificar a presença dos genes dos genes *tcpA*, *tcpP-H*, *aldA*, *tagA* e *int* da VPI;
- c) Identificar o tipo de alelo dos genes *tcpA* e *rstR* presentes nas cepas de *V. cholerae* O26;
- d) Fazer uma análise *in silico*, comparando as sequências obtidas com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI;
- e) Realizar uma análise filogenética, identificando o grau de proximidade dos fagos presentes nessas cepas com os dos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae*.

7 METODOLOGIA

7.1 Desenho do estudo

Os procedimentos metodológicos realizados neste estudo se iniciaram com a extração de DNA das cepas de *V. cholerae* (Figura 8). A partir de então foi realizada amplificação de fragmentos de genes específicos do profago CTX ϕ e da VPI por PCR. Os fragmentos das regiões gênicas IgF-ace e RsR-IgF do profago CTX ϕ e do gene *tcpA* da VPI foram clonados no vetor pGEM $\text{\textcircled{R}}$ -T Easy e sequenciados. As sequências obtidas foram analisadas através dos programas Seqman e Editseq (DNASTAR) e comparadas com sequências de *V. cholerae* disponíveis no banco de dados do NCBI. Árvores filogenéticas dos genes *rstR* e *tcpA* foram construídas através do programa MEGA.

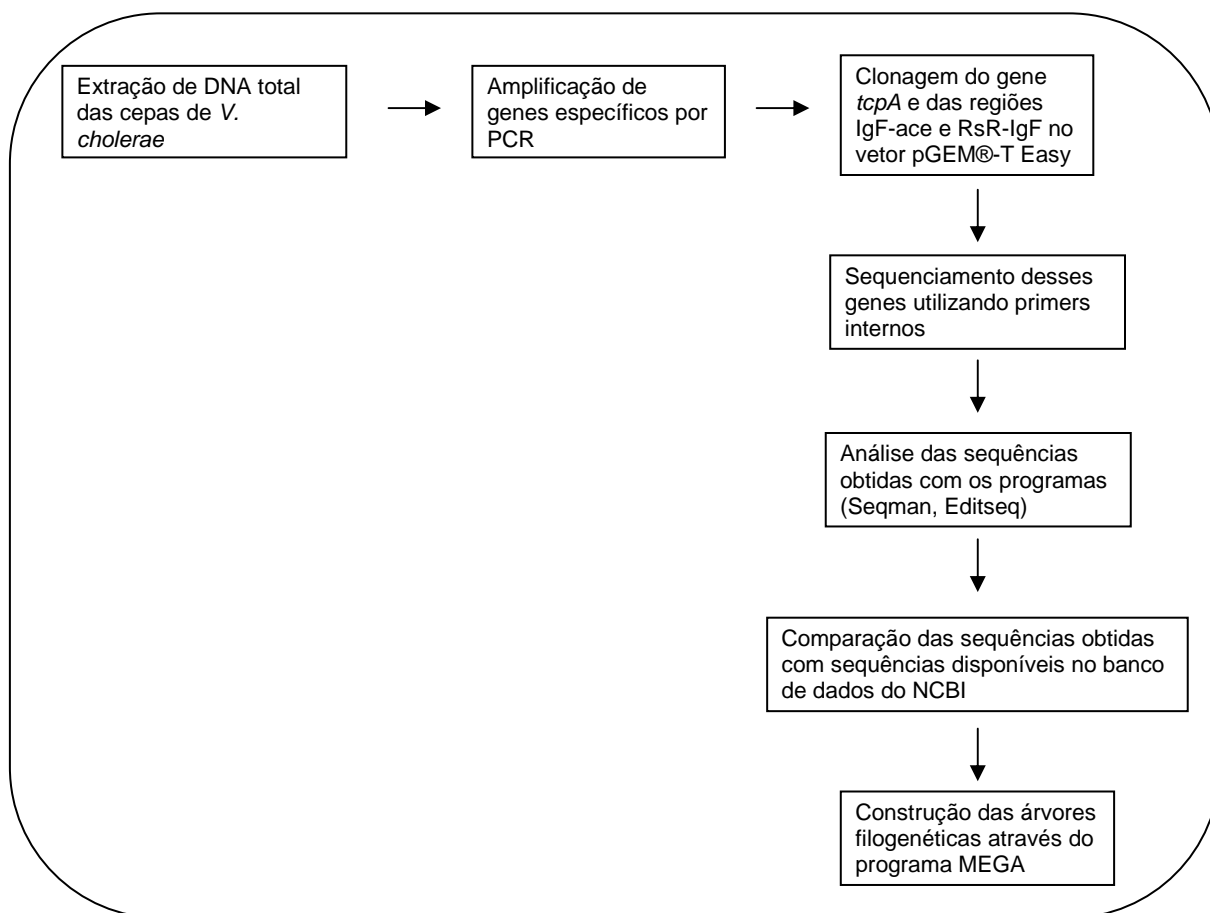


Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos metodológicos realizados neste estudo.

7.2 Cepas de *V. cholerae*

Foram analisadas 14 cepas de *V. cholerae* O26 e uma cepa de sorogrupo não tipável isoladas entre 1991 e 2000 de processos entéricos humanos (coprocultivos) e do ambiente no Brasil, cedidas pelo Centro de Referência Nacional de Cólera e Enteroinfecções Bacterianas (CRNCEB – FIOCRUZ, RJ - Brasil). Previamente, as cepas foram classificadas no *National Institute of Health*, Tóquio – Japão, para a identificação sorológica (Tabela 3).

A cepa 569B, *V. cholerae* O1 biotipo Clássico, isolada em 1948 de caso clínico na Índia, e a cepa de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor 63, isolada do ambiente em Pernambuco em 1992, durante a epidemia, foram utilizadas como controles.

Tabela 3 – Cepas de *V. cholerae* utilizadas neste estudo, evidenciando o sorogrupo, ano e local de isolamento.

Nº CPqAM	Nº IOC	SOROGRUPO	ANO	ORIGEM
143 / 01	1717	O26	1992	Pernambuco - Brasil
145 / 01	3647	O26	1992	Pernambuco - Brasil
149 / 01	4010	O26	1992	Pernambuco - Brasil
151 / 01	4756	O26	1992	Pernambuco - Brasil
165 / 01	15677	O26	1998	Ceará - Brasil
168 / 01	17155	Não tipável	2000	Pernambuco - Brasil
180 / 01	3340	O26	1992	Pernambuco - Brasil
181 / 01	6958	O26	1992	Ceará - Brasil
182 / 01	10626	O26	1993	Bahia - Brasil
183 / 01	11159	O26	1993	Pernambuco - Brasil
184 / 01	13151	O26	1994	Pernambuco - Brasil
267 / 01	2494	O26	1992	Bahia - Brasil
269 / 01	11043	O26	1993	Pernambuco - Brasil
270 / 01	13663	O26	1994	Pernambuco - Brasil
271 / 01	16352	O26	1999	Ceará - Brasil

Fonte: Elaborado pelo autor

7.3 Condições de crescimento e extração do DNA

As cepas estocadas em ágar nutritivo camada alta em temperatura ambiente, foram reativadas em Água Peptonada Alcalina (APA), meio propício para crescimento de *V. cholerae*, por incubação a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, cada cepa foi semeada em meio seletivo indicador TCBS e incubadas a 37°C por 24 horas, para confirmação da pureza da cepa. Três colônias isoladas foram inoculadas em 10mL de APA, incubadas a 37°C por 24 horas, para extração de DNA.

O DNA total foi extraído segundo protocolo descrito por Ausubel et al. (1987), sem a adição de lisozima.

7.4 Reações de PCR

As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 µM; 20 pmol de cada primer; 20 ng de DNA genômico de cada cepa; 1 U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em um termociclador Biometra®, programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, correspondendo cada ciclo de um minuto a 92°C, um minuto a 55°C, um minuto e 30 segundos a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de sete minutos a 72°C. As temperaturas de pareamento dos *primers* (tabela 4) e de extensão foram padronizadas para cada fragmento amplificado. Os produtos obtidos das amplificações por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Após a migração, o gel de agarose corado com solução de brometo de etídio (15 µL/ Litro de solução a 15 mg/mL) foi observado em luz UV e digitalizados em câmara digital Kodak 1D Image Analysis Software®, versão 3.5 para Windows.

GENE	PRIMER	SEQÜÊNCIA DO PRIMER	REFERÊNCIA
<i>cep</i>	cep F	TCG TTA GCG TGT CGG TTC GCA GG	Sarkar <i>et al.</i> (2002)
	cep R	TGC TTT GTA CCA GTC ACA GAT AG	
	cep R1	TGG GCA CCA GTA AAG ATA CGG	Este estudo
<i>orfU</i>	orfU F	GCT ACA TGT TTA GCT CAC TG	Sarkar <i>et al.</i> (2002)
	orfU R	AGG TGC GTT AGT CAT CAG CG	
	orfU R1	GTC TAT AAA AAC CAA TCA GAG	Este estudo
<i>ace</i>	ace F	AGA GCG CTG CAT TTA TCC TTA TTG	Leal <i>et al.</i> (2004)
	ace R	AAC TCG GTC TCG GCC TCT CGT ATC	
<i>zot</i>	zot F	GCT ATC GAT ATG CTG TCT CCT CAA	
	zot R	AAA GCC GAC CAA TAC AAA AAC CAA	
<i>ctxA</i>	ctxAi F	CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG	Keasler; Hall (1993)
	ctxAi R	TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG	
<i>ctxA</i>	ctxAe F	CTT TTA ACT TTA GAT TGG TAT TC	Este estudo
	ctxAe R	ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC	Li <i>et al.</i> (2002)
<i>ctxB</i>	ctxB F	GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC	Mekalanos <i>et al.</i> (1983)
	ctxB R	GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT	
<i>igl</i>	IgF	GAG CCT GTG CAC TCA CCT TGT AT	Nandi <i>et al.</i> (2003)
<i>rstC</i>	RsR	GCT CAG TCA ATG CCT TGA GTT G	
<i>rstA</i>	rstA R	GCA TAA GGA ACC GAC CAA GCA AGAT	Heidelberg <i>et al.</i> (2000)
	rstA F1	CAT TAG CCT TCA AAA ACC TGT	Este estudo
	rstA F2	TAA TCG CTC ACC ACC GTT AGG	
	rstA R2	CAT TTA CTG GCG TAT CTA CAA	
<i>rstB</i>	rstB F	AAC ATT GGC CTT TAT CGT TTT	Este estudo
	rstB R	GCC TTT CCG GTT CTT GTC ACG	
<i>tcpA</i> El Tor	tcpA F	GAA GAA GTT TGT AAA AGA AGA ACA C	Keasler; Hall (1993)
	tcpA R	GAA AGC ACC TTC TTT CAC GTT G	
<i>tcpA</i>	<i>tcpH1</i>	AGC CGC CTA GAT AGT CTG TG	Boyd; Waldor (2002)
	<i>tcpA4</i>	TCG CCT CCA ATA ATC CGAC	
<i>aldA</i>	<i>aldA R</i>	ATT CTT CTG AGG ATT GCT GAT	Boyd <i>et al.</i> (2000)
	<i>aldA F</i>	TTT TCT TGA TTG TTA GGA TGC	
<i>tagA</i>	<i>tagA F</i>	TGA GCC TGA AAT AAT CAC AGG	Li <i>et al.</i> (2003)
	<i>tagA R</i>	GAT GAT GAA GTG TAT ATC TAC	
<i>acfB</i>	<i>acfB F</i>	GAT GAA AGA ACA GGA GAG A	Kovach; Shaffer; Peterson (1996)
	<i>acfB R</i>	CAG CAA CCA CAG CAA AAC C	
<i>tcpPH</i>	<i>tcpP F</i>	ACT CTG TGA ATA TCA TCC TGC C	Sarkar <i>et al.</i> (2002)
	<i>tcpH R</i>	CTG GGT AAG CCA AAC ATT GG	

Fonte: Elaborado pelo autor

7.4.1 Amplificação dos genes regulatórios do profago CTX ϕ

A amplificação da região contendo os genes regulatórios do profago CTX ϕ foi realizada utilizando o *primer* IgF, que pareia na região intergênica *ig1*, e o *primer* aceR, que pareia no gene *ace*, na região core do profago CTX ϕ (Figura 9). O produto obtido nessa amplificação foi utilizado para o sequenciamento dessa região.

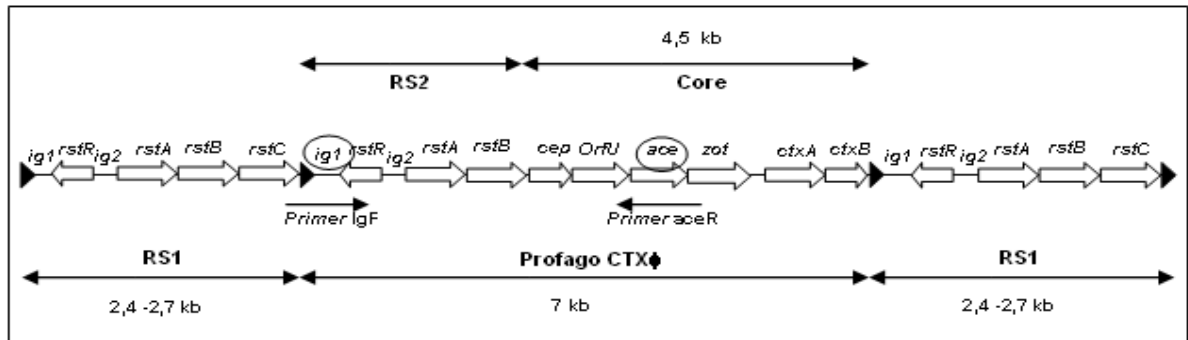


Figura 9: Esquema representativo da estratégia de amplificação dos genes *rstA*, *rstB* e *rstR* presentes na região RS2 do profago CTX ϕ .

