



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Vibrio cholerae* O1 SACAROSE
NEGATIVA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTE NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

MÁRCIA DE NAZARÉ MIRANDA BAHIA

Belém – Pará

2011

MÁRCIA DE NAZARÉ MIRANDA BAHIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Vibrio cholerae* O1 SACAROSE
NEGATIVA DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTE NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof.Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Belém – Pará

2011

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Bahia, Márcia de Nazaré Miranda

Caracterização molecular de *Vibrio cholerae* O1 sacarose negativa de isolados clínicos e ambiente na Amazônia brasileira / Márcia de Nazaré Miranda Bahia; orientador, Edvaldo Carlos Brito Loureiro. – 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2011.

1. *Vibrio cholerae*. 2. *Vibrio cholerae* – Aspectos moleculares. 3. Cólera - Amazônia 2. I. Título.

CDD – 22. ed. 616.932

MÁRCIA DE NAZARÉ MIRANDA BAHIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Vibrio cholerae* O1 SACAROSE NEGATIVA DE
ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTE NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Instituto Evandro Chagas / SVS / MS

Banca Examinadora: Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dra. Lena Líllian Canto de Sá
Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

Prof. Dr^a Karla Tereza Silva Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Ricardo Ishak (Suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 11 de maio de 2011

“Mas Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias; e Deus escolheu as coisas fracas deste mundo para confundir as fortes; E Deus escolheu as coisas vis deste mundo, e as desprezíveis, e as que não são para aniquilar as que são; para que nenhuma carne se glorie perante ele” (1 Co 1.26-29).

Dedico esta dissertação aos meus pais Raimundo e Carmen, a minha amada avó Amélia, as minhas irmãs Marcilene e Marcicleia, aos meus adorados sobrinhos Ryan, Bruno e Gabriella e ao meu amor Leno.

AGRADECIMENTOS

Primordialmente a **Deus**, por ter me concedido a vida, e permitir que hoje eu atinja mais um objetivo nesta caminhada e ao lado de pessoas tão especiais.

Aos meus **Pais** que nunca pouparam esforços para nos criar e educar. A minha amada **Avó**, por estar presente em todos os momentos da minha vida. Obrigada por acreditarem no meu potencial. A vocês toda a minha gratidão.

Aos momentos de muita diversão e alegria que tive ao lado de minhas **Irmãs** e **Sobrinhos**. Obrigada por tudo!

Ao meu amor **Leno Barbosa** por estar sempre ao meu lado. Obrigada pelo companheirismo, pela dedicação, pelo enorme carinho e amor e por compreender meus momentos de ausência.

Ao meu Orientador, **Dr. Edvaldo Loureiro**, pela grande oportunidade, ensinamentos durante esses dois anos e pela compreensão, orientação e paciência.

A Dr^a **Lena Sá** pela importante contribuição que deu para que o PFGE fosse realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Secção de Meio Ambiente (SAMAM) do Instituto Evandro Chagas (IEC). Agradeço também pelas relevantes orientações sobre o programa Bionumerics. Muito obrigada pela amizade, apoio e palavras de incentivo.

Aos companheiros de laboratório (PFGE), **Raimundo Pio** e **Denise Amorim**, muito grata pelo treinamento e por todo o auxílio na execução do trabalho. Muito obrigada pelo convívio harmonioso!

Aos colegas da Secção de Bacteriologia e Micologia (SABAC) do IEC, Madalena, Odete Arrouche, Raimundo Nonato, José Caetano, Dolores Dias, José Goés, Socorro Moraes, Neide, Fabíola Gomes, Maurimélia Mesquita, Silvia Marques, Cintya Oliveira, Flávia Bastos, Daniela Rocha, Karla Lima, Roberta Fusco, Francisco Lúzio e Maria Luiza pelo convívio diário e por todas as experiências trocadas.

As minhas amigas e companheiras de estudo e mestrado, **Nathália Chamma** e **Nathalia Marques** pelo apoio constante e por estarem ao meu lado durante a concretização de um tão sonhado objetivo. Obrigada pela amizade verdadeira!

Ao farmacêutico bioquímico, **Aldo A. Proietti Júnior** do Laboratório Central do Estado do Amapá (LACEN-AP) por ter concedido as fichas epidemiológicas dos casos de cólera lá confirmados.

Aos Professores Drs. **Lena Lílian Canto de Sá** e **Luís Fernando Machado** pela importante contribuição no plano de qualificação.

Aos Professores Doutores, **Antônio Carlos Rosário Vallinoto**, **Lena Lílian Canto de Sá** e **Karla Tereza Silva Ribeiro**, membros da banca examinadora desta Dissertação, pelas valiosas contribuições.

Ao **Instituto Evandro Chagas/MS** pelo apoio técnico e administrativo concedido durante a realização deste estudo.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários** por conceder infraestrutura, professores qualificados e a capacitação profissional que almejava.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de estudo concedida.

SUMÁRIO

| | | |
|---|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | | 8 |
| RESUMO | | 10 |
| ABSTRACT | | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | | 12 |
| 1.1 CÓLERA | | 12 |
| 1.1.2 Histórico | | 12 |
| 1.1.3 Epidemiologia | | 14 |
| 1.1.4 Etiologia | | 16 |
| 1.2 O <i>Vibrio cholerae</i> | | 18 |
| 1.2.1 Ecologia | | 18 |
| 1.2.2 Genoma | | 19 |
| 1.2.3 Fatores de Virulência | | 21 |
| 1.2.3.1 Ilha de Patogenicidade do <i>Vibrio cholerae</i> | | 21 |
| 1.2.3.2 O fago CTX Φ | | 22 |
| 1.2.3.3 Outros fatores de virulência | | 23 |
| 1.2.4 Ocorrência de Novas Variantes do <i>V. cholerae</i> O1 | | 24 |
| 1.2.5 Métodos Usados na Genotipagem | | 25 |
| 1.2.6 Perfil de Macro Restrição Definido por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) | | 25 |
| 1.2.7 Emergência de <i>V.cholerae</i> Resistente a Antimicrobianos | | 27 |
| 1.3 OBJETIVOS | | 30 |
| 1.3.1 Objetivo Geral | | 30 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos | | 30 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | | 31 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 2.1 | PROCEDIMENTOS ÉTICOS..... | 31 |
| 2.2 | AMOSTRAGEM..... | 31 |
| 2.3 | PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS..... | 34 |
| 2.3.1 | Reisolamento, Reidentificação e Manutenção das Culturas de <i>V. cholerae</i> O1..... | 34 |
| 2.3.2 | Análise da Sensibilidade aos Agentes Antimicrobianos..... | 34 |
| 2.3.3 | Avaliação do tempo de fermentação da sacarose..... | 35 |
| 2.3.4 | Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Pesquisa de Genes de Virulência do <i>V.cholerae</i>..... | 36 |
| 2.3.5 | Eletroforese Em Gel de Campo Pulsado (PFGE)..... | 37 |
| 2.3.5.1 | Preparo da Suspensão Bacteriana..... | 37 |
| 2.3.5.2 | Preparação e Montagem dos Blocos de Agarose..... | 37 |
| 2.3.5.3 | Processo de Lise Celular <i>in situ</i> | 37 |
| 2.3.5.4 | Digestão do DNA Cromossomal com a Enzima de Restrição <i>NotI</i> | 38 |
| 2.3.5.5 | Montagem do Gel e Condições da Corrida Eletroforética..... | 38 |
| 2.3.5.6 | Interpretação e Análise dos Dados do PFGE..... | 38 |
| 2.3.5.7 | Cepas de Referência Utilizadas no estudo..... | 39 |
| 3 | RESULTADOS..... | 40 |
| 3.1 | PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS | 40 |
| 3.2 | AVALIAÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO DA SACAROSE..... | 42 |
| 3.3 | DETECÇÃO DOS GENES ASSOCIADO À VIRULÊNCIA..... | 43 |
| 3.4 | DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA..... | 44 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 53 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 58 |
| | REFERÊNCIAS..... | 59 |
| | ANEXO..... | 74 |