Fonte: Adaptado de NANDI et al. (2003).

7.4.2 Amplificação dos genes regulatórios do elemento RS1

A amplificação da região contendo os genes regulatórios do elemento RS1 foi realizada utilizando o *primer* RsR, que pareia no gene *rstC*, e o *primer* IgF, que pareia na região intergênica *ig1* (Figura 10). O produto obtido nessa amplificação foi utilizado para o sequenciamento dessa região.

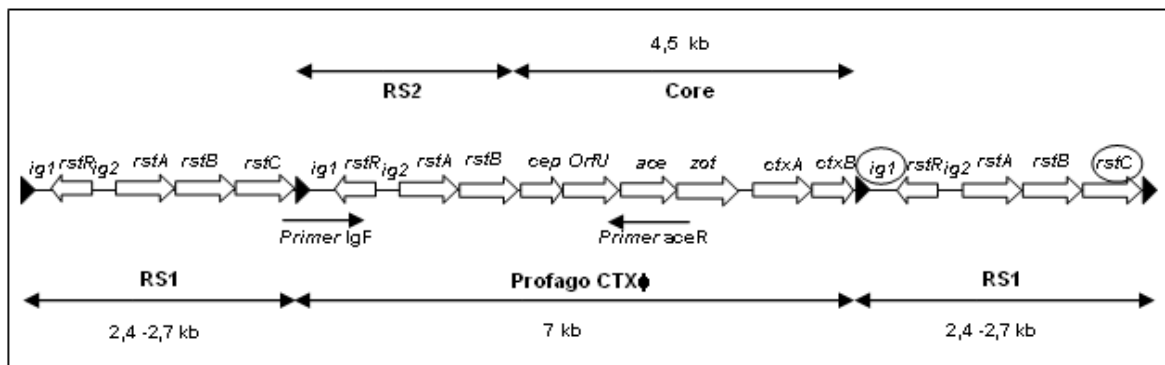


Figura 10: Esquema representativo da estratégia de amplificação dos genes *rstA*, *rstB*, *rstC* e *rstR* presentes na região RS1.

Fonte: Adaptado de NANDI et al. (2003).

7.5 Clonagem

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados com o Kit QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen®) e ligados ao plasmídeo pGEM-T Easy (Promega®). Células de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas com o plasmídeo recombinante. Colônias brancas de cada clonagem foram incubadas em meio LB contendo 100 mg/mL ampicilina e utilizadas para extração de DNA plasmidial segundo o método de lise alcalina (Sambrook e Russell, 2001). Esses plasmídeos foram digeridos com *EcoRI* e o tamanho dos insertos clonados foram estimados, após migração por eletroforese em gel de agarose 1%, com o auxílio do programa da câmara digital Kodak 1D Image Analysis Software®. Os fragmentos foram quantificados e enviados para o sequenciamento.

7.6 Sequenciamento

Os clones obtidos foram sequenciados no sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) do CPqAM. As reações de sequenciamento foram preparadas para um volume final de 10 μ L por tubo. A reação foi realizada com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguida de choque térmico, e amplificadas por pcr em um termociclador ABI Applied Biosystem®, programado para desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 45 segundos, pareamento a 50°C por 30 segundos e uma extensão a 60°C por 4 minutos. O DNA amplificado foi então precipitado utilizando isopropanol a 65% e depois lavado com etanol a 60%. Em seguida as amostras foram levadas para sequenciamento. Foram sequenciados no mínimo três clones de cada gene para cada cepa analisada.

7.6.1 Sequenciamento dos genes presentes na região RS2 do profago CTX ϕ

O sequenciamento da região gênica que contém os genes regulatórios do profago CTX ϕ (IgF-ace) foi realizada utilizando-se 12 *primers* (Tabela 4) internos ao fragmento clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega®), além dos *primers* universais do vetor, M13 *forward* e M13 *reverse* (Figura 11).

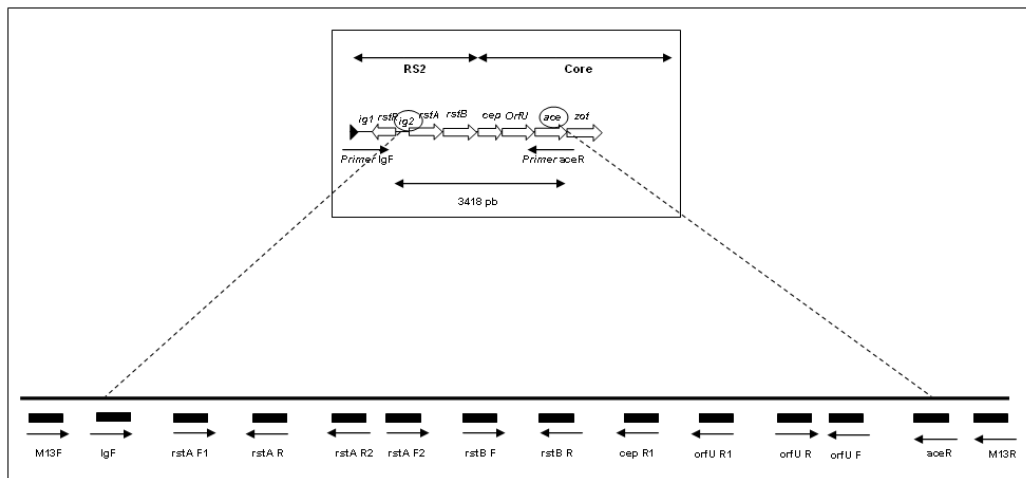


Figura 11: Esquema representativo da estratégia de sequenciamento da região IgF-ace

Fonte: Adaptado de NANDI et al. (2003).

‘

7.6.2 Sequenciamento dos genes presentes na região RS1 do profago CTX ϕ

O sequenciamento da região gênica que contém os genes regulatórios da região RS1 foi realizado utilizando-se oito *primers* (Tabela 4) internos ao fragmento clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega®), além dos *primers* universais do vetor, M13 *forward* e M13 *reverse* (Figura 12).

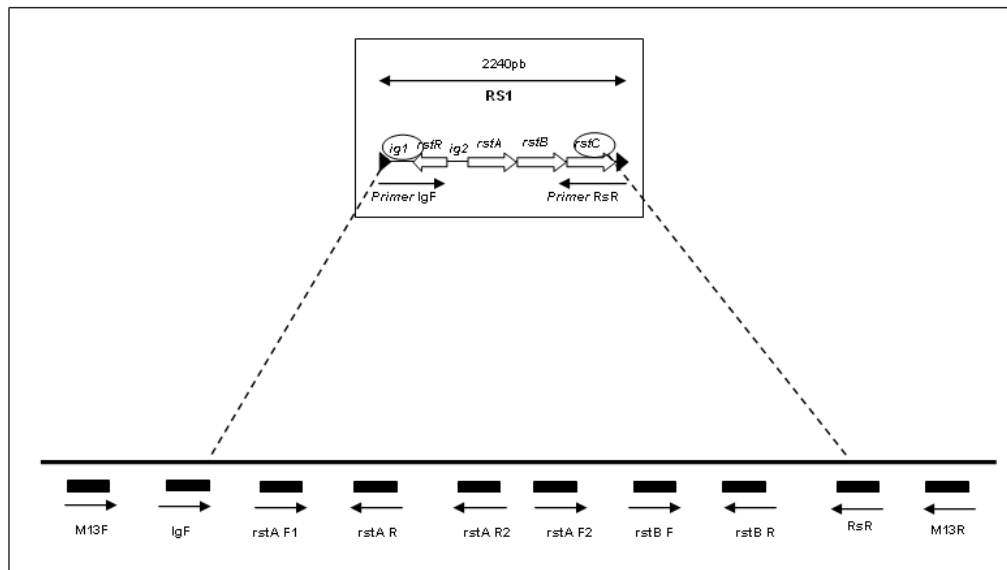


Figura 12: Esquema representativo da estratégia de sequenciamento da região RsR-IgF

Fonte: Adaptado de NANDI et al. (2003).

7.6.3 Sequenciamento do gene *tcpA*

O sequenciamento do gene *tcpA* foi realizado a partir de produto obtido por PCR utilizando-se *primers* externos (*tcpH1* e *tcpA4*) ao gene (Figura 6). O fragmento clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega®) foi sequenciado utilizando-se um *primer* interno além dos *primers* utilizados na amplificação (Tabela 4) e dos *primers* universais do vetor, M13 *forward* e M13 *reverse* (Figura 13).

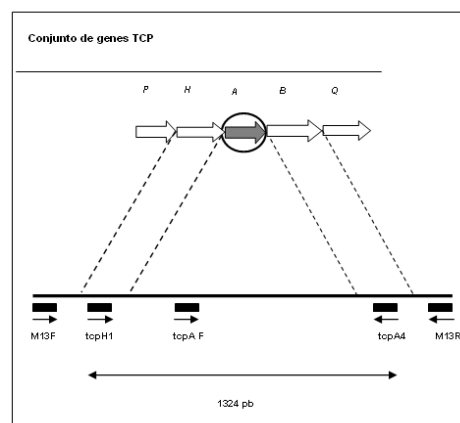


Figura 13: Esquema representativo da estratégia de sequenciamento do gene *tcpA*

Fonte: Elaborado pelo autor

7.6.4 Análise *in silico*

As sequências obtidas foram analisadas através dos programas SeqManTM e EditSeqTM (pacote de programas Lasergene®, version 4.01, DNASTAR Inc., Madison, WI), para avaliar o padrão de qualidade das sequências e montar as sequências contíguas. Foi analisada a similaridade das sequências obtidas com sequências de *V. cholerae*, depositadas no banco de dados do NCBI, através do programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL, S.F. *et al.*, 1997). Sequências depositadas no mesmo banco de dados foram utilizadas nas análises. Para a construção das árvores filogenéticas com os genes *rstR* e *tcpA* foi utilizado o método Neighbor-Joining, com um *bootstrap* de 1.000 replicatas no programa Mega 4 (TAMURA *et al.*, 2007).

8 RESULTADOS

8.1 Profago CTX ϕ

8.1.1 Amplificação de genes presentes na região central do profago CTX ϕ

Tabela 5 – Identificação dos genes presentes na região central do profago CTX ϕ

N° CPqAM	N° IOC	Sorogrupo	Região core do profago CTX ϕ					
			<i>cep</i>	<i>orfU</i>	<i>ace</i>	<i>zot</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>
149 / 01	4010	O26	+	+	+	+	+	+
151 / 01	4756	O26	+	+	+	+	+	+
168 / 01	17155	Não tipável	+	+	+	+	+	+
180 / 01	3340	O26	+	+	+	+	+	+
181 / 01	6958	O26	+	+	+	+	+	+
183 / 01	11159	O26	+	+	+	+	+	+
184 / 01	13151	O26	+	+	+	+	+	+
267 / 01	2494	O26	+	+	+	+	+	+
143 / 01	1717	O26	+	-	+	+	-	-
145 / 01	3647	O26	+	+	-	-	-	-
165 / 01	15677	O26	-	+	+	+	-	-
182 / 01	10626	O26	+	+	+	+	-	-
269 / 01	11043	O26	+	+	+	+	-	-
270 / 01	13663	O26	+	-	+	+	-	-
271 / 01	16352	O26	-	+	+	-	-	-

Sete cepas de *V. cholerae* O26 (Cepas 149, 151, 180, 181, 183, 184, 267) e uma cepa não tipável (Cepa 168) possuem o profago CTX ϕ completo, devido à presença dos genes *cep*, *orfU*, *ace* e *zot* e dos genes *ctxA* e *ctxB*, codificadores da toxina colérica (Tabela 5). As demais cepas (143, 145, 165, 182, 269, 270, 271), são classificadas como pré-CTX, devido à ausência genes codificadores da CT (BOYD; HEILPERN; WALDOR, 2000).

8.1.2 Amplificação de genes presentes na região RS2 do profago CTX ϕ

A amplificação da região contendo os genes regulatórios do profago CTX ϕ , mostrou variação no tamanho dos fragmentos amplificados, tanto entre as cepas de *V. cholerae* O26 pré-CTX (Figura 14), quanto entre as cepas que possuem o profago CTX ϕ completo (Figura 15). O tamanho do fragmento amplificado nas cepas de *V. cholerae* O1 corresponde a 3418pb. Fragmentos dos genes *rstA*, *rstB* e *rstR* foram identificados por sequenciamento nas cepas 151, 168, 180, 183, 184, 267.

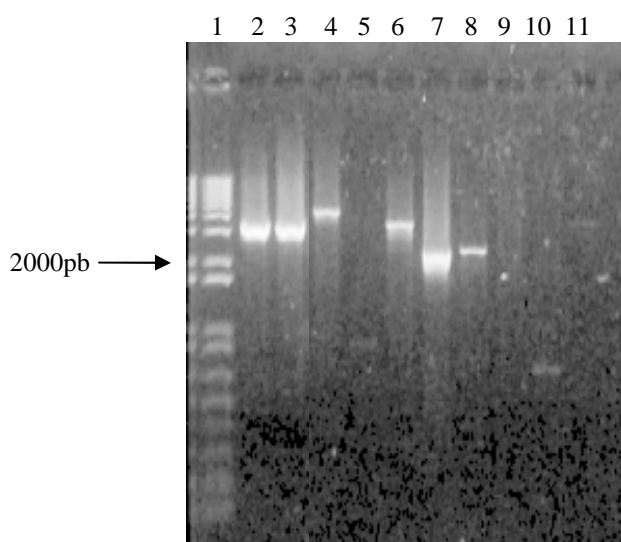


Figura 14: Amplificação da região gênica IgF-ace em cepas de *V. cholerae* O26 pré-CTX. Linhas: 01 – Marcador de peso molecular Ladder 1Kb plus; 2 – 569B (Controle *V. cholerae* O1 clássico); 3 – 63 (Controle *V. cholerae* O1 El Tor); 4 – 143; 5 – 145; 6 – 165; 7 – 182; 8 – 269; 9 – 270; 10 – 271; 11 – Controle negativo da reação.

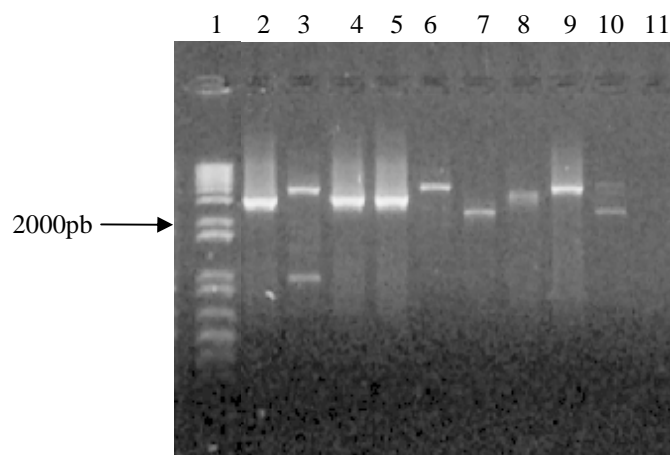


Figura 15: Amplificação da região gênica IgF-ace em cepas de *V. cholerae* O26 que possuem o profago CTX completo. Linhas: 01 – Marcador de peso molecular Ladder 1Kb plus; 2 – 569B (Controle *V. cholerae* O1 clássico); 3 – 149; 4 – 151; 5 – 168; 6 – 180; 7 – 181; 8 – 183; 9 – 184; 10 – 267; 11 – Controle negativo da reação.

8.1.3 Amplificação de genes presentes no elemento RS1

A amplificação da região contendo os genes regulatórios do elemento RS1 mostrou pequena variação no tamanho dos fragmentos amplificados, tanto entre as cepas de *V. cholerae* O26 pré-CTX (Figura 16, linhas 4, 5, 8, 12, 16, 17, 18), quanto entre as cepas que possuem o profago CTX ϕ completo (Figura 16, linhas 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15). Fragmentos dos genes *rstA*, *rstB*, *rstR* e *rstC* foram identificados por sequenciamento nas cepas 149, 151, 168, 180, 184, 267.

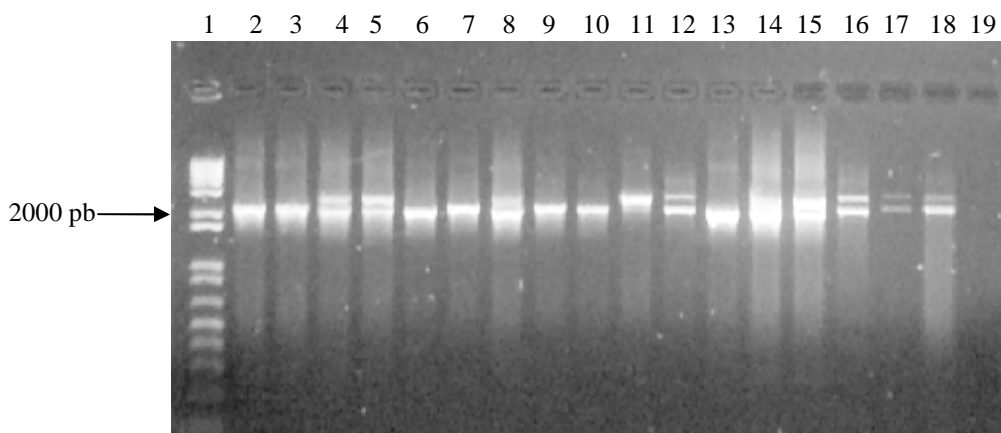


Figura 16: Amplificação da região gênica RsR-IgF. Linhas: 01 – Marcador de peso molecular Ladder 1Kb plus; 2 – 569B (Controle *V. cholerae* O1 clássico); 3 – 63 (Controle *V. cholerae* O1 El Tor); 4 – 143; 5 – 145; 6 – 149; 7 – 151; 8 – 165; 9 – 168; 10 – 180; 11 – 181; 12 – 182; 13 – 183; 14 – 184; 15 – 267; 16 – 269; 17 – 270; 18 – 271; 19 – Controle negativo da reação.

8.1.4 Sequenciamento do gene *rstR*

O sequenciamento do gene *rstR* realizado a partir da amplificação da região gênica RsR-IgF mostrou que o tipo de regulador presente nas cepas de *V. cholerae* O26 (cepas 149, 184 e 267) corresponde ao alelo *rstR*^{4**} (MUKHOPADHYAY et al., 2001), presente em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, visto que as sequencias do gene nessas cepas ficam agrupadas em um mesmo clado com sequencias do regulador presente em cepas não-O1/ não-O139. O alelo presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor, agrupado em um mesmo clado com a cepa de *V. cholerae* O1 El Tor N16961 (Figura 17).

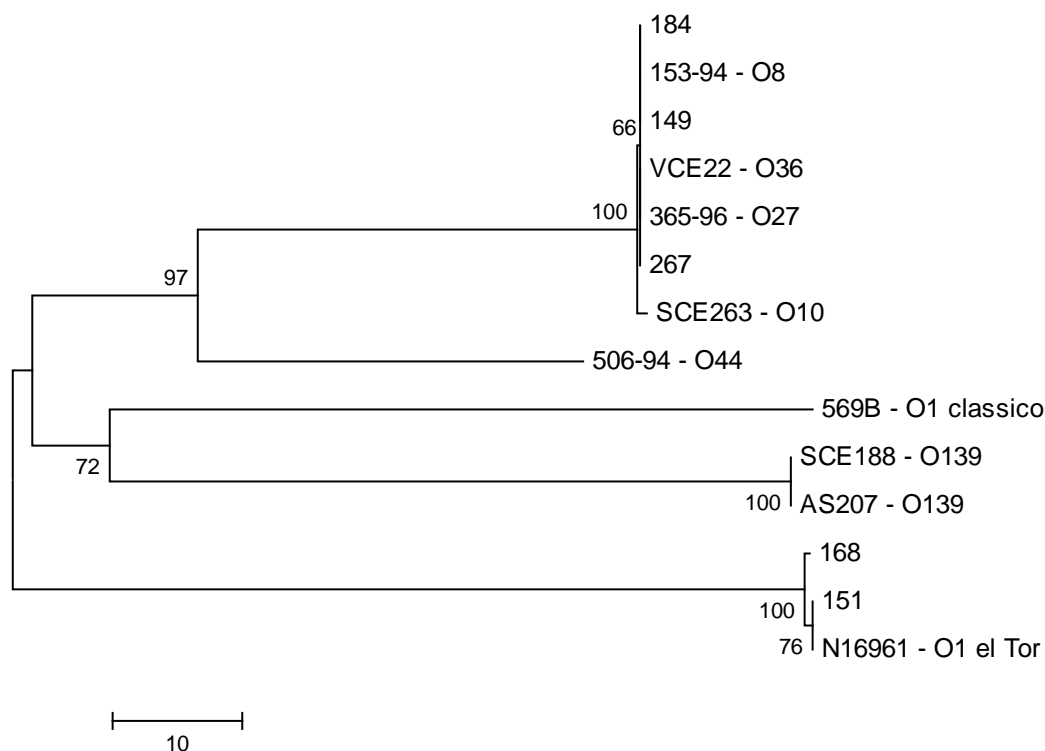


Figura 17: Árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene *rstR*, no programa Mega 4. Foi adotado o método Neighbor-Joining com um *bootstrap* de 1.000 replicatas. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os diferentes sorogrupos de *V. cholerae*. Os números sobre os ramos verticais indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap*, na qual as ramificações foram observadas. Número de acesso das seqüências disponíveis no NCBI das cepas 153-94, SCE263, 365-96, VCE22, 506-94, AS207, SCE188, N16961 e 569B são respectivamente, AF452585, AF133309, AF390570, AY145124, AF452586, AF110029, AF133310, AE004224 e AF055890.

8.2 Ilha de patogenicidade de *Vibrio*

8.2.1 Amplificação de genes presentes na VPI

Tabela 6 – Identificação de genes presentes na ilha de patogenicidade de *Vibrio*

Amostra	Genes																					
	TAG gene cluster					TCP gene cluster					ACF gene cluster											
Nº CPqAM	1	<i>aldA</i>	<i>tagA</i>	2	3	4	<i>tagD</i>	I	PHA	B	Q	C	RDS	T	E	<i>FtoxTJ</i>	B	CYE	A	D	<i>int</i>	
149 / 01		+	+																			+
151 / 01		+	+																			+
168 / 01		+	+																			+
180 / 01		+	+																			+
181 / 01		+	+																			+
183 / 01		+	+																			+
184 / 01		+	+																			+
267 / 01		+	+																			+
143 / 01		+	+																			+
145 / 01		+	+																			+
165 / 01		-	+																			+
182 / 01		+	+																			+
269 / 01		+	+																			+
270 / 01		-	+																			+
271 / 01		-	+																			+

A análise de genes presentes nos *clusters* TAG, TCP e ACF da VPI mostrou a presença da ilha de patogenicidade de *Vibrio* nas cepas analisadas (Tabela 6). Apesar de oito cepas possuírem o profago CTX ϕ completo e sete o profago incompleto (pré-CTX), somente em duas cepas foi detectado o gene *tcpA* utilizando-se *primers* para o alelo El Tor. Uma vez que o gene *tcpA* é o receptor celular do profago CTX ϕ a ausência na detecção do gene *tcpA* sugere a presença de um alelo variante nas cepas em questão.

Para elucidar essa questão foi realizada uma reação de amplificação utilizando *primers* externos ao gene *tcpA*, sendo observada amplificação de fragmento do tamanho esperado (1.324 pb) em todas as cepas (Figura 18).

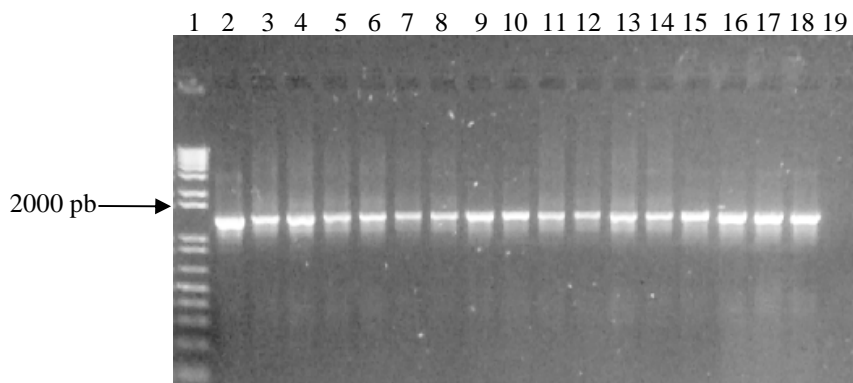


Figura 18: Amplificação da região externa ao gene *tcpA* utilizando os *primers* tcpA4-tcpH1. Linhas: 01 – Marcador de peso molecular Ladder 1Kb plus; 2 – 569B (Controle *V. cholerae* O1 clássico); 3 – 63 (Controle *V. cholerae* O1 El Tor); 4 – 143; 5 – 145; 6 – 149; 7 – 151; 8 – 165; 9 – 168; 10 – 180; 11 – 181; 12 – 182; 13 – 183; 14 – 184; 15 – 267; 16 – 269; 17 – 270; 18 – 271; 19 – Controle negativo da reação.

8.2.2 Sequenciamento do gene *tcpA*

O sequenciamento do gene *tcpA* mostrou que o alelo presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor, visto que os alelos presentes nessas cepas agrupam em uma mesmo clado com alelo do gene *tcpA* de *V. cholerae* El Tor da cepa N16961. Já as sequências das demais cepas agrupam em uma mesmo clado com sequências do gene *tcpA* presente em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 depositadas no banco de dados do NCBI. (Figura 19). Esse alelo corresponde a uma variante do gene presente em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, denominado *tcpA-env* (MUKHOPADHYAY et al., 2001). Alinhamento evidenciando a região de pareamento do *primer* tcpA El Tor *reverse* mostra extensa variação na sequência de nucleotídeos, o que inviabiliza a ligação do *primer* e amplificação da sequência, justificando a ausência de amplificação do gene *tcpA* nas cepas de *V. cholerae* O26 (Figura 20).