LISTA DE FIGURAS

- | | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Número de casos de cólera no mundo durante o ano de 2009. (OMS, 2009). | 14 |
| Figura 2 | Microscopia eletrônica demonstrando a morfologia do <i>V. cholerae</i> . (Fonte: Brasil, 2008). | 17 |
| Figura 3 | Distribuição dos principais locos genéticos necessários para virulência do <i>V. cholerae</i> . (Hilderberg <i>et al.</i> , 2000). | 20 |
| Figura 4 | Representação esquemática da ilha de patogenicidade do <i>V. cholerae</i> , evidenciando os genes de virulência e regulação (Zang <i>et al.</i> , 2003). | 21 |
| Figura 5 | Representação da estrutura do CTX Φ e elemento RS nos biótipos do <i>V. cholerae</i> O1 (Safa <i>et al.</i> , 2009). | 23 |
| Figura 6 | Mapa destacando os Estados e municípios de onde são provenientes as amostras deste estudo. | 33 |
| Figura 7 | Ágar TCBS com colônias de <i>V. cholerae</i> O1 não fermentadoras da sacarose. | 42 |
| Figura 8 | Amplificação por PCR de fragmento de 1568 pb do gene <i>ctxAB</i> e 617 pb do gene <i>tcpA</i> em gel de agarose 2%. Linhas A1 a A6: Amostras IEC 256, 304, 303, 285, 688 e 307. Ld: <i>Ladder 1Kb Plus</i> . Linhas A7 a A12: Amostras IEC 408, 415, 470, 472, 473. CP: Controle Positivo (ATCC de <i>V. cholerae</i> 14035). | 44 |
| Figura 9 | Padrão de bandas do PFGE gerados pela enzima de restrição <i>NotI</i> de isolados de <i>V. cholerae</i> O1 e não O1 de procedência clínica e ambiental. Ld: <i>Ladder (Lambda Ladder PFG marker)</i> . Linhas A1 a A6 (<i>V. cholerae</i> O1 de origem clínica): IEC 849, 664, 690, 673, 684 e 707). Linhas A8 a A12 (<i>V. cholerae</i> não O1 de origem ambiental): IEC 1099, 1116, 1081, 1088 e 1096. Linha A13: Cepa de referência <i>V. cholerae</i> O1 El Tor N16961. | 50 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 10** Relação genética entre os isolados de *V.cholerae* O1 não fermentador da sacarose de procedência clínica ambiental e as cepas de referência *V.cholerae* O1 El Tor (N16961 e 121) e clássico (200). O Dendograma foi construído com os padrões de digestão da enzima *NotI* (pulsotipos) e foi gerado pela análise do programa *Bionumerics* usando UPGMA e coeficiente de Dice igual a 1,7%
- Figura 11** Relação genética entre os isolados de *V.cholerae* O1 e não O1 não fermentador da sacarose de procedência clínica e ambiental e as cepas de referência *V.cholerae* O1 El Tor (N16961 e 121) e clássico (200). O Dendograma foi construído com os padrões de digestão da enzima *NotI* (pulsotipos) e foi gerado pela análise do programa *Bionumerics* usando UPGMA e coeficiente de Dice igual a 1,7%.

RESUMO

O *V.cholerae* é um microorganismo autóctone do ambiente aquático e os sorogrupos O1 e O 139 estão ligados a pandemia e epidemia de cólera. Os *V.cholerae* não O1 e não O139 ou vibrios não aglutinantes (NAGs) estão envolvidos em casos isolados e surtos de diarreia semelhantes à cólera. No decorrer da sétima pandemia houve o surgimento de diversos isolados “El Tor atípicos”. Entre estes se encontra a variante bioquímica do *V.cholerae* O1 que não fermenta a sacarose no TCBS em 18 a 24 horas que é o tempo de incubação convencional. Neste trabalho foram estudados 138 isolados de *V.cholerae* O1 e não O1 não fermentador da sacarose no TCBS de procedência clínica e ambiental, obtidos entre 1994 e 1995 na Amazônia Brasileira (Estados do Pará, Amapá e Amazonas). Avaliou-se a fermentação da sacarose no TCBS e em caldo; o perfil de suscetibilidade a oito diferentes antimicrobianos em ágar difusão; a relação clonal entre os *V.cholerae* O1 e NAG clínicos e ambientais pelo PFGE e a presença de genes de virulência *ctxAB* e *tcpA* pela reação em cadeia da polimerase. Observou-se que as amostras de *V.cholerae* não fermentaram a sacarose em 24 de incubação no ágar TCBS e em caldo, 43% utilizaram a sacarose em 24 horas e 57% a fermentavam tardiamente (tempo superior a 24 horas). Os isolados apresentaram baixo percentual de resistência a antimicrobianos (8,7%) e nenhum caso de multiresistência. Em relação aos genes de virulência, de um modo geral, os isolados de *V.cholerae* O1 apresentavam o *tcpA* e o *ctxAB*. Nos não O1 estes estavam ausentes, com exceção de um isolado clínico não O1 (gene *tcpA*⁺). A análise do PFGE revelou pulsotipos distintos entre os O1 e NAGs, embora dois destes últimos tenham apresentado relação clonal com os O1 clínicos. Todos os O1 clínicos apresentaram relação clonal com isolados de referência da sétima pandemia.

ABSTRACT

The *V. cholerae* is an autochthonous organism of the aquatic environment and serogroups O1 and 139 are associated to the pandemic and epidemic cholera. The *V. cholerae* non-O1 and non O139 or non-binders vibrios (NAGS) are involved in isolated cases and outbreaks of cholera-like diarrhea. During the seventh pandemic there was the emergence of several isolated “El Tor atypical”. Among these there is a biochemical variant of *V. cholerae* O1 that does not ferment sucrose in TCBS in 18 to 24 hours which is the conventional incubation time. In this work, we studied 138 isolates of *V. cholerae* O1 and non O1 non-fermenter of sucrose on TCBS from clinical and environmental origin, obtained between 1994 and 1995 in the Brazilian Amazon (states of Pará, Amapá and Amazonas). We evaluated the fermentation of sucrose in TCBS and broth; the susceptibility to eight different antimicrobials in agar diffusion, the clonal relationship between *V. cholerae* O1 and NAG from clinical and environmental origin by PFGE and the presence of virulence genes *tcpA* and *ctxAB* by the polymerase chain reaction. It was observed that the samples of *V. cholerae* did not ferment sucrose in 24 hours of incubation in TCBS agar and broth, 43% used sucrose in 24 hours and 57% fermented it lately (more than 24 hours). The isolates had a low percentage of antimicrobial resistance (8.7%) and no cases of multidrug resistance. Regarding the virulence genes, in general, the isolates of *V. cholerae* O1 showed the *ctxAB* and *tcpA*. In the non-O1, these were absent, except for one clinical isolate non-O1 (gene *tcpA* +). The PFGE analysis revealed pulsotypes distinguished between O1 and nags, although two of the latter had presented the clonal relationship to clinical O1. All O1 clinical isolates were clonally related to the reference isolates from the seventh pandemic.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÓLERA

1.1.2 Histórico

A história da doença sempre esteve associada à Índia, as seis primeiras pandemias tiveram origem neste continente e pelo menos a sexta foi causada pelo biótipo clássico de *Vibrio cholerae* O1 (Faruque *et al.*, 1998). 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 *et al.*, 1995).