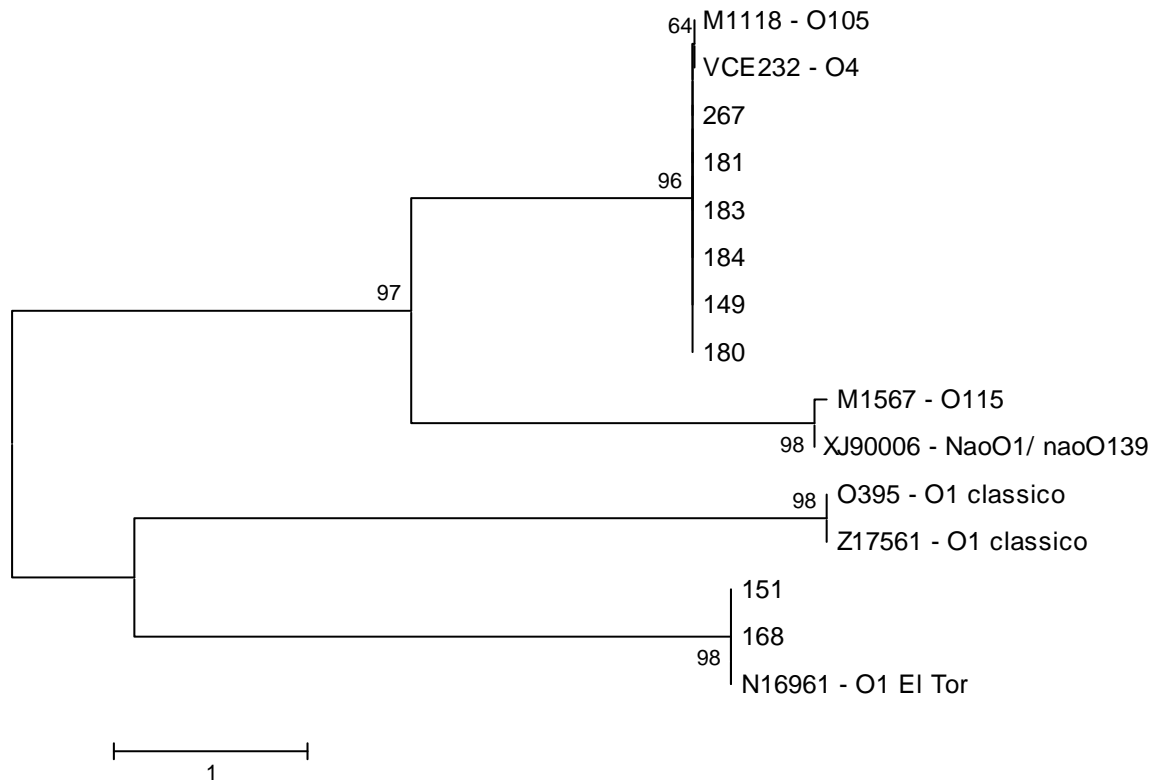


Figura 19: Árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene *tcpA* no programa Mega 4. Foi adotado o método Neighbor-Joining com um *bootstrap* de 1.000 replicatas. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os diferentes sorogrupos de *V. cholerae*. Os números sobre os ramos verticais indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap*, na qual as ramificações foram observadas. Os números de acesso das seqüências depositadas no NCBI das cepas M1118, VCE232, XJ90006, M1567, N16961, Z17561 e O395 são respectivamente, FJ209005, DQ124668, AY056619, FJ209007, AF325734, X64098, CP000627.

Sequence Name	< Pos = 363
<input checked="" type="checkbox"/> Consensus	GGCGATATGTTCCCATATATTAATGTTTCAGCAAAAAGCCT-CAATGCCACTAGCTGACCTTGGTGAC
9 Sequences	370 380 390 400 410 420 4
tcpA4H1 01	GGGGATATGTTCCATTTATCAACGTGAAAGAAGGTGCTTTTCGCTGCTGTC-GCTGATCTTGGTGAT
tcpA4H1 149	GGCGATATGTTCCCATATATTAATGTTTCAGCAAAAAGCCT-CAATGCCACTAGCTGACCTTGGTGAC
tcpA4H1 151	GGGGATATGTTCCATTTATCAACGTGAAAGAAGGTGCTTTTCGCTGCTGTC-GCTGATCTTGGTGAT
tcpA4H1 168	GGGGATATGTTCCATTTATCAACGTGAAAGAAGGTGCTTTTCGCTGCTGTC-GCTGATCTTGGTGAT
tcpA4H1 180	GGCGATATGTTCCCATATATTAATGTTTCAGCAAAAAGCCT-CAATGCCACTAGCTGACCTTGGTGAC
tcpA4H1 181	GGCGATATGTTCCCATATATTAATGTTTCAGCAAAAAGCCT-CAATGCCACTAGCTGACCTTGGTGAC
tcpA4H1 183	GGCGATATGTTCCCATATATTAATGTTTCAGCAAAAAGCCT-CAATGCCACTAGCTGACCTTGGTGAC
tcpA4H1 184	GGCGATATGTTCCCATATATTAATGTTTCAGCAAAAAGCCT-CAATGCCACTAGCTGACCTTGGTGAC
tcpA4H1 267	GGCGATATGTTCCCATATATTAATGTTTCAGCAAAAAGCCT-CAATGCCACTAGCTGACCTTGGTGAC

Figura 20: Alinhamento da seqüência do gene *tcpA* na região de pareamento do *primer* tcpA R El Tor evidenciando as alterações nas seqüências de nucleotídeos das cepas nas quais o fragmento gênico não foi amplificado.

9 DISCUSSÃO

A cólera ainda acomete um grande número de indivíduos em todo o mundo, fato confirmado pelo número de casos da doença notificados a Organização Mundial da Saúde em 2007, que registrou um total de 177.963 casos, incluindo 4.031 mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008). Muitas tentativas têm sido introduzidas com o propósito de controlar a doença, incluindo a utilização de vacinas. No entanto, as atualmente disponíveis não conferem imunidade duradoura (em média 10 semanas), e muitas vezes não são eficazes em indivíduos que vivem em regiões não-endêmicas, justamente os mais susceptíveis a formas graves da cólera (HILL et al., 2006). Assim, a utilização de vacinas não pode ser vista como uma boa estratégia para a erradicação da doença. Além disso, uma vez que a cólera está diretamente relacionada a existência de precárias condições 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 da doença.

No Brasil, após o término da epidemia que teve início em 1991, foram adotados o monitoramento e a investigação epidemiológica como principais ferramentas para o controle de incidência e disseminação da cólera (BRASIL, 2005a), sendo realizados pela Vigilância Ambiental da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES-PE), que continua isolando cepas de *V. cholerae* toxigênicas. Atualmente a monitorização das doenças Diarréicas Agudas – MDDA, implantada em 4.227 municípios do país, representa a mais importante estratégia para detecção precoce de casos de cólera (BRASIL, 2006). No entanto, a ocorrência de casos assintomáticos ocasionados pela cólera causada pelo biotipo El Tor ainda representa importante papel na cadeia de transmissão da doença, visto que esses pacientes não são detectados pelo sistema de saúde e permanecem eliminando o vibrião, favorecendo a disseminação da doença. Assim, estudos que esclareçam o potencial epidêmico de cepas de *V. cholerae* isoladas de casos clínicos ou do ambiente serão úteis como instrumento epidemiológico para a monitorização de possíveis surtos.

Cepas toxigênicas de *V. cholerae* dos sorogrupos O1 e O139 são as responsáveis pela cólera epidêmica. Cepas de outros sorogrupos, denominados não-O1/ não-O139, são implicados como agentes etiológicos de moderadas gastroenterites em humanos e constituem parte da flora normal de ambientes aquáticos (FARUQUE; ALBERT; MEKALANOS, 1998; SACK et al., 2004).

Cepas patogênicas de *V. cholerae* evoluem a partir de cepas ambientais não patogênicas, e a transferência horizontal de genes de virulência tem um papel importante nesse processo (FARUQUE et al., 1998b, FARUQUE; MEKALANOS, 2003). No caminho de eventos evolucionários que originam cepas patogênicas a partir de progenitores não patogênicos, é importante identificar cepas intermediárias que provavelmente carregam alguns genes relacionados à virulência, mas não possuem o conjunto completo de genes requerido para a patogênese e disseminação de epidemias (RAHMAN et al., 2008). Ocasionalmente cepas ambientais de sorogrupos não-O1/ não-O139 carregam um ou mais genes de virulência ou seus homólogos (FARUQUE et al., 2004; MUKHOPADHYAY et al., 2001). Entretanto a real prevalência de genes associados à virulência em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 não está bem estabelecida até o presente momento (RAHMAN et al., 2008).

Compreender a evolução de bactérias patogênicas a partir de precursores não patogênicos é um desafio. Nesse contexto, *V. cholerae* toxigênico representa um paradigma para esse processo no qual esse organismo evolui de cepas ambientais não patogênicas através da aquisição de genes de virulência. O ambiente aquático em áreas de cólera endêmica possui cepas com vários conjuntos de genes de virulência, constituindo um reservatório desses genes (CHAKRABORTY et al., 2000). Fatores ecológicos provavelmente favorecem interações mediadas por fagos entre cepas de *V. cholerae* e elementos genéticos móveis (FARUQUE; MEKALANOS, 2003), assim como a seleção de clones patogênicos leva a recombinação de genes requeridos para a emergência de cepas patogênicas (RAHMAN et al., 2008).

Não está claro o que determina a emergência de cepas patogênicas com determinado fago CTX ϕ ou tipo de gene *tcpA*, mas recentes estudos começam a revelar a presença de combinações não convencionais de alelos de genes de virulência em cepas clínicas de *V. cholerae* (ANSARUZZAMAN et al., 2004; NAIR et al., 2002). Presume-se que a diversidade de genes de virulência, por exemplo, diferentes alelos de *tcpA*, ou diferentes fagos CTX ϕ dispersos entre cepas ambientais contribui para esse processo (RAHMAN et al., 2008). Apesar de *V. cholerae* ser autóctone do ambiente aquático, acredita-se que a aquisição de genes de virulência, incluindo VPI e o profago CTX ϕ permita que cepas específicas tornem-se adaptadas ao ambiente do intestino humano (FARUQUE; ALBERT; MEKALANOS, 1998).

Entre 179 amostras de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 isoladas durante a epidemia de cólera ocorrida no Brasil somente em cepas do sorogrupo O26 foi detectado o gene *ctxA*, codificador da principal subunidade da toxina colérica (THEOPHILO et al., 2006). Além disso, apesar de em todas as cepas do sorogrupo O26 terem sido encontrados genes de

virulência presentes no profago CTX ϕ , o gene *tcpA* não foi evidenciado em todas as cepas. Visto que esse gene codifica o receptor para a entrada do profago em novas cepas, esse fato poderia sugerir a aquisição do profago por um mecanismo alternativo, ou a presença de um alelo variante do gene *tcpA*. Outra questão intrigante com relação a essas cepas era o fato de apesar de possuírem o gene que codifica a toxina colérica, a proteína não era detectada pelos métodos tradicionais (ELISA e Ouchterlony). Análises posteriores realizadas por Cariri et al. (2009) mostraram que das 14 cepas analisadas duas eram capazes de expressar a toxina colérica, quando submetidas a condições especiais de cultivo (cepas 151 e 168), e que essas cepas são filogeneticamente do sorogrupo O1, segundo análise do operon ribossomal. Desta forma acredita-se que ocorreu um evento de conversão sorológica, no qual uma cepa originalmente do sorogrupo O1 tornou-se do sorogrupo O26 (151) e a outra se mostrou em uma forma não tipável (168). Desta forma, as análises realizadas nesse estudo visaram identificar o conjunto de genes de virulência presentes nessas cepas e estabelecer a relação filogenética entre as cepas de *V. cholerae* O26 e cepas epidêmicas de *V. cholerae*.

Análise dos genes presentes no profago CTX ϕ mostrou que sete cepas de *V. cholerae* O26 (Cepas 149, 151, 180, 181, 183, 184, 267) e uma cepa não tipável (Cepa 168) possuem o profago CTX ϕ completo, devido à presença dos genes *cep*, *orfU*, *ace* e *zot*, e dos genes *ctxA* e *ctxB*, codificadores da toxina colérica. As demais cepas (143, 145, 165, 182, 269, 270, 271), são classificadas como pré-CTX, pela ausência dos genes codificadores da CT (BOYD; HEILPERN; WALDOR, 2000). Além dos genes presentes na região central do profago CTX ϕ , as cepas de *V. cholerae* O26 também apresentaram amplificação de regiões gênicas correspondentes ao elemento RS2 do profago CTX ϕ (que compreende os genes *rstA*, *rstB* e *rstR*) e do elemento RS1 (genes *rstA*, *rstB*, *rstR* e *rstC*), também descrito como fago filamentoso que pode se propagar horizontalmente entre cepas de *V. cholerae* (FARUQUE et al., 2002b).

O sequenciamento do gene *rstR* presente no profago CTX ϕ das cepas de *V. cholerae* O26 corresponde ao alelo *rstR*^{4*}, presente em cepas ambientais de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, visto que os alelos presentes nessas cepas agrupam com alelos do gene *rstR* de diversos sorogrupos depositados no banco de dados do NCBI. O profago contendo esse tipo de alelo é denominado CTX ϕ ^{ENV} (MUKHOPADHYAY et al., 2001). Já o gene *rstR* presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor, sendo o profago CTX ϕ ^{ET}. Apesar de não terem sido obtidas sequências correspondentes a todas as cepas acreditamos que os resultados podem ser extrapolados para as demais, devido as características similares existentes entre elas.

Foi observada amplificação nos três principais conjuntos de genes da VPI, os *clusters* TAG, TCP e ACF, confirmando assim a presença da Ilha de Patogenicidade nas cepas em estudo. Todas as cepas que possuem o profago CTX ϕ completo apresentaram amplificação dos genes *aldA* e *tagA*, presentes no *cluster* TAG, do gene *int*, presente no *cluster* ACF e dos genes *tcpP-tcpH* presentes no *cluster* TCP. O gene *tcpA* só foi amplificado nas cepas 151 e 168. No entanto, com *primers* externos ao gene, foi observada amplificação de fragmento de tamanho esperado (1.324 pb) em todas as cepas, sugerindo a existência de uma variante do gene nas cepas em questão.