A primeira pandemia teve início em 1817 e término em 1823 atingindo a Europa, principalmente a Rússia. A segunda pandemia de cólera ocorrida nos anos de 1829 a 1851 atingiu as ilhas Britânicas, alastrando-se pela Polônia, Canadá, Rússia, Irlanda e Alemanha. Em 1832 registravam-se casos nos países da América, como Peru, Chile, México e Estados Unidos (Rosenberg, 1962 apud, Colwell, 1996). Durante o período de 1852 a 1859 da terceira pandemia foi registrado um aumento significativo no número de casos no continente Asiático, Africano, Americano e Europeu. Em maio de 1855, atracou no porto da cidade de Belém-PA uma embarcação trazendo colonos oriundos da região do Douro, em Portugal cujas imediações eram assoladas pela doença. Do Pará a epidemia atingiu a Bahia, o Rio de Janeiro, Pernambuco e o Ceará (Cooper, 1986).

A quarta pandemia (1863-1875) foi considerada flagelante, pois, em alguns lugares, a mortalidade assumiu índices alarmantes. Na Índia e Europa registraram-se 360 mil e 450 mil mortos, respectivamente. A epidemia chegou ao Brasil no final dos anos 60, atingindo em 1867 o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso.

A quinta pandemia (1881-1896) afetou extensivamente a América do Sul, causando epidemias em vários países e foi caracterizado pela alta mortalidade na Argentina, Chile e Peru. A sexta pandemia (1899-1923) envolveu populações próximas ao Oriente Médio e Península Balcânica. Sabe-se que o *V.cholerae* O1 biotipo clássico foi o responsável pela sexta pandemia, porém casos esporádicos da doença foram atribuídos ao biotipo El Tor no decorrer deste período (Karolis *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998).

A sétima pandemia teve origem nas ilhas Celebes (antiga Sulawesi), na Indonésia, no ano de 1961. O *V.cholerae* O1 biotipo El Tor responsável pela sétima e atual pandemia foi isolado em 1906, em peregrinos examinados na estação de quarentena de El Tor, no Egito (Karolis *et al.*, 1995).

A doença atingiu a América Latina em 1991, após 100 anos de ausência de casos. Esta alcançou a América do Sul através do Peru por via marítima. No final do ano de 1993 quase todos os países da América Central e do Sul tinham sido afetados pelo *Vibrio cholerae* O1, El Tor. A reemergência da cólera no Brasil ocorreu através da fronteira entre o Brasil e Peru, no Estado do Amazonas (Toledo, 1993; Lainson, 1997). A partir daí, alastrou-se progressivamente pela região Norte, seguindo o curso do Rio Solimões/Amazonas e seus afluentes, principal via de deslocamento de pessoas na região; e para as regiões Nordeste em 1992 e Sudeste e Sul em 1993, através dos principais eixos rodoviários. Na região Nordeste, a epidemia assumiu um caráter acelerado disseminando-se por todos os Estados da região até o fim de 1993 (Hofer, 1993; Toledo, 1993).

A epidemia atingiu o ápice de casos confirmados em 1993. Em 1994, após o desenvolvimento de uma campanha nacional a doença começou a retroceder (Guthmann, 1995; Lainson *et al.*, 1997). A partir de 1995 houve uma significativa redução dos casos, limitando-se às regiões Norte e Nordeste.

Durante o curso da epidemia, Ramos *et al.* (1997) observaram uma cepa variante bioquímica de *Vibrio cholerae* O1 no município do Oiapoque, Estado do Amapá. Tendo como principal característica a incapacidade de fermentar a sacarose em ágar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose) ou fermentá-la tardiamente quando a bactéria era cultivada em meio líquido. A variante propagou-se rapidamente pelos Estados do Pará e Amazonas, tornando-se responsável pela maioria dos casos notificados na Amazônia entre os anos de 1994 e 1995.

Em 1992, uma severa epidemia de cólera afetou a Índia e Bangladesh. 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 até então, sendo por isso denominado O139 ou Bengal, devido ao local de seu isolamento (Albert *et al.*, 1993). Desde então, o *V. cholerae* O139 persiste como segundo agente etiológico da doença.

1.1.3 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) mantém um banco de dados de surtos de cólera e fornece atualizações sobre surtos e um resumo anual dos dados nacionais que foram notificados (Griffith *et al.*, 2006). A doença continua endêmica em regiões do mundo onde há carência de infra-estrutura e desenvolvimento econômico, alta densidade populacional, baixa escolaridade e pobreza. De acordo com dados publicados no ano de 2009 pela OMS, um total de 45 países de todos os continentes relataram 221.226 casos de cólera, dos quais 98% foram notificados na África (Figura 1).

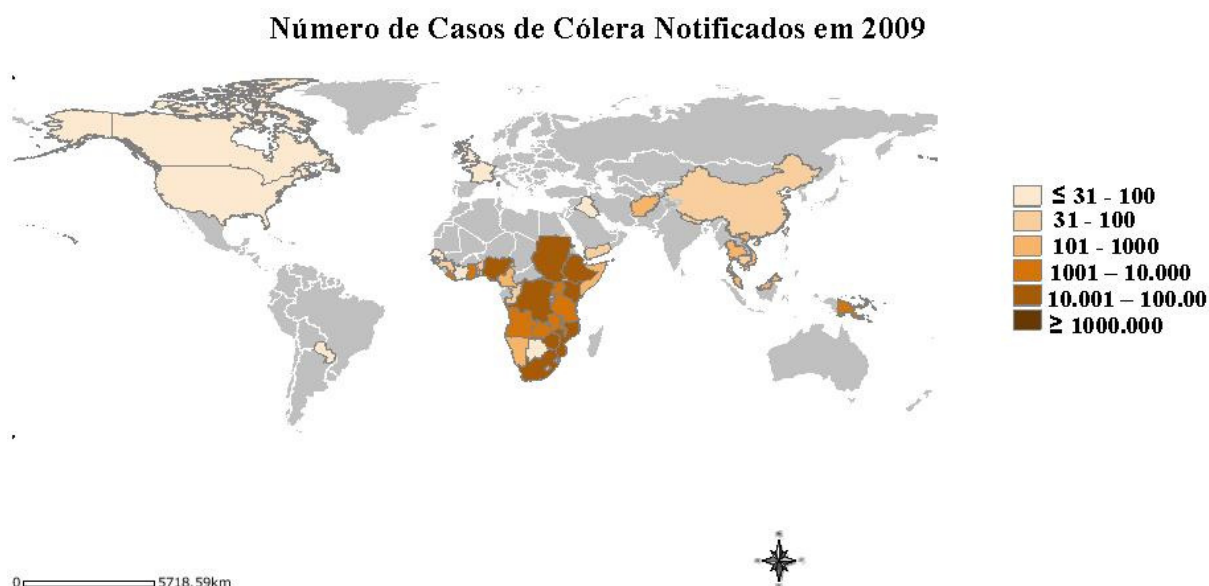


Figura 1 - Número de casos de cólera no mundo durante o ano de 2009.
Fonte: OMS, 2009.

Em outubro de 2010 foi detectado um aumento no número de casos de diarreia aguda no Haiti. Alguns dias depois, o Laboratório Nacional de Saúde Pública do país isolou o agente responsável: O *V. cholerae* O1. Até em fevereiro de 2011 o número de casos atingiu 231.070 e 4.549 mortes (OMS, 2011).

A cólera reemergiu no Brasil em abril de 1991, inicialmente na região amazônica, em área limítrofe ao Brasil e Peru, disseminando-se, a seguir, principalmente para os estados do Norte e Nordeste do país (Waldman *et al.*, 1999).

Os números de casos confirmados de cólera nos anos de 1991 a 1998 na região Norte foram de 11. 613. Atingindo o ápice em 1992 com 4. 242 casos notificados. Nos anos de 1994 e 1995 foram confirmados 1. 351 e 2. 334 casos, respectivamente, quando foram registrados os primeiros casos de cólera por *V. cholerae* O1 não fermentadores da sacarose. Provavelmente, neste período (1994 e 1995) houve subnotificação influenciada pela mudança no padrão bioquímico do *V. cholerae* O1 que foi traduzida em dificuldade no seu diagnóstico adequado. A partir de 1996 o número de casos foi reduzido (aproximadamente 81 casos). (Brasil, 2008a).

Em Belém, a cólera teve início no mês de novembro de 1991, quando o primeiro paciente foi internado no Hospital Universitário João de Barros Barreto (Beltrão, 2007).

De acordo com o sistema de notificação de casos de cólera, no ano de 1991 a cidade de Belém confirmou 188 casos, nos anos de 1992, 1993, 1994 e 1995 foram confirmados 637, 108, 58 e 70 casos, respectivamente (Brasil, 2008b).

Até dezembro de 1991 ocorreram 7 casos confirmados na Região Nordeste. No ano de 1992, houve aumento para 33.328 casos da doença, atingindo em 1993, 58.454 casos seguindo-se com decaimento a partir de 1995. No Brasil a epidemia atingiu o ápice em 1993 com 60.340 casos notificados. Foi desenvolvida uma campanha nacional de combate à cólera e, em 1994, a doença começou a retroceder (Guthmann, 1995; Nitrini *et al.*, 1997). A partir de 1995 os casos no Brasil reduziram-se significativamente, tendendo a limitar-se às regiões Nordeste e Norte, onde prevalecem condições sócio-econômicas menos satisfatórias, sugerindo a tendência de endemização da doença (Nitrini *et al.*, 1997).

Em 1999 houve um recrudescimento da epidemia (4.759), tendência que não se confirmou no ano de 2000, com o registro de 733 casos, todos procedentes da região Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia).

Em 2004 e 2005 foram confirmados, respectivamente, 21 e 5 casos autóctones no Estado de Pernambuco (Datusus, 2008a).

As regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste foram as que notificaram um reduzindo número de casos. Nos Anos de 1991 a 2008 foram confirmados nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, respectivamente, 864, 473 e 286 casos confirmados da doença (Datusus, 2008a).

1.1.4 Etiologia

O agente etiológico da cólera foi descrito em 1854 por Pacini e isolado em 1884 por Robert Koch no Egito e na Índia. Koch ao analisar amostras de fezes de vítimas da doença, observou um bacilo em forma de vírgula que fora inicialmente denominado de *Comma bacilli* (Koch, 1894, Faruque *et al.*, 1998, Sack *et al.*, 2004).

Atualmente, dois sorogrupos de *V. cholerae* são conhecidos como responsáveis pelas maiores pandemias e epidemias de cólera: O1 e O139 (Sack *et al.*, 2004).

O *V. cholerae* pertence à família Vibrionaceae, gênero *Vibrio* (Thompson & Swings, 2006). Este gênero compreende mais de 80 espécies (Thompson *et al.*, 2007). As espécies pertencentes a esta família são bacilos retos ou curvos, móveis por meio de flagelo polar, quimiorganotróficos e anaeróbio facultativo, apresentando metabolismo oxidativo e fermentativo. O oxigênio é o aceptor universal de elétrons durante a respiração. A maioria das espécies desta família é oxidase positiva. Todos utilizam a D-glicose como principal fonte de carbono e energia e a maioria utiliza sais de amônio como fonte de nitrogênio. Não formam endosporos nem microcistos (Brenner *et al.*, 2005).

O *V. cholerae* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbio ou anaeróbio facultativo, que, morfológicamente, apresenta-se como bastonete reto, curvo ou levemente encurvado, monotríquia polar e medindo de 1,4 a 2,6 µm de comprimento e 0,5 a 0,8µm de diâmetro (Figura 2) (Faruque *et al.*, 1998). Requer baixas concentrações de Na⁺ (5–15 mM) ou nenhum Na⁺ para crescimento em meios de cultura (Brenner *et al.*, 2005). Classicamente, apresenta as seguintes características em testes bioquímicos: positivo para os testes de lisina e ornitina decarboxilase, fermentação de glicose, sacarose e manitol, teste da oxidase positivo e teste de Voges-Proskauer (VP) positivo (Kaper *et al.*, 1995).

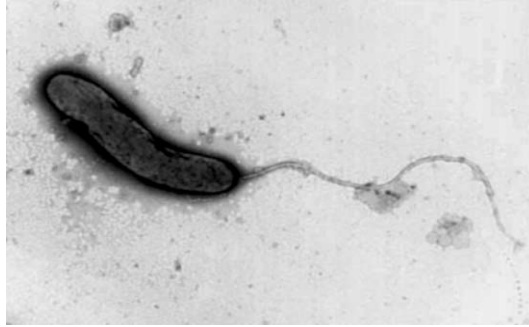


Figura 2 - Microscopia eletrônica demonstrando a morfologia do *V. cholerae*.
Fonte: Brasil, 2008.

A classificação antigênica do *V. cholerae* é baseada na estrutura polissacarídica do antígeno somático termoestável “O” constituído de três frações (A, B e C). Tendo como base essa classificação dividi-se a bactéria em sorogrupos ou sorovares (Yamai *et al.*, 1997). Existem mais de duzentos sorogrupos O (Thompson *et al.*, 2008).

Os determinantes antigênicos de superfície são aglutinados com antisoro polivalente para o antígeno “O” específico. Distinguem-se no sorogrupo O1 três frações antigênicas A, B e C, cuja distribuição permite dividir o sorogrupo nos sorotipos Ogawa (fração A e B), Inaba (frações A e C) e Hikojima (frações A, B e C). Tais sorotipos não são completamente estáveis, podendo apresentar variações (conversões antigênicas) em resposta a pressão seletiva exercida pelos anticorpos produzidos durante a infecção ou a mutações no gene *webT*, que codifica o antígeno polissacarídico (Keddy *et al.*, 2007). As amostras destes sorotipos podem apresentar características bioquímicas do *V. cholerae* biótipo clássico ou do biótipo El Tor (Cowel, 1996).

Isolados identificados em testes bioquímicos como sendo *V. cholerae* e que não aglutinam com os antisoros O1 e O139 são referidas como *V. cholerae* não-O1 e não-139 ou vibrios não aglutinantes (NAGs). Estes sorogrupos não estão envolvidos com a epidemia/ pandemia de cólera e já foram descritos em todo o mundo. Ocasionalmente causam uma variedade de infecções extraintestinais, especialmente em pessoas imunodeprimidas e gastroenterites. Além do que têm sido associados a casos esporádicos ou a surtos de diarreia semelhante à cólera (Morris *et al.*, 1990, Yamai *et al.*, 1997).