O sequenciamento do gene *tcpA* mostrou que o alelo presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor, visto que os alelos presentes nessas cepas agrupam com alelos do gene *tcpA* de *V. cholerae* El Tor de seqüências depositadas no banco de dados do NCBI. Já as seqüências das demais cepas correspondem a uma variante do gene presente em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, denominado *tcpA-env* (MUKHOPADHYAY et al., 2001). Alinhamento evidenciando a região de pareamento do *primer* *tcpA* El Tor *reverse* mostra extensa variação na seqüência de nucleotídeos, o que inviabiliza a ligação do *primer* e amplificação da seqüência, justificando a ausência de amplificação do gene *tcpA* El Tor nas cepas de *V. cholerae* O26.

A diversidade entre várias proteínas *TcpA* e *pilus* relacionados sugere que essa diversidade pode ser adaptativa. Esse grau de polimorfismo reflete produtos gênicos que são sujeitos à seleção na adaptação a diferentes sistemas no hospedeiro, ou a vários aspectos no ambiente (LI et al., 1995; BLANK et al., 2000). A diversidade pode refletir, por exemplo, em seleção natural para a evasão imune durante a infecção, susceptibilidade a fagos ou resistência ao ambiente, e aderência a hospedeiros aquáticos ou sítios abióticos (BLANK et al., 2000; KIRN et al., 2000). De fato nesse estudo podemos observar que o tipo de profago presente nas cepas que possuem o gene *tcpA* El Tor, corresponde ao profago CTX ϕ ^{ET}, e nas que possuem o gene *tcpA-env* ao profago CTX ϕ ^{ENV}, sugerindo que a aquisição de um tipo característico de profago CTX ϕ está diretamente relacionado ao tipo de *tcpA* presente na cepa.

Essa hipótese pode ser reforçada pelo mecanismo de origem de cepas epidêmicas de *V. cholerae* O1 dos biótipos clássico e El Tor. As cepas originalmente divergiram de um progenitor não patogênico (sorogrupo O1) que não possuía nem VPI nem CTX ϕ e adquiriram a VPI e o profago CTX ϕ clássicos e El Tor independentemente (BOYD; HEILPERN; WALDOR, 2000), uma vez que foi demonstrado que TCP é o receptor para CTX ϕ , em um modelo seqüencial para a origem de cepas virulentas de *V. cholerae* (FARUQUE; ALBERT;

MEKALANOS, 1998). Assim, no primeiro passo, a VPI é horizontalmente adquirida por uma cepa não toxigênica, e o TCP produzido serve como receptor para o profago CTX ϕ , que é adquirido em um segundo passo.

Por outro lado acredita-se que os fagos pré-CTX evoluem independentemente, sendo os genes *ctxAB* subsequentemente adquiridos por eventos de transferência horizontal (LI et al., 2002). Como nem a CT nem os genes estruturais parecem afetar as funções do profago CTX ϕ e o conteúdo GC dos genes *ctxAB* diferem da maioria dos outros genes do profago, acredita-se que os genes possam ser adquiridos por uma cepa pré-CTX que careça desses genes (BOYD; HEILPERN; WALDOR, 2000). Como a região 3' do gene *zot* também é significativamente diferente da sequência dos demais genes do profago CTX ϕ , esse ponto corresponderia a região de inserção dos genes *ctxAB*. Assim é mais provável que os profagos pré-CTX ϕ correspondam a um profago que nunca teve os genes *ctxAB* do que um que tenha perdido os genes. No entanto a origem de *ctxAB* e o mecanismo para a aquisição por um pré-CTX ϕ não são claros (BOYD; HEILPERN; WALDOR, 2000).

Relatamos nesse trabalho a existência de cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 isoladas no Brasil possuidoras de todo o conjunto de genes de virulência presentes nos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae*. Assim, chamamos atenção para a forma como é realizado o método tradicional de diagnóstico da cólera no Brasil, que utiliza como critério de triagem apenas a reação de soroaglutinação das cepas isoladas. Durante a epidemia de cólera e nesse momento pós-epidemia, cepas dos sorogrupos não-O1/ não-O139 são geralmente descartadas nos diagnósticos laboratoriais como possíveis fontes de epidemias. Cepas de *V. cholerae* potencialmente toxigênicas podem assim, não ser detectadas pelos serviços de diagnóstico da cólera.

Nesta fase atual, em que a doença encontra-se sob controle no país, é importante intensificar estudos que permitam a precoce detecção da presença do *V. cholerae* toxigênico, bem como avaliar as características genéticas das cepas eventualmente encontradas. Assim recomenda-se que além dos testes de triagem tradicionais, indispensáveis para a classificação do *V. cholerae*, sejam realizados métodos moleculares complementares (MENDES; ABATH; LEAL, 2008) que permitam a identificação de cepas carreando genes de virulência. Para alcançar tal objetivo faz-se importante realizar o mapeamento e pesquisa de ambientes reconhecidamente favoráveis à sobrevivência do *V. cholerae*, além do aprofundamento de estudos acerca do comportamento do microrganismo frente a alterações ambientais.

10 CONCLUSÕES

- a) Nas 15 cepas analisadas sete do sorogrupo O26 e uma não tipável possuem o profago CTX ϕ completo e sete cepas de *V. cholerae* O26 possuem o profago incompleto (pré-CTX).
- b) O tipo de alelo do gene *rstR* presente na maioria das cepas de *V. cholerae* O26 corresponde ao alelo *rstR*^{4**} presente em cepas ambientais não-O1/ não-O139. O alelo presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor.
- c) O tipo de alelo do gene *tcpA* presente nas cepas de *V. cholerae* O26 corresponde ao alelo *tcpA-env* presente em cepas ambientais não-O1/ não-O139. Nas cepas 151 e 168 foi identificado o alelo El Tor.
- d) Há especificidade entre o tipo de alelo do gene *tcpA* presente na cepa e o tipo de profago CTX ϕ que ela alberga.
- e) Apesar das cepas 151 e 168 serem classificadas sorologicamente como O26 e não tipável são filogeneticamente mais próximas do *V. cholerae* O1 El Tor
- f) Cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 isoladas no Brasil possuem todo o conjunto de genes de virulência presentes nos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae* e são negligenciadas no diagnóstico tradicional da cólera.

REFERÊNCIAS

ALBERT, M. J. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.32, p.2345-2349, 1994.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, London, v. 25, n. 17, p.3389-3402, 1997.

ANSARUZZAMAN, M. et al. Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae* . **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 10, p. 2057-2059, 2004.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocol in molecular biology**. New York: Wiley, 1987.

BARUA, D. History of cholera. In: BARUA, D.; GREENOUGH III, W.B. (ed.) **Cholera**. New York: Plenum Medical Book, 1992, p.1-36.

BHATTACHARYA, S. K., et al. Clinical profile of acute diarrhea cases infected with the new epidemic strain of *Vibrio cholerae* O139: designation of the disease as cholera. **Journal of infection**, London, v. 27, n. 1, p. 11-15, 1993.

BLACKSTONE, G. M., et al. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay, **Journal of microbiological methods**, Netherlands, v. 68, p.254–259, 2007.

BLANK, T. E. et al. Molecular variation among type IV pilin (*bfpA*) genes from diverse enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infection and immunity**, Washington, v. 68, p. 7028-7038, 2000.

BOYD, E. F., HEILPERN, A. J., WALDOR, M. K. Molecular analysis of a putative CTX ϕ precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX ϕ by toxigenic *Vibrio cholerae*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 182, p. 5530–5538, 2000.

BOYD, E. F. et al. Infectious CTX ϕ and the vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. **Infection and immunity**, Washington, v.68, n.3, p.1507-13, 2000.

BOYD, E. F., WALDOR, M. W. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 serogroup isolates. **Microbiology**, Reading, v.148, p. 1655-1666, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Subcomissão Nacional de Diagnóstico laboratorial. **Cólera: manual de diagnóstico laboratorial**, Brasília, DF, 1992, V. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ficha de qualificação de indicadores e da dos básicos - IDB 2000** - Taxa de incidência de cólera. Brasília, DF, 2000. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/IDB2000/fqd02_3.htm>. Acesso em: 24 jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica - Cólera**, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, DF, 2005a, v. 1, p. 187-208.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Notas técnicas - Nota técnica - 28/02/2005. Cólera em Pernambuco**, Brasília, DF, 2005b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22045>. Acesso em: 27 mar 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmissíveis - Cólera**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/SAUDE/visualizar_texto.cfm?idtxt=21929>, acesso em: 18 jul 2006.

BROWN, R. C., TAYLOR, R. K. Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 425-439, 1995.

CARIRI, F. M. O. et al. Characterization of potential virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. **Clinical microbiology and infectious diseases**, Marseille, 2009. No prelo.

CHAKRABORTY, S. et al. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 66, p. 4022-4028, 2000.

CLEMENS, J. D. et al. ABO blood groups and cholera: new observations on specificity of risk and modification of vaccine efficacy. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 159, n. 4 p. 770-773, 1989.

DAALSGAARD, 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**, Washington, v. 39, n. 11, p. 4086-4092, 2001.

DAVIS, B. M. et al. The *Vibrio cholerae* O139 Calcutta bacteriophage CTX ϕ is infectious and encodes a novel repressor. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 181, p. 6779-6787, 1999.

DAVIS, B. M., WALDOR, M. K. CTX ϕ contains a hybrid genome derived from tandemly integrated elements. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of América**, Washington, v. 97, n. 15, p. 8572-8577, 2000.

DIRITA, V. J. et al. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 12, p. 5403-5407, 1991.

FARUQUE, S. M., ALBERT, M. J., MEKALANOS, J. J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington v.62, p. 1301-1314, 1998.

FARUQUE, S. M. et al. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTX ϕ : molecular basis for the origination of new strains with epidemic potential. **Infection and immunity**, Washington, v. 66, p. 5819-5825, 1998b.

FARUQUE, S. M. et al. Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 3, p. 1304-1309, 2002a.

FARUQUE, S.M. et al. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera epidemic area. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, p.2123-2128, 2004.

FARUQUE, S. M. et al. Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Infection and immunity**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3752-3757, 1998a.

FARUQUE, S. M. et al. RS1 element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTX ϕ . **Infection and immunity**, v.70, n. 1, p. 163-170, 2002b.

FARUQUE, S. M. et al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with prevalence of environmental cholera phages. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 5, p. 1702-1707, 2005a.

FARUQUE, S. M. et al. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host-mediated amplification of phage. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 17, p. 6119-6124, 2005b.

FARUQUE, S. M. et al. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilmes and their relationship to infectivity and persistence in the environment. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 16, p. 6350-6355, 2006.

FARUQUE, S. M., MEKALANOS, J. J. Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 11, n. 11, p. 505-510, 2003.

FARUQUE, S. M., NAIR, G. B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiology and immunology**, Tokyo, v. 46, n. 2, p. 59-66, 2002.

FASANO, A. et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 5242-46, 1991.

FINELLI, L. et al. Outbreak of cholera associated with crab brought from an area with epidemic disease. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 166, p. 1433-1435, 1992.

GEROLOMO, M., PENNA, M. L. F. Os primeiros cinco anos da sétima pandemia de cólera no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 49-58, 1999.

GLASS, R. I. et al. Predisposition for cholera of individuals with O blood group. Possible evolutionary significance. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v. 121, p. 791-796, 1985.

GLASS, R. I. et al. Cholera in Africa: lessons on transmission and control for Latin America. **Lancet**, London, v. 338, n. 8770, p. 791-795, 1991.

GONÇALVES, E. G. R. et al. Associação de *Vibrio cholerae* com o zooplâncton de águas estuarinas da Baía de São Marcos/São Luís, MA. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, Brasília, v. 37, p. 318-323, 2004.

GONÇALVES, E. G. R., HOFER, E. Cólera. In: Coura, J.R.; Guanabara Koogan S.A (ed.) **Dinâmica das doenças infecciosas**. Rio de Janeiro, cap. 114, p.1367-1373, 2005.

GUTHMANN, J. Epidemic Cholera in Latin America: Spread and Routes of Transmission. **Journal of tropical medicine and hygiene**, London, v. 98, p. 419-427, 1995.

HEIDELBERG, J. F. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, London, v. 406, p. 477-484, 2000.

HILL, D. R. Oral cholerae vaccines: use in clinical practice. **The lancet infectious diseases**, London, v. 6, p. 361-373, 2006.

HOFER, E. et al. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica em São Bento do Una, Pernambuco. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, Brasília, v.39, n. 2, p. 217-220, 2006.

HUQ, A. et al. Ecological relationship between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. **Applied and environmental microbiology**, Washington v. 45, p. 275-283, 1983.

KAPER, J. B., MORRIS, JR., J. G., LEVINE, M. M. Cholera. Review. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.8, p. 48-86, 1995.

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**, Washington, v.95, p.3134-3139, 1998.

KARAOLIS, D. K. R. et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. **Nature**, London v. 399, p. 375-379, 1999.

KARAOLIS, D. K. R. et al. Comparison of *Vibrio pathogenicity island* in sixth and seventh pandemic strains. **Infection and immunity**, Washington, v.69, p.1947-1952, 2001.

KEASLER, S. P., HALL, R. H. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. **Lancet**, London, v. 341, n. 8861, p. 1661, 1993.

KIMSEY, H. H. et al. Diverse CTX ϕ and evolution of new pathogenic *Vibrio cholerae*. **Lancet**, London, v. 352, p.457-458, 1998.

KIRN, T. J. et al. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. **Molecular microbiology**, Oxford, v.35, p. 896-910, 2000.

KOVACH, M. E., SHAFFER, M. D., PETERSON, K. M. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. **Microbiology**, Reading, v. 42, p.2165-74, 1996.

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**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 447-54, 2004.

LEAL, N. C. et al. Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from the aquatic basins of the State of Pernambuco, Brazil. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, London, v. 102, p. 272-276, 2008.

LI, J. et al. Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 7252-7256, 1995.

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**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2441-2453, 2002.