Questionamentos acerca da utilização das características antigênicas do *V. cholerae* (Sorogrupo O1 e/ou O139) como marcador e determinante do potencial

patogênico e /ou pandêmico da espécie tem sido levantados, já que eventos de transferência horizontal de genes, recombinações e mutações envolvendo fatores de virulência podem resultar na emergência de variantes de *V.cholerae* com maior adaptabilidade ao meio ambiente o que também aumentaria sua transmissibilidade e patogenicidade (Blokesch & Schoolnik, 2007; Chun *et al.*, 2009).

1.2 O *Vibrio cholerae*

1.2.1 Ecologia

O *V. cholerae* é um micro-organismo autóctone do ecossistema aquático, que habita água do mar, água doce (rios), água de esgoto, águas estuarinas e regiões costeiras assim como superfície e conteúdo intestinal de animais, podendo também ser encontrado de forma livre. Colonizam alguns constituintes da cadeia alimentar aquática como zooplâncton, crustáceos, moluscos e peixes (Colwell & Huq, 1994).

A sobrevivência desta bactéria pode ser dependente de vários fatores, tais como condições físico-químicas da água (temperatura, salinidade e pH), associação específica da bactéria com plantas e animais aquáticos e/ou a existência de associações ecológicas que envolvam diversos componentes do ambiente aquático (Faruque *et al.*, 1998). A espécie também pode ser encontrada dentro de comunidades multicelulares conhecidas como biofilmes, estruturas embebidas por uma matriz extracelular polissacarídica, formada por quitina, que as defendem das agressões ambientais (Colwell, 1996).

A cólera apresenta disseminação influenciada pelos aspectos climáticos que afetam a disponibilidade de água. Nas áreas endêmicas, as taxas anuais de indivíduos com cólera variam de acordo com as mudanças ambientais e climáticas (Pascual *et al.*, 2000; Lipp *et al.*, 2002). O registro de casos de cólera no Brasil foi maior nos períodos mais secos do ano, quando registrado um baixo volume de água nos reservatórios e mananciais, proporcionando a concentração dos vibrios. A elevação da temperatura da água neste período favorece o rápido crescimento da população de *V. cholerae* (Sack *et al.*, 2004).

Os *V. cholerae* NAG tem sido reconhecidos como agentes etiológicos de casos isolados e surtos de diarreia muito semelhante à cólera e muitos apresentam características epidemiológicas de crescente importância, pois nem sempre se

detecta qualquer fator de virulência conhecido entre eles (Kaper *et al.*, 1995) ou, como já observado em outros casos, é possível a detecção da toxina colérica (CTX) e/ou do *pilus* TCP em isolados de casos clínicos ou de origem ambiental (Dalsgaard *et al.*, 1995; Rivera *et al.*, 2001). O empenho em desvendar as suas estruturas patogênicas só foi de interesse quando surgiu um novo sorogrupo epidêmico O139, cuja epidemia funcionou como alerta para o aparecimento de outros clones pandêmicos (Albert *et al.*, 1993; Sack *et al.*, 2004). O *V. cholerae* O1 possui habilidade de entrar em estado de latência em resposta à falta de nutrientes ou *stress* físico, a elevada salinidade e/ou redução de temperatura, essa característica é chamada de estado viável, mas não cultivável (VNC). No estado VNC as células bacterianas reduzem de tamanho, tornam-se ovóides e entram em estado de dormência, permitindo assim a sua sobrevivência nas condições ambientais adversas por períodos prolongados (Colwell & Huq, 1994; Sanyal, 2000; Alam *et al.*, 2007). Isso facilitaria a persistência do *V. cholerae* durante períodos interepidêmicos.

1.2.2 Genoma

O genoma do *V. cholerae* consiste de dois cromossomos circulares (Figura 3). O maior deles compreende cerca de 2.961,146 milhões de pares de bases (pb), enquanto o menor compreende em torno de 1.072,314 pb. Ambos os cromossomos apresentam aproximadamente, a mesma quantidade de nucleotídeos guanina e citosina, ou seja, 47% do genoma da espécie (Heidelberg *et al.*, 2000).

O maior cromossomo, ou cromossomo I, contém genes responsáveis pelas funções celulares essenciais, tais como replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA), divisão celular, biossíntese de proteínas de tradução e biossíntese dos constituintes da parede celular. Além disso, a maior parte dos locos genéticos que estão associados com a virulência, tais como a ilha de patogenicidade VPI e o genoma do fago filamentosso CTX Φ ou elemento CTX, também se encontram no cromossomo I. Os genes *ctxA* e *ctxB* (codificam a toxina colérica), *zot* (zonula occludens toxin) e *ace* (accessory cholera enterotoxin) estão localizados no elemento genético CTX, que é composto de uma região central de 4,5 kb de tamanho denominada cassete de virulência (Baudry *et al.*, 1992; Waldor & Mekalanos, 1996; Karaolis *et al.*, 1998). A regulação da expressão desses genes de virulência, envolve várias proteínas reguladoras, que formam um sistema protéico

regulatório formado pela ToxR e ToxT (Heidelberg *et al.*, 2000). Dois fatores essenciais para a colonização do intestino, o pili corregulado com toxina (*Toxin-coregulated pili* - TCP) e o fator acessório de colonização (*Accessory colonization factor* – ACF), estão neste cromossomo.

No cromossomo II, estão localizados genes envolvidos no transporte de açúcares, íons metálicos e ânions, metabolismo, genes que codificam proteínas ribossomais, vias de transdução de sinal e no reparo do DNA. Os genes presentes no cromossomo II são essenciais para adaptação ao habitat natural do *V. cholerae*, a capacidade do micro-organismo em utilizar os nutrientes presentes nos diversos habitats também é aumentada pela extensa duplicação dos genes envolvidos na captura ou coleta de nutrientes. Um grande exemplo disto é a duplicação dos genes que codificam a quitinase, que junto com o sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferase, produzem e transportam dissacarídeos derivados de quitina liberados dos exoesqueletos do zooplâncton para a utilização por *V. cholerae*.

Assim, a retenção do cromossomo II é fundamental para a sobrevivência de *V. cholerae*, com isso, a distribuição assimétrica do material genético sugere que sob determinadas condições poderá ocorrer diferença no número de cópias dos cromossomos I e II. Fato que pode aumentar os níveis de expressão dos genes, com resultados vantajosos para o microrganismo. Também está no cromossomo II uma ilha de integron (*integron island*) que é um sistema de captura de genes ainda a ser associada com virulência (Heidelberg *et al.*, 2000).

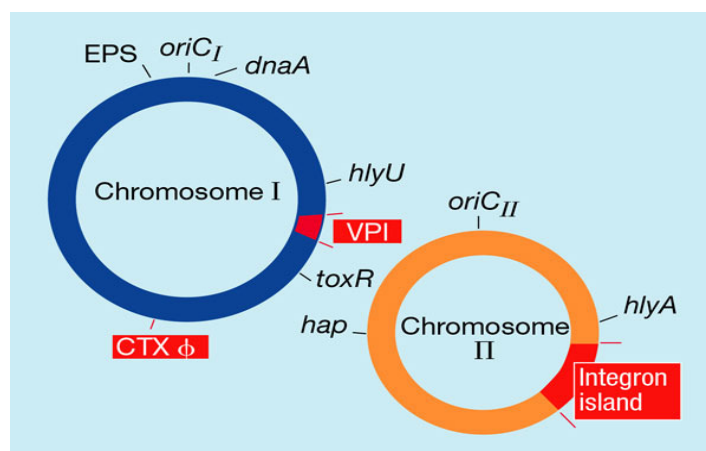


Figura 3 - Distribuição dos principais locos genéticos necessários para virulência do *V. cholerae* (Hilderberg *et al.*, 2000).