LI, M., et al. Comparative genomic analysis of the *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic serogroup strains of *Vibrio cholerae*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 69, p.1728-1738, 2003.

MANNING, P. A. The *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae*. **Gene**, Amsterdam, v.192, n.1, p.63-70, 1997.

MEKALANOS, J. J., et al. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. **Nature**, London, v. 306, n.5943, p.551-7, 1983.

MENDES, C. L., ABATH, F. G. C., LEAL, N. C. Development of a multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 72, p. 191-196, 2008.

MOOI, F. R., BIK, E. M. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 5. n. 4, p. 161-165, 1997.

MORRIS JR, J. G. et al. Clinical and immunologic characteristics of *Vibrio cholerae* O139 Bengal infection in north american volunteers. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 171, n. 4, p. 903-908, 1995.

MUJICA, O. J. et al. Epidemic cholera in the Amazon: the role of produce in disease risk and prevention. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 169, p.1381-1384, 1994.

MUKHOPADHYAY, A. K. et al. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX ϕ prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 183, p. 4737–4746, 2001.

MUKHOPADHYAY, A. K. et al. Distribution and virulence of *Vibrio cholerae* belonging to serogroups other than O1 and O139: a nationwide survey. **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 114, p. 65-70, 1995.

NAIR, G. B. et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 40, p. 3296-3299, 2002.

NAIR, G. B. et al. Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in Índia. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 169, p. 1029-1034, 1994.

NANDI, S. et al. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype EL Tor: role of the CTX ϕ array and its position in the genome. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 89- 97, 2003.

NITRINI, D. R. et al. Cólera. In: VERONESI, R.; FOCCAIA, R. (Ed.). **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997. Cap. 46, p. 585-602.

NUSRIN, S. et al. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholera is endemic in Bangladesh. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 42, n.12, p. 5854-5856, 2004.

NYS department of health. Risk analysis - Drinking water disinfection. **Environmental Science**, Wadsworth, 2007. Disponível em:(<http://www.wadsworth.org/databank/vibrio.htm>), acesso em 22 nov. 2008.

PEARSON, G. D. N. et al. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 3750-3754, 1993.

RAHMAN, M. H. et al. Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholerae* population in cholera endemic area: tracking the evolution of pathogenic strains. **DNA and cell biology**, New York, v. 27, n. 7, p 347-355, 2008.

RUMMENS, T. **Cholera toxin: mechanism of action**, Tehran, 2001. Disponível em: <<http://techno.msu.ac.th/fn/center/pathogens/images/anim-cholera.gif>>, acesso em: 20 nov 2008.

SACK, D. A. et al. Cholera. Review. **Lancet**, London v.363, n.9404, p. 223-233, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos e Água**. São Paulo, 2001. Disponível em: < http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_514COL.htm >, acesso em: 28 jan. 2008.

SARKAR, A. et al. *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of *Vibrio cholerae*. **Infection and immunity**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4735-4742, 2002.

SHAPIRO, R. L. et al. Transmission of epidemic *Vibrio cholerae* O1 in rural western Kenya associated with drinking water from lake Victoria: an environmental reservoir for cholera? **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 271-276, 1999.

SKORUPSKI, K., TAYLOR, R. K., Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 25, p. 1003-1009, 1997.

SWERDLOW, D. L., RIES, A. A. *Vibrio cholerae* non-O1 – the eighth pandemic? **Lancet**, London, v. 342, p. 382-383, 1993.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v. 24, p.1596-1599, 2007.

THEOPHILO, G. N. D. et al. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. **Revista do Instituto de medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 65-70, 2006.

TRUCKSIS, M. et al. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 5367-5271, 1993.

WALDOR, M. K. et al. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX ϕ are encoded by region RS2. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 24, p. 917-926, 1997.

WALDOR, M. K., MEKALANOS, J. J. Lysogenic conversion by a filamentous bacteriophage encoding cholera toxin. **Science**, Washington, v. 272, p. 1910-1914, 1996.

WOODWARD, W. E., MOSLEY, W. H. The spectrum of cholera in rural Bangladesh. II. Comparison of El-Tor Ogawa and Classical Inaba infection. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v. 96, n. 5, p. 342-351, 1972.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Water related diseases - Cholera**, Geneva, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/disease/cholera/en/print.html>, acesso em: 17 nov 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 80, n.31, p. 261-268, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 81, n.31, p. 297-308, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 82, n.31, p. 173- 184, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 83, n.31, p. 269- 284, 2008.

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

APÊNDICE

APÊNDICE A: Artigo científico

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PROFAGO CTX ϕ E DA ILHA DE PATOGENICIDADE DE *VIBRIO* EM CEPAS DE *V. CHOLERAE* O26 ISOLADAS NO BRASIL

**Ana Paula R Costa¹, Francisco A M O Cariri¹, Mariana L. Nunes¹, Camylla C de Melo¹,
Grace N D Theophilo², Ernesto Hofer², Osvaldo P de Melo Neto¹ and Nilma C Leal¹**

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Departamento de Microbiologia, Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE. Recife, PE, Brazil. 50670-420.

²Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Departamento de Bacteriologia, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. 21045-900.

Autor para correspondência: Nilma C Leal

e-mail: nilma@cpqam.fiocruz.br

Tel: 55 81 2101 2568

Fax: 55 81 2101 2516

Manuscrito a ser submetido para publicação na revista “Journal of Applied Microbiology”

RESUMO

Atualmente a cólera encontra-se sob controle no Brasil, no entanto, o risco de re-introdução continua presente tendo em vista que persistem as baixas coberturas de saneamento e o *V. cholerae* O1 continua sendo isolado de águas ambientais.. A partir da análise de 179 cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 isoladas durante a epidemia de cólera no Brasil (1991-2000) foram identificadas 14 cepas do sorogrupo O26 e uma cepa não tipável que possuíam genes de virulência. Identificamos entre as cepas o profago CTX ϕ completo e o pré-CTX. A ilha de patogenicidade também foi identificada entre as cepas. O sequenciamento dos genes *rstR* e *tcpA* mostrou que os alelos presentes nas cepas de *V. cholerae* O26 correspondem aos alelos *rstR*^{4**} e *tcpA-env*, encontrados em cepas ambientais de sorogrupos não-O1/ não-O139. No entanto, os alelos presentes nas cepas 151 e 168, classificadas anteriormente como O1 segundo análise do operon ribossomal, correspondem aos alelos El Tor. Assim concluímos que há correlação entre o tipo de gene *tcpA* e o profago CTX ϕ presente na cepa. Além disso, identificamos cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 isoladas no Brasil possuidoras de todo o conjunto de genes de virulência presentes nos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae*.

Palavras-chaves: Cólera, *Vibrio cholerae* não-O1/ não-O139, Profago CTX ϕ , Ilha de patogenicidade de *Vibrio*. (De 05 a 08)

INTRODUÇÃO

A patogenicidade de *V. cholerae*, em nível molecular, envolve genes que codificam diferentes proteínas que atuam na colonização, na coordenação da expressão de diversos fatores e na ação tóxica (Sack et al., 2004). Análises genéticas revelaram a presença de dois importantes elementos, primariamente encontrados em cepas epidêmicas dos sorogrupos O1 e O139: o elemento genético CTX (Pearson et al., 1993) e a ilha de patogenicidade de *Vibrio* (VPI) (Karaolis et al., 1998). Estas duas regiões constituem o genoma de dois bacteriófagos filamentosos - CTX ϕ e VPI ϕ - que estão integrados ao cromossomo maior de *V. cholerae* e são capazes de serem transferidos horizontalmente, conferindo virulência às cepas receptoras (Waldor & Mekalanos, 1996; Karaolis et al., 1999). Na VPI encontram-se os genes que codificam o pilus corregulador de toxina (TCP), requerido para a eficiente colonização do epitélio intestinal humano pelo microrganismo. O TCP juntamente com a toxina colérica (CT), codificada por genes presentes no profago CTX ϕ , constituem os dois principais fatores de virulência em *V. cholerae* (Kaper et al., 1995). Além de permitir a colonização do epitélio intestinal pelo *V. cholerae*, o TCP é o receptor para a entrada do profago CTX ϕ em novas células. Desta forma observa-se uma situação onde um fago serve de receptor para um segundo fago, em um processo de infecção seqüencial que resulta na virulência do microrganismo (Karaolis et al., 1999).

A estrutura da VPI e do profago CTX ϕ caracteriza a transferência horizontal de genes como um mecanismo para a origem de novos clones patogênicos de *V. cholerae*. Além disso, estudos têm indicado que os genes de virulência ou seus homólogos estão dispersos entre cepas ambientais de diversos sorogrupos, constituindo assim, um reservatório desses genes, o que dá suporte a hipótese de origem ambiental de *V. cholerae* patogênico (Mukhopahyay et al., 1995, Chakraborty et al., 2000, Mukhopadhyay et al., 2001, Daalgaard, a. et al., 2001, Boyd & Waldor, 2002, Theophilo et al., 2006).

O *V. cholerae* é classificado em mais de 200 sorogrupos de acordo com as diferenças na composição da parede celular, especificamente no antígeno somático O do lipopolissacarídeo (LPS). Somente os sorogrupos O1 e O139 são responsáveis por epidemias de cólera (Li et al., 2003), os demais sorogrupos, embora não envolvidos em epidemias, podem ser patogênicos e estar associados a pequenos surtos de diarreia (Sack et al., 2004).

Theophilo et al. (2006) analisaram 179 amostras de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, durante a epidemia de cólera no Brasil, a maioria isolada de casos clínicos, compreendendo 54 diferentes sorogrupos. As amostras de sorogrupo O26 representaram 8,4%, sem nenhuma

correlação quanto à fonte de origem ou local de isolamento e apenas nesse sorogrupo foi evidenciado o gene *ctxA* presente no profago CTX ϕ , no entanto o gene *tcpA* não foi identificado em todas as cepas. Uma vez que o gene *tcpA* é o receptor celular do profago CTX ϕ , a ausência na detecção do gene *tcpA* sugere a presença de um alelo variante nas cepas em questão. Além disso, somente duas cepas (Uma cepa de *V. cholerae* O26 – 151 – e uma de sorogrupo não tipável – 168) são produtoras da toxina colérica e classificadas como do sorogrupo O1 segundo análise do operon ribossomal (Cariri et al., 2009). Consideramos que uma análise molecular do profago CTX ϕ e da VPI presente nessas cepas, permitirá identificar o grau de proximidade dos profagos presentes nas cepas em relação aos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae*, o que poderá orientar mais adequadamente o diagnóstico laboratorial da cólera.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Foram analisadas 14 cepas de *V. cholerae* O26 e uma cepa de sorogrupo não tipável isoladas entre 1991 e 2000 de processos entéricos humanos (coprocultivos) e do ambiente no Brasil, cedidas pelo Centro de Referência Nacional de Cólera e Enteroinfecções Bacterianas (CRNCEB – Fiocruz, RJ - Brasil). Previamente, as cepas foram classificadas no *National Institute of Health*, Tóquio – Japão, para a identificação sorológica. A cepa 569B, *V. cholerae* O1 biotipo Clássico, isolada em 1948 de caso clínico na Índia, e a cepa de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor 63, isolada do ambiente em Pernambuco em 1992, durante a epidemia foram utilizadas como controles. Para extração de DNA as cepas foram cultivadas em Água Peptonada Alcalina (APA) a 37 °C por 24 horas. O DNA total foi extraído segundo protocolo descrito por Ausubel et al. (1987), sem a adição de lisozima.

Reações de PCR

As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25 μ L por tubo, compreendendo: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 200 μ M; 20 pmol de cada primer; 20 ng de DNA genômico de cada cepa; 1 U de Taq DNA polimerase. As

amplificações foram realizadas em um termociclador Biometra®, programado inicialmente para 30 ciclos térmicos, correspondendo cada ciclo de um minuto a 92°C, um minuto a 55°C, um minuto e 30 segundos a 72°C, terminando com uma etapa de alongamento final de sete minutos a 72°C. As temperaturas de pareamento dos *primers* (tabela 1) e de extensão foram padronizadas para cada fragmento amplificado. Os produtos obtidos das amplificações por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Após a migração, o gel de agarose corado com solução de brometo de etídio (15 µL/ Litro de solução a 15 mg/mL) foi observado em luz UV e digitalizado em câmara digital Kodak 1D Image Analysis Software®, versão 3.5 para Windows®.

Clonagem

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados com o Kit QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen®) e ligados ao plasmídeo pGEM-T Easy (Promega®). Células de *Escherichia coli* DH5α foram transformadas com o plasmídeo recombinante. Colônias brancas de cada clonagem foram incubadas em meio LB contendo 100 mg/mL ampicilina e utilizadas para extração de DNA plasmidial segundo o método de lise alcalina (adaptado de Sambrook e Russell, 2001). Posteriormente, estes plasmídeos foram digeridos com *EcoRI* e o tamanho dos insertos clonados foram estimados, após migração por eletroforese em gel de agarose 1%, com o auxílio do programa da câmara digital Kodak 1D Image Analysis Software®. Os fragmentos foram quantificados e enviados para o sequenciamento.

Sequenciamento

Foram sequenciados no mínimo três clones de cada gene para cada cepa analisada. Os clones obtidos foram sequenciados em um sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). As reações de sequenciamento foram preparadas para um volume final de 10µL por tubo. A reação conta se inicia com desnaturação 5 minutos a 95°C seguida de choque térmico, prosseguindo em um termociclador ABI Applied Biosystem para amplificações das sequências, programado para desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. O DNA amplificado foi precipitado com isopropanol a 65%, lavado com etanol a 60% e sequenciado. As sequências obtidas foram analisadas através dos programas SeqMan™ e

EditSeqTM (pacote de programas Lasergene®, version 4.01, DNASTAR Inc., Madison, WI), para avaliar o padrão de qualidade das sequências e montar as sequências contíguas. Foi analisada a similaridade das sequências obtidas com sequências de *V. cholerae*, depositadas no banco de dados do NCBI, através do programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL, S.F. *et al.*, 1997). Sequências depositadas no mesmo banco de dados foram utilizadas nas análises. Para a construção das árvores filogenéticas com os genes *rstR* e *tcpA* foi utilizado o método Neighbor-Joining, com um *bootstrap* de 1.000 replicatas no programa Mega 4 (TAMURA *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Sete cepas de *V. cholerae* O26 (149, 151, 180, 181, 183, 184, 267) e uma cepa não tipável (168) possuem o profago CTX ϕ completo, devido à presença dos genes *cep*, *orfU*, *ace* e *zot* e dos genes *ctxA* e *ctxB*, codificadores da toxina colérica (tabela 2). As demais cepas (143, 145, 165, 182, 269, 270, 271), são classificadas como pré-CTX, devido à ausência dos genes codificadores da CT (Boyd *et al.*, 2000). Os genes *rstA*, *rstB* e *rstR* presentes na região RS2 do profago e no elemento RS1 também foram identificados nas cepas analisadas. O sequenciamento do gene *rstR* mostrou que o tipo de regulador presente nas cepas de *V. cholerae* O26 (cepas 149, 184 e 267) corresponde ao alelo *rstR*^{4**} (Mukhopadhyay *et al.*, 2001), presente em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139. O alelo presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor (Figura 1).

A análise de genes presentes nos *clusters* TAG, TCP e ACF da VPI mostrou a presença da ilha de patogenicidade de *Vibrio* nas cepas analisadas (Tabela 3). Apesar de oito cepas possuírem o profago CTX ϕ completo e sete o profago incompleto (pré-CTX), somente em duas cepas foi detectado o gene *tcpA* utilizando-se *primers* para o alelo El Tor. Uma vez que o gene *tcpA* é o receptor celular do profago CTX ϕ a ausência na detecção do gene *tcpA* sugere a presença de um alelo variante nas cepas em questão. Para elucidar essa questão foi realizada uma reação de amplificação utilizando *primers* externos ao gene *tcpA*, sendo observada amplificação de fragmento de tamanho esperado (1.324 pb) em todas as cepas confirmando a presença do gene *tcpA* nas cepas analisadas. O sequenciamento do gene *tcpA* mostrou que o alelo presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor, visto que os alelos presentes nessas cepas agrupam com alelos do gene *tcpA* de *V. cholerae* El Tor de sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Já as sequências das demais cepas

correspondem a uma variante do gene presente em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, denominado *tcpA-env* (Mukhopadhyay et al., 2001) (Figura 2).

DISCUSSÃO

A cólera, doença re-emergente que atingiu o continente sul-americano e o território brasileiro em 1991, encontra-se em sua sétima pandemia. A magnitude da doença no território brasileiro esteve relacionada às más condições de vida da população, tendo encontrado nas regiões Norte e Nordeste situações favoráveis à sua implantação e disseminação. Atualmente a cólera encontra-se sob controle no país, no entanto, o risco de sua re-introdução em áreas já atingidas ou ainda indenes continua presente tendo em vista que persistem as baixas coberturas de saneamento e o *V. cholerae* O1 continua sendo isolado de águas ambientais, mesmo esporadicamente (Leal et al., 2008).

Cepas patogênicas de *V. cholerae* evoluem a partir de cepas ambientais não patogênicas, e a transferência horizontal de genes de virulência tem um papel importante nesse processo (Faruque et al., 1998b, Faruque & Mekalanos, 2003). No caminho de eventos evolucionários que originam cepas patogênicas a partir de progenitores não patogênicos, é importante identificar cepas intermediárias que provavelmente carregam alguns genes relacionados à virulência, mas não possuem o conjunto completo de genes requerido para a patogênese e disseminação de epidemias (Rahman et al., 2008). Ocasionalmente cepas ambientais de sorogrupos não-O1/ não-O139 carregam um ou mais genes de virulência ou seus homólogos (Mukhopadhyay et al., 2001, Faruque et al., 2004). Entretanto a real prevalência de genes associados à virulência em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 não está bem estabelecida até o presente momento (Rahman et al., 2008).

Não está claro o que determina a emergência de cepas patogênicas com determinado fago CTX ϕ ou tipo de gene *tcpA*, mas recentes estudos começam a revelar a presença de combinações não convencionais de alelos de genes de virulência em cepas clínicas de *V. cholerae* (Nair et al., 2002; Ansaruzzaman et al., 2004). Presume-se que a diversidade de genes de virulência, por exemplo, diferentes alelos de *tcpA*, ou diferentes fagos CTX ϕ dispersos entre cepas ambientais contribui para esse processo (Rahman et al., 2008). Apesar de *V. cholerae* ser autóctone do ambiente aquático, acredita-se que a aquisição de genes de

virulência, incluindo VPI e o profago CTX ϕ permita que cepas específicas tornem-se adaptadas ao ambiente do intestino humano (Faruque; Albert; Mekalanos, 1998).

Durante a epidemia de cólera, ocorrida no Brasil, foram isoladas 179 amostras de *V. cholerae* não-O1/ não-O139. Análises visando a identificação de genes de virulência evidenciaram que somente nas cepas do sorogrupo O26 foi detectado o gene *ctxA*, codificador da principal subunidade da toxina colérica (Theophilo et al., 2006). Além disso, apesar de em todas as cepas do sorogrupo O26 terem sido encontrados genes de virulência presentes no profago CTX ϕ , o gene *tcpA* não foi evidenciado em todas as cepas. Visto que esse gene codifica o receptor para a entrada do profago em novas cepas, esse fato poderia sugerir a aquisição do profago CTX ϕ por um mecanismo alternativo, ou a presença de um alelo variante do gene *tcpA*.

Análise dos genes presentes no profago CTX ϕ mostrou que entre as cepas analisadas sete possuem o profago CTX ϕ incompleto (pré-CTX) devido a ausência dos genes codificadores da CT (Boyd et al., 2000). O sequenciamento do gene *rstR* presente no profago CTX ϕ nas cepas de *V. cholerae* O26 corresponde ao alelo *rstR*^{4*}, presente em cepas ambientais de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, visto que os alelos presentes agrupam com alelos do gene *rstR* de diversos sorogrupos depositados no banco de dados do NCBI. O profago contendo esse tipo de alelo é denominado CTX ϕ ^{ENV} (Mukhopadhyay et al., 2001). Já o gene *rstR* presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor, e o profago denominado CTX ϕ ^{ET}. Apesar de não terem sido obtidas sequências correspondentes a todas as cepas acreditamos que os resultados podem ser extrapolados para as demais, devido as características similares existentes entre elas.

Foi observada amplificação nos três principais conjuntos de genes da VPI, os *clusters* TAG, TCP e ACF, confirmando assim a presença da Ilha de Patogenicidade nas cepas em estudo. Apesar do gene *tcpA* só ter sido identificado em duas cepas quando utilizados *primers* para o alelo El Tor, ao serem utilizados *primers* externos ao gene foi observada amplificação de fragmento de tamanho esperado em todas as cepas, sugerindo a existência de uma variante do gene nas cepas em questão. O sequenciamento do gene *tcpA* mostrou que o alelo presente nas cepas 151 e 168 corresponde ao alelo El Tor, confirmando o resultado obtido na reação de PCR. Já as sequências das demais cepas correspondem a uma variante do gene presente em cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139, denominado *tcpA-env* (Mukhopadhyay et al., 2001).

A diversidade entre várias proteínas TcpA e *pilus* relacionados sugere que essa diversidade pode ser adaptativa. Esse grau de polimorfismo reflete produtos gênicos que são

sujeitos a diversas seleções na adaptação a diferentes sistemas no hospedeiro, ou a variáveis aspectos no ambiente (Li et al., 1995; Blank et al., 2000). A diversidade pode refletir, por exemplo, em seleção natural para a evasão imune durante a infecção, susceptibilidade a fagos ou resistência ao ambiente, e aderência a hospedeiros aquáticos ou sítios abióticos (Blank et al., 2000; Kirn et al., 2000). De fato nesse estudo podemos observar que o tipo de profago presente nas cepas que possuem o gene *tcpA* El Tor, corresponde ao profago CTX ϕ^{ET} , e nas que possuem o gene *tcpA-env* ao profago CTX ϕ^{ENV} , sugerindo que a aquisição de um tipo característico de profago CTX ϕ está diretamente relacionado ao tipo de *tcpA* presente na cepa.

Relatamos nesse trabalho a existência de cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 isoladas no Brasil possuidoras de todo o conjunto de genes de virulência presentes nos sorogrupos epidêmicos de *V. cholerae*. Durante a epidemia de cólera e nesse momento pós-epidemia, cepas dos sorogrupos não-O1/ não-O139 são geralmente descartadas nos exames laboratoriais. Assim, chamamos atenção para a forma como é realizado o método tradicional de diagnóstico da cólera no Brasil, que utiliza como critério de triagem apenas a reação de soroglutinação das cepas isoladas. Cepas de *V. cholerae* não-O1/ não-O139 toxigênicas podem assim, não ser detectadas pelo diagnóstico da cólera. Nesta fase atual, em que a doença encontra-se sob controle no país, é importante intensificar estudos que permitam a precoce detecção da presença do *V. cholerae* toxigênico, bem como avaliar as características genéticas das cepas eventualmente encontradas. Assim recomenda-se que além dos testes de triagem tradicionais, indispensáveis para a classificação do *V. cholerae*, sejam realizados métodos moleculares complementares (Mendes et al., 2008) que permitam a identificação de cepas carreando genes de virulência. Para alcançar tal objetivo faz-se importante realizar o mapeamento e pesquisa de ambientes reconhecidamente favoráveis à sobrevivência do *V. cholerae*, além do aprofundamento de estudos acerca do comportamento do microrganismo frente a alterações ambientais.

Tabela 1 – Lista de *primers* específicos para genes presentes no profagos CTX ϕ e VPI ϕ

GENE	PRIMER	SEQÜÊNCIA DO PRIMER	REFERÊNCIA
<i>cep</i>	cep F	TCG TTA GCG TGT CGG TTC GCA GG	Sarkar <i>et al.</i> (2002)
	cep R	TGC TTT GTA CCA GTC ACA GAT AG	
	cep R1	TGG GCA CCA GTA AAG ATA CGG	Este estudo
<i>orfU</i>	orfU F	GCT ACA TGT TTA GCT CAC TG	Sarkar <i>et al.</i> (2002)
	orfU R	AGG TGC GTT AGT CAT CAG CG	
	orfU R1	GTC TAT AAA AAC CAA TCA GAG	Este estudo
<i>ace</i>	ace F	AGA GCG CTG CAT TTA TCC TTA TTG	Leal <i>et al.</i> (2004)
	ace R	AAC TCG GTC TCG GCC TCT CGT ATC	
<i>zot</i>	zot F	GCT ATC GAT ATG CTG TCT CCT CAA	
	zot R	AAA GCC GAC CAA TAC AAA AAC CAA	
<i>ctxA</i>	ctxAi F	CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG	Keasler; Hall (1993)
	ctxAi R	TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG	
<i>ctxA</i>	ctxAe F	CTT TTA ACT TTA GAT TGG TAT TC	Este estudo
	ctxAe R	ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC	Li <i>et al.</i> (2002)
<i>ctxB</i>	ctxB F	GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CAC	Mekalanos <i>et al.</i> (1983)
	ctxB R	GAT ACA CAT AAT AGA ATT AAG GAT	
<i>igl</i>	IgF	GAG CCT GTG CAC TCA CCT TGT AT	Nandi <i>et al.</i> (2003)
<i>rstC</i>	RsR	GCT CAG TCA ATG CCT TGA GTT G	
<i>rstA</i>	rstA R	GCA TAA GGA ACC GAC CAA GCA AGAT	Heidelberg <i>et al.</i> (2000)
	rstA F1	CAT TAG CCT TCA AAA ACC TGT	Este estudo
	rstA F2	TAA TCG CTC ACC ACC GTT AGG	
	rstA R2	CAT TTA CTG GCG TAT CTA CAA	
<i>rstB</i>	rstB F	AAC ATT GGC CTT TAT CGT TTT	Este estudo
	rstB R	GCC TTT CCG GTT CTT GTC ACG	
<i>tcpA</i> El Tor	<i>tcpA F</i>	GAA GAA GTT TGT AAA AGA AGA ACA C	Keasler; Hall (1993)
	<i>tcpA R</i>	GAA AGG ACC TTC TTT CAC GTT G	
<i>tcpA</i>	<i>tcpH1</i>	AGC CGC CTA GAT AGT CTG TG	Boyd; Waldor (2002)
	<i>tcpA4</i>	TCG CCT CCA ATA ATC CGAC	
<i>aldA</i>	<i>aldA R</i>	ATT CTT CTG AGG ATT GCT GAT	Boyd <i>et al.</i> (2000)
	<i>aldA F</i>	TTT TCT TGA TTG TTA GGA TGC	
<i>tagA</i>	<i>tagA F</i>	TGA GCC TGA AAT AAT CAC AGG	Li <i>et al.</i> (2003)
	<i>tagA R</i>	GAT GAT GAA GTG TAT ATC TAC	
<i>acfB</i>	<i>acfB F</i>	GAT GAA AGA ACA GGA GAG A	Kovach; Shaffer; Peterson (1996)
	<i>acfB R</i>	CAG CAA CCA CAG CAA AAC C	
<i>tcpPH</i>	<i>tcpP F</i>	ACT CTG TGA ATA TCA TCC TGC C	Sarkar <i>et al.</i> (2002)
	<i>tcpH R</i>	CTG GGT AAG CCA AAC ATT GG	