1.2.3 Fatores de Virulência

As duas regiões principais, localizadas no cromossomo maior do *V.cholerae* O1, que participam diretamente dos mecanismos de virulência são: a Ilha de patogenicidade de *Vibrio* (VPI) e o profago CTXΦ.

1.2.3.1 Ilha de Patogenicidade do *Vibrio cholerae*

A VPI é formada por um conjunto de 15 genes que compreende um segmento de 41,2 kb, que codifica potencialmente 29 proteínas. Dois genes que codificam fatores essenciais para a adesão, colonização e multiplicação do *V. cholerae* no intestino estão nesta ilha de patogenicidade: genes *tcpAHP* (toxin-coregulated pilus-TCP) e genes *acfABCD* (*Accessory colonization factor* – ACF). Além de estar presente genes que atuam na regulação de uma cascata de eventos, como genes *toxR*, *toxT*, *aldA* e *tagAB* (Hilderberg *et al.*, 2000, Zang *et al.*, 2003) (Figura 4).

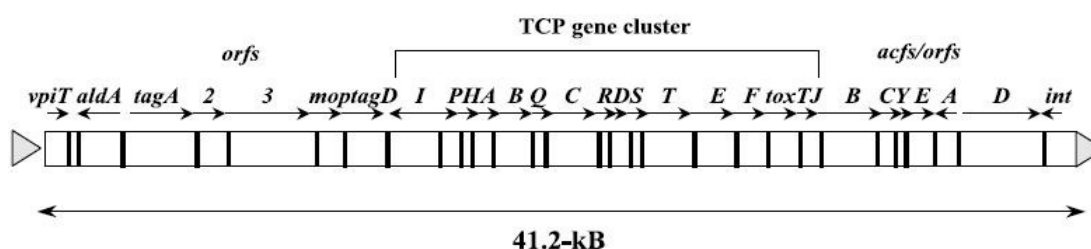


Figura 4 - Representação esquemática da ilha de patogenicidade do *V. cholerae*, evidenciando os genes de virulência e regulação (Zang *et al.*, 2003).

Entre os genes TCP estão os seguintes genes: i) *tcpA*, que codifica uma proteína pilina de 20 kDa, a qual apresenta homologia com as fímbrias do tipo IV de outras espécies bacterianas; ii) *tcpB*, que codifica uma proteína estrutural menor com função ainda desconhecida; iii) *tcpJ*, que codifica uma proteína do tipo prepilina, capaz de clivar a porção aminoterminal da proteína TcxA (Said *et al.*, 1995). O TCP também funciona como receptor para CTXΦ, bacteriófago filamentoso que codifica a toxina colérica.

Entre os genes ACF, pelo menos quatro proteínas parecem estar envolvidas na colonização intestinal: AcfA, AcfB, AcfC e AcfD. No entanto, alguns estudos

revelam que a AcfB, além de estar envolvida na colonização, também é uma proteína transdutora de sinal e sensora do meio ambiente (Hughes *et al.*, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 2001).

1.2.3.2 O fago CTX Φ

O fago CTX Φ apresenta em sua estrutura dois grupos de genes com funções distintas, o core e a região RS2. A região do core inclui os genes *ctxAB*, *ace* (*Accessory cholera enterotoxin*), *cep* (*Core-encoding pilin*) e *zot* (*Zonula occludens*) que são responsáveis pela morfogênese do fago. A região RS2 (*repetitive sequences*) codifica proteínas com função de replicação (RstA), integração (RstB) e regulação da recombinação sítio-específica do fago (RstR) (Safa *et al.*, 2010).

A toxina colérica (*cholera toxin* – CT) é uma proteína termolábil de 82-84kDa que estruturalmente é formada por uma subunidade A e cinco subunidades B que são codificadas pelos genes *ctxA* e *ctxB*, respectivamente, e pertencem ao óperon *ctxAB*. A subunidade B liga-se ao receptor GM1 localizado na superfície do epitélio intestinal e a subunidade A, ativa, é internalizada. Esta ativa a adenilato ciclase resultando no aumento da produção de AMP cíclico acarretando secreção abundante de íons cloreto e água caracterizando a doença diarreica aguda observada em indivíduos com cólera (Waldor *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1998).

Nos biótipos El Tor o profago é flanqueado por RS1, que é similar ao RS2, exceto por conter um gene adicional, *rstC*. Este gene codifica uma proteína que promove a transcrição de genes CTX Φ que são necessários para produzir partículas infecciosas (Waldor *et al.*, 1997). O número de cópias CTX Φ também varia entre os biótipos, a maioria dos El Tor carrega uma cópia ou múltiplas cópias em tandem no cromossomo maior. As clássicas apresentam duas cópias, uma em cada cromossomo (Trucksis *et al.*, 1993, Heidelberg *et al.*, 2000) (Figura 5).

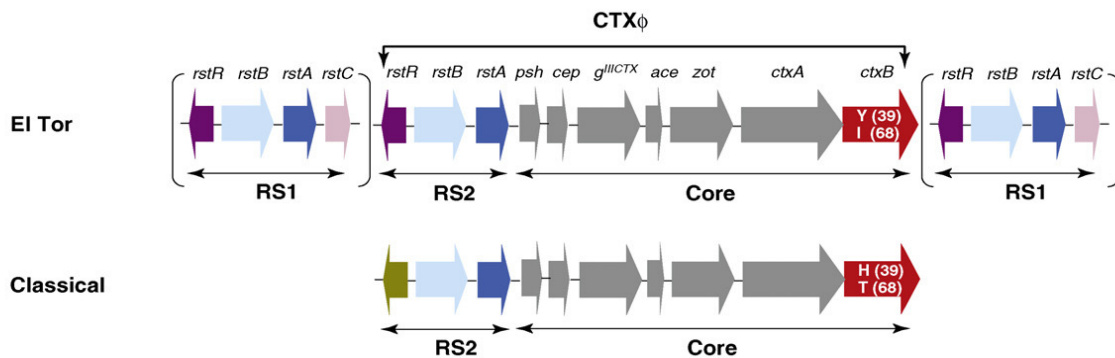


Figura 5 - Representação da estrutura do CTX Φ e elemento RS nos biótipos do *V.cholerae* O1 (Safa *et al.*, 2010).

A toxina Zot é reconhecida como capaz de alterar a permeabilidade da mucosa intestinal afetando a estrutura da junção intercelular ou zônula ocludens (Fasano *et al.* 1991). A enterotoxina colérica acessória (Ace) é capaz de provocar, de modo semelhante à CT, o acúmulo de fluido em modelo de experimentação animal (Trucksis *et al.*, 1993).

1.2.3.3 Outros fatores de virulência

A toxina RTX de *V. cholerae* é codificada pelo gene *rtxA* que está dentro de um *cluster* que está fisicamente ligado ao profago CTX Φ . São membros do sistema de secreção de exoproteínas que está presente em uma ampla variedade de bactérias Gram-negativas. Secretam proteínas que apresentam atividade citotóxica, hemolíticas e leucotóxicas (Lally *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 2001). A toxina necessita de uma alteração pós-traducional para se tornar biologicamente ativa. Essa ativação é realizada pelo produto do gene *rtxC*. A RTX é transportada do citoplasma para a superfície da célula por proteínas de transporte que são codificadas pelos genes *rtxB* e *rtxD*. Estes genes estão agrupados em um óperon em que a ordem dos genes se apresentam da seguinte forma: *rtxC*, *rtxA*, *rtxB* e *rtxD* (Lally *et al.*, 1999).

Hemolisina/citosina denominada de HlyA é uma potente toxina com atividade enterotóxica e citolítica e é considerado um fator alternativo para patogênese da diarreia em alguns isolados que não apresentam o gene *ctxAB*. Esta toxina é produzida pelos NAGs e pelo *V. cholerae* O1 El Tor. No locus *hly* estão incluídos uma fosfolipase (*lec*), uma hemolisina (*HlyA*) e um transdutor e quimiotático (*HlyB*) (Manning *et al.*, 1984; Hall & Drassar, 1990; Coelho *et al.*, 2000).

Uma enterotoxina termo-estável ST é considerada um potencial fator de virulência detectado entre o grupo não-O1. Estudos demonstram que NAGs produtores de ST podem provocar diarreia severa semelhante à cólera (Vicente *et al.*, 1997).

1.2.4 Ocorrência de Novas Variantes do *V. cholerae* O1

No decorrer da sétima pandemia houve o surgimento de novas variantes do *V. cholerae* O1. Diversos isolados “El Tor atípicos” têm sido identificadas e relatadas na literatura (Safa *et al.*, 2010). Um estudo realizado em pacientes hospitalizados com diarreia aguda em Bangladesh (Índia) identificou, através de testes fenotípicos e genotípicos, híbridos entre o *V. cholerae* O1 biotipo clássico e El Tor que foram chamados de variantes Matalab I, II e III (MT) (Nair *et al.*, 2002). Esses resultados foram confirmados por Safa *et al.* (2005) com o auxílio do PFGE.

Em Moçambique (África) houve um extenso surto em 2004 causados por isolados de *V. cholerae* O1 que possuíam características fenotípicas do biótipo El Tor, entretanto, os resultados da genotipagem do profago CTX revelaram que pertenciam ao biótipo Clássico. Essas variantes foram chamadas de “Mozambique” (Ansaruzzaman *et al.*, 2004).

Na América Latina houve o relato de três novas variantes: variante Amazônia, variante *V. cholerae* O1 não fermentador da sacarose no TCBS e variante Tucumã.

Coelho *et al.* (1995) descreveu uma nova linhagem do *V. cholerae* O1 oriunda de casos de diarreia ocorridos em 1991 e 1992 em residentes de algumas vilas da região do alto Solimões, no estado do Amazonas. Esta variante não possuía nenhum dos fatores associados à virulência (CTX e TCP) e não era relacionada geneticamente aos biotipos Clássico e El Tor. Esta variante foi chamada de Amazônia.

Ramos *et al.* (1997) observaram a ocorrência de uma variante bioquímica do *V. cholerae* O1. Esta não fermentava a sacarose no meio seletivo utilizado para o isolamento e cultivo do *V. cholerae* (Agar Tiosulfato, Citrato, Bilis e Sacarose-TCBS) e fermentava tardiamente a sacarose no meio líquido. A cepa circulou somente na região amazônica, onde as condições sócioeconômicas e ambientais favoreceram sua instalação e disseminação. Isolados de *V. cholerae* não fermentadoras da sacarose no TCBS também foram observadas em surtos em Bangladesh

(Ansarruzzaman *et al.*, 1995), Malásia (Mohamad & Haque, 2003) e Taiwan (Wei *et al.*, 2008). Seria, pois, um El Tor fermentador tardio de sacarose (Sá, 2009).

Um estudo conduzido por Pichel *et al.* (2003) com *V.cholerae* isolados entre 1992 e 1998 de pacientes com cólera na província Tucumán- Argentina revelou, utilizando ferramenta da biologia molecular a ocorrência de uma cepa que não apresentava CTXΦ e era geneticamente distinto do clone pandêmico da América Latina e da variante Amazônia. Foi denominada de variante Tucumán.

1.2.5 Métodos Usados na Genotipagem

Pesquisas realizadas nas duas últimas décadas apresentaram uma série de técnicas utilizadas para genotipagem e análise clonal entre os isolados de *V.cholerae*. Entre esses métodos podemos citar a ribotipagem (Dutta *et al.*, 2006; Raychoudhuri *et al.*, 2007; Partida e Quilici, 2009; Zhou *et al.*, 2009), PFGE (*pulsed field gel eletrophoresis*) (Nandi *et al.*, 1997, Dalsgaard *et al.*, 1997; Kam *et al.*, 2003; Pourshafie *et al.*, 2007; Zang *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (Jiang *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001; Lan & Reeves, 2002) e Microarranjo de DNA (Dziejman *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2007).

1.2.6 Perfil de Macro Restrição Definido por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O PFGE (*Pulsed Field Gel Eletrophoresis*) é uma técnica de tipagem molecular amplamente aceita para caracterização de linhagens patogênicas para fins epidemiológicos. Este método utiliza endonucleases de restrição que clivam o genoma em grandes fragmentos, esses fragmentos gerados são separados em gel de agarose por pulsos elétricos de diferentes durações (*switch time*) que mudam de direção de acordo com um padrão pré-determinado, o que permite a migração equidistante do DNA à esquerda e a direita do centro do gel, resultando em linhas verticais retas de separação (Magalhães *et al.*, 2005; Goering, 2010).

O PFGE é considerado o padrão ouro em epidemiologia molecular bacteriana e apresenta alto poder discriminatório para comparações de linhagens bacterianas de uma mesma espécie, representando um instrumento eficaz na avaliação da

diversidade genética. Além disso, a determinação de genótipos em epidemias, surtos ou casos esporádicos por esta técnica pode auxiliar na investigação da fonte de infecção, permitindo assim uma tomada precoce medidas de controle e prevenção (Liu *et al.*, 1999 ; Belkum *et al.*, 2007).

Depois de mais de 20 anos desde o seu desenvolvimento e uso como um método de genotipagem, o PFGE continua a ser o mais comumente empregado para avaliar relações epidemiológica para a maioria das bactérias clinicamente relevantes (Goering, 2010).

Esta longevidade como um "padrão ouro" é devido a uma série de fatores. Apesar de nem todas as alterações genéticas serem detectadas por este método, a soma dos tamanhos de fragmentos visíveis pelo PFGE representa mais de 90% do genoma total de uma bactéria. Assim, este método proporciona, de forma visual, um acompanhamento geral do DNA genômico; pode ser realizado com métodos padronizados por uma rede internacional de saúde pública e agências laboratoriais coordenado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), chamada de *Pulsenet* (Swaminathan *et al.*, 2001) e permite a comparação de padrões de DNA entre diferentes laboratórios em diferentes regiões do mundo.

O PFGE apresenta um alto poder discriminatório para análise da diversidade genética do *V.cholerae* O1 e O139 (Pichel *et al.*, 2003). Este método é usado com sucesso para o monitoramento da dissiminação do patógeno, na emergência de novos clones, para a relação genética entre os isolados clínicos e ambientais e para distribuição geográfica dos clones (Dagsgaard *et al.*, 1997; Arakawa *et al.*, 2000; Islam *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008 ; Zhou *et al.*, 2010).

Quando o PFGE é comparado com outros métodos utilizados para genotipagem do *V.cholerae*, este apresenta maior sensibilidade na distinção entre isolados do que o AFLP (Zhou *et al.*, 2010), a Ribotipagem (Zhou *et al.*, 2009), e o RAPD (Chen *et al.*, 2004).