Tabela 2: Identificação dos genes presentes na região central do profago CTX ϕ ,

N° CPqAM	N° IOC	Sorogrupo	Ano de Isolamento	Região core do profago CTX ϕ					
				<i>cep</i>	<i>orfU</i>	<i>ace</i>	<i>zot</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>
149 / 01	4010	O26	1992	+	+	+	+	+	+
151 / 01	4756	O26	1992	+	+	+	+	+	+
168 / 01	17155	Não tipável	2000	+	+	+	+	+	+
180 / 01	3340	O26	1992	+	+	+	+	+	+
181 / 01	6958	O26	1992	+	+	+	+	+	+
183 / 01	11159	O26	1993	+	+	+	+	+	+
184 / 01	13151	O26	1994	+	+	+	+	+	+
267 / 01	2494	O26	1992	+	+	+	+	+	+
143 / 01	1717	O26	1992	+	-	+	+	-	-
145 / 01	3647	O26	1992	+	+	-	-	-	-
165 / 01	15677	O26	1998	-	+	+	+	-	-
182 / 01	10626	O26	1993	+	+	+	+	-	-
269 / 01	11043	O26	1993	+	+	+	+	-	-
270 / 01	13663	O26	1994	+	-	+	+	-	-
271 / 01	16352	O26	1999	-	+	+	-	-	-

Tabela 3 – Identificação de genes presentes na ilha de patogenicidade de *Vibrio*

Amostra	Genes																				
	TAG gene cluster							TCP gene cluster							ACF gene cluster						
Nº CPqAM	1	aldA	tagA	2	3	4	tagD	I	PHA	B	Q	C	RDS	T	E	FtoxtJ	B	CYE	A	D	int
149 / 01		+	+						+	-						-					+
151 / 01		+	+						+	+						+					+
168 / 01		+	+						+	+						+					+
180 / 01		+	+						+	-						-					+
181 / 01		+	+						+	-						-					+
183 / 01		+	+						+	-						-					+
184 / 01		+	+						+	-						-					+
267 / 01		+	+						+	-						-					+
143 / 01		+	+						+	-						-					+
145 / 01		+	+						+	-						-					+
165 / 01		-	+						-	-						-					+
182 / 01		+	+						+	-						-					+
269 / 01		+	+						+	-						-					+
270 / 01		-	+						-	-						-					+
271 / 01		-	+						-	-						-					+

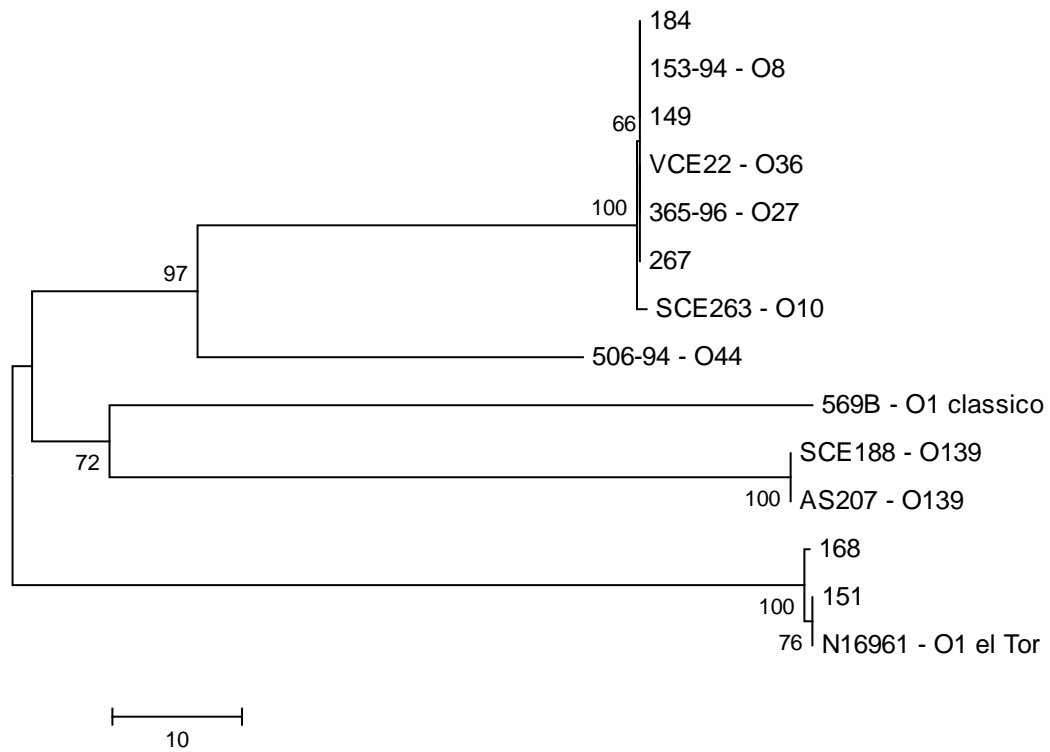


Figura 1: Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *rstR*, no programa Mega 4. Foi adotado o método Neighbor-Joining com um *bootstrap* de 1.000 replicatas. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os diferentes sorogrupos de *V. cholerae*. Os números sobre os ramos verticais indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap*, na qual as ramificações foram observadas. Número de acesso das sequências disponíveis no NCBI das cepas 153-94, SCE263, 365-96, VCE22, 506-94, AS207, SCE188, N16961 e 569B são respectivamente, AF452585, AF133309, AF390570, AY145124, AF452586, AF110029, AF133310, AE004224 e AF055890.

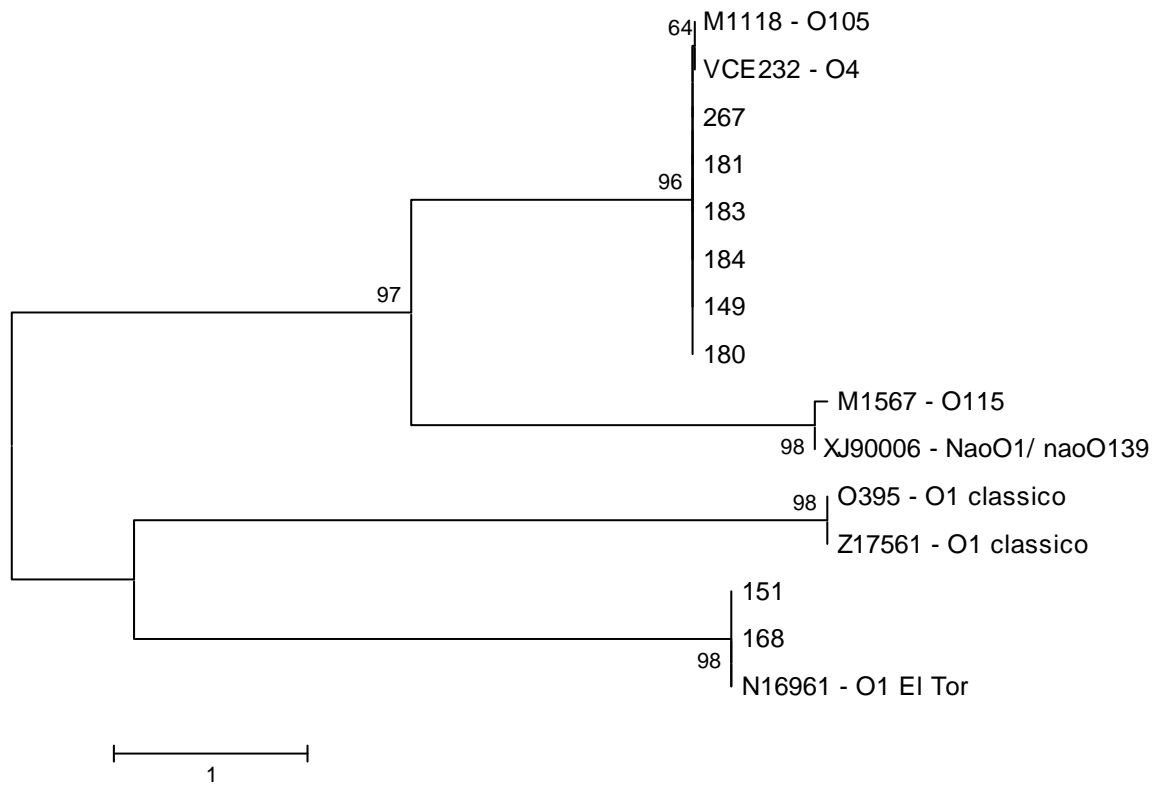


Figura 2: Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *tcpA* no programa Mega 4. Foi adotado o método Neighbor-Joining com um *bootstrap* de 1.000 replicatas. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os diferentes sorogrupos de *V. cholerae*. Os números sobre os ramos verticais indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap*, na qual as ramificações foram observadas. Os números de acesso das sequências depositadas no NCBI das cepas M1118, VCE232, XJ90006, M1567, N16961, Z17561 e O395 são respectivamente, FJ209005, DQ124668, AY056619, FJ209007, AF325734, X64098, CP000627.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F. et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25** (17), pp. 3389-3402.
- Ansaruzzaman, M. et al. (2004). Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae*. *Emerg Infect Dis*, **10** (11), pp. 2057-2059.
- Ausubel, F.M. et al. (1987). *Current Protocol in Molecular Biology*, New York.
- Blank, T.E. et al. (2000). Molecular variation among type IV pilin (*bfpA*) genes from diverse enteropathogenic *Escherichia coli* strains *Infect Immun*, **68**, pp. 7028-7038.
- BOYD, E.F. et al. (2000). Molecular analysis of a putative CTX ϕ precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX ϕ by toxigenic *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, **182**, pp. 5530–5538, 2000.
- Boyd, E.F. & Waldor, M.W. (2002). Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 serogroup isolates. *Microbiology* **148**, pp. 1655-1666.
- Cariri, F.M.O. et al. (2009) (in press). Characterization of potential virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. *Clin Microbiol Infect*.
- Chakraborty, S. et al. (2000). Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **66**, pp.4022-4028.
- Daalsgaard, A. et al. (2001). Clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* serogroup O141 carry the CTX phage and the genes encoding the toxin-coregulated pili. *J. Clin Microbiol* **39**, pp. 4086-4092.
- Faruque, S.M. & Mekalanos, J.J. (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends Microbiol*, **11** (11), pp. 505-510.
- Faruque, S.M., et al. (1998a). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, pp. 1301-1314.
- Faruque, S.M. et al. (1998b). Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTX ϕ : molecular basis for the origination of new strains with epidemic potential. *Infect Immun*, **66**, pp. 5819-5825.
- Faruque, S.M. et al. (2004). Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera epidemic area. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, pp.2123-2128.

Heidelberg, J.F. et al. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, pp. 477-484.

Kaper et al. (1995). Cholera. Review. *Clin Microbiol Rev*, **8** (1), pp. 48-86.

Karaolis, D.K.R. et al. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, pp.3134-3139,

Karaolis, D.K.R. et al. (1999). A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature* **399**, pp. 375-379.

Keasler, S.P., Hall, R.H. (1993). Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. *Lancet* **341**, p. 1661.

Kirn, T. J. et al. (2000). Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, **35**, pp. 896-910.

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**, pp. 447-454.

Leal, N.C. et al. (2008). Characterization of *Vibrio cholerae* isolated from the aquatic basins of the State of Pernambuco, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, pp. 272-276.

LI, J. et al. (1995). Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad USA* **92**, pp. 7252-7256.

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**, pp. 2441-2453.

Li, M., et al. (2003). Comparative Genomic Analysis of the *Vibrio* Pathogenicity Island and Cholera Toxin Prophage Regions in Nonepidemic Serogroup Strains of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **69**, pp. 1728-1738.

Mekalanos, J.J., et al. (1983). Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* **306**, pp. 551-557.

Mendes, C. L. et al. (2008). Development of a multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) assay for *Vibrio cholerae* O1 detection. *J Microbiol Methods* **72**, pp. 191-196.

Mukhopadhyay, A.K. et al. (1995). Distribution and virulence of *Vibrio cholerae* belonging to serogroups other than O1 and O139: a nationwide survey. *Epidemiol Infect*, **114**, pp. 65-70.

Mukhopadhyay, A.K. et al. (2001). Characterization of VPI pathogenicity island and CTX ϕ prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **183**, pp. 4737-4746.

Nair, G.B. et al. (2002). New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J Clin Microbiol* **40**, pp. 3296-3299.

Nandi, S. et al. (2003). Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype EL Tor: role of the CTX ϕ array and its position in the genome. *Microbiology* **149**, pp. 89- 97.

Pearson, G.D.N. et al. (1993). CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3750-3754.

Rahman et al. (2008). Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholerae* population in cholera endemic area: tracking the evolution of pathogenic strains. *DNA Cell Biol*, **27**(7), 347-355.

Sack, D.A. et al. (2004). Cholera. Review. *Lancet* **363**, 223-233.

Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sarkar, A. et al. (2002). *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **70**, 4735-4742.

Tamura, K. et al. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

Theophilo, G.N.D. et al. (2006). Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **48**, 65-70.

Waldor, M.K. & Mekalanos, J.J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous bacteriophage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910-1914.

ANEXO**ANEXO A: Parecer do CEP/ CPqAM**

Título do Projeto: Estudo molecular dos elementos genéticos CTX e VPI em cepas de *Vibrio cholerae* O26, isoladas de processos entéricos humanos no Brasil

Pesquisador responsável: Ana Paula Rocha da Costa

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 23/07/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 67/08

Registro no CAAE: 0066.0.095.000-08

PARECER Nº 054/2008

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 27 de agosto de 2008.


Dr. Maria de Medeiros
Bióloga
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