Na sua maioria, os estudos sobre a diversidade genética do *V.cholerae* são realizados com isolados clínicos dos sorogrupos O1 e O139, oriundos de regiões endêmicas para cólera, e identificam clones relacionados a surtos e casos esporádicos de diversas partes do mundo (Cameron *et al.*, 1994; Mahalingam *et al.*, 1994; Dalsgarrd *et al.*, 1997; Kan *et al.*, 2003; Pichel *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2005; Keddy *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2009; Partida & Quilici, 2009). Por outro lado, outras pesquisas analisam a relação genética entre o sorogrupo O1 de procedência

clínica e ambiental (Zo *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2004), entre NAGs e os sorogrupos patogênicos (Sharma *et al.*, 1998; Danin-Poleg *et al.*, 2007; Sing *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2010; Pourshafie *et al.*, 2002) e o surgimento de novas linhagens e de híbridos e suas relações genéticas com os sorogrupos O1 e/ou O139 (Ansaruzzaman *et al.*, 2007; Safa *et al.*, 2005; Pichel *et al.*, 2003).

1.2.7 Emergência de *V.cholerae* Resistente a Antimicrobianos

O Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) é utilizado rotinamente em microbiologia clínica com o objetivo de descrever a capacidade que uma droga em determinada concentração possui de inibir o crescimento de bactérias em cultura. A utilização do TSA é essencial para a escolha do agente a ser utilizado na terapia do doente. Diversos métodos laboratoriais foram descritos e atualmente são utilizados para determinação da sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Entre os mais utilizados podemos citar os métodos de disco-difusão, microdiluição em caldo (MIC), diluição em ágar, metodologia do *Eteste* e os métodos automatizados (Mimica *et al.*, 2008).

Houve, nos últimos anos, um grande avanço no desenvolvimento de métodos automatizados para a realização de TSA, este foi impulsionado pela necessidade de uma redução no tempo de execução e conseqüente rapidez de liberação dos resultados. Existem vários equipamentos, entre os mais utilizados estão o Vitek (bioMérieux Vitek, EUA), MicroSacan Walkaway (Dade, EUA), ATB-plus (BioMérieux-França) e Sensitire ARIS (Radiometer America, EUA). O alto custo dos métodos automatizados faz com que sejam adotados apenas por laboratórios de referência (Mimica *et al.*, 2008)

Em muitos laboratórios o método de disco-difusão em ágar (Bauer *et al.*, 1966) é utilizado rotineiramente e apresenta como vantagem a sua flexibilidade na escolha dos antimicrobianos, seu baixo custo e sua constante padronização metodológica pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*). Este método é utilizado para medir a capacidade de uma droga em inibir o crescimento bacteriano. O resultado do teste revela o aparecimento de uma zona de inibição próximo ao disco, maior ou menor de acordo com a sensibilidade que o isolado apresenta a droga testada. Segundo este teste as bactérias podem ser classificadas em sensíveis, intermediários e resistentes. Com o objetivo de monitorar a precisão e

acurácia dos procedimentos envolvidos, verificar a qualidade dos meios de cultura e dos antimicrobianos empregados é de fundamental importância uso de controles com cepas padrões (*American Type Culture Collection- ATCC*). Isto torna possível a determinação, para cada antimicrobiano, de um diâmetro mínimo para a zona de inibição que denota susceptibilidade (CLSI, 2009).

O padrão de resistência do *V.cholerae* não é uniforme, vários estudos têm relatado que este padrão depende da fonte e localização geográfica do isolado. Surtos de cólera provocados por isolados multidrogas resistentes têm sido referidos e o principal fator envolvido no desenvolvimento e disseminação dessa resistência é o uso indiscriminado de vários agentes antimicrobianos (Dalsgaard *et al.*, 2000, Campos *et al.*, 2008, Keramat *et al.*, 2008).

Os principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelo *V. cholerae* estão associados a genes codificados por plasmídios, mutação na região que determina a resistência à quinolonas, integrons de classe I, II e III, sistema de efluxo RND (*RND efflux system*), que é o sistema de transporte encontrado em bactérias Gram-negativas, e atua sinergicamente com a membrana externa inibindo o acúmulo de substâncias tóxicas no interior da célula bacteriana, dessa forma, contribuindo para a resistência antimicrobiana intrínseca e elemento STX que é um elemento genético auto-transmissível de 62 kb, que carrega genes associados à resistência ao cloranfenicol (*flor*), ao sulfametoxazol (*suII*), a estreptomicina (*etrA*) e ao trimetoprim (*dfra1*). Outro elemento genético associado à resistência é o plasmídio conjugativo *IncC* (Falbo *et al.*, 1999; Hohhut *et al.*, 2001; Amita *et al.*, 2003; Burrus *et al.*, 2004; 2006; Shi *et al.*, 2006; Dubois *et al.*, 2007; Bina *et al.*, 2008; Opitan *et al.*, 2008; Scrascia *et al.*, 2009; Puglise *et al.*, 2009).

No Brasil, até meados de 1993, ainda não tinha sido detectado isolados de *V.cholerae* com múltipla resistência, e somente no final desse ano foram reveladas amostras desses isolados. Hofer *et al.* (1999), relataram que de 7.058 amostras de *V. cholerae* isoladas de pacientes com suspeita de síndrome coleriforme, no Estado do Ceará, no período de 1991- 1993 dois isolados apresentaram características de múltipla resistência aos antimicrobianos: tetraciclina, ampicilina, eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprima e ao composto vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina). Além disso, esses autores descreveram que apenas o sorogrupo O1, biotipo El Tor e sorovar Inaba apresentaram multirresistência à

tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima e a pteridina, que era codificada por um plasmídeo.

Um estudo feito por Melo *et al.* (2005) no Estado do Rio Grande do Norte analisou 104 isolados de *V. cholerae* de pacientes com diarreia colérica, em 1999, quanto à sensibilidade à oito antimicrobianos (polimixina, tetraciclina, cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfazotrin, perfloxacina, eritromicina, ampicilina). A maioria das amostras foram resistentes a nitrofurantoína, uma à ampicilina e todas a polimixina.

Um estudo de vigilância ambiental realizado em Belém/PA, no período de 1999 a 2006, analisou 750 amostras de esgotos e água superficiais, e 34,8% das amostras foram positivas para *V. cholerae* não O1 e não O139 e 11,8% para *V. mimicus*. Quanto ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados se mostraram resistentes eritromicina, uma resistente à tetraciclina e dois apresentaram comportamento intermediário frente à ampicilina (Sá *et al.*, 2007).

Esses estudos realizados vêm reforçar a posição do Ministério da Saúde, quanto à orientação para execução do antibiograma nas amostras de *V. cholerae* O1 isolados de processos entéricos, do ambiente e de alimentos, como medida de vigilância e prevenção do aparecimento de formas resistentes (Campos *et al.*, 2008; Brasil, 2009).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Determinar a caracterização molecular dos isolados clínicos e ambientais de *V. cholerae* O1 e não O1 sacarose negativa isolados durante a epidemia de cólera dos Estados Pará, Amapá e Amazonas, ocorridas no período de agosto de 1994 a novembro de 1995.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Descrever o perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de *V. cholerae* O1 e não-O1 sacarose negativa selecionados para o estudo.
- Caracterizar fenotipicamente os isolados de *V.cholerae* O1 e não-O1 quanto ao tempo de fermentação da sacarose.
- Pesquisar a presença dos genes de virulência *ctxAB* e *tcpA* de *V. cholerae* O1 e não O1 sacarose negativa isolados clínicos e de ambientes.
- Determinar a variabilidade genética de *V. cholerae* O1 e não O1 sacarose negativa.
- Avaliar e comparar o perfil genotípico e a presença de genes de virulência de *V. cholerae* O1 e não O1 sacarose negativa, considerando a distribuição espacial e cronológica dos isolados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas-MS, atendendo a Resolução 196-1996 do Conselho Nacional de Saúde com o parecer de aprovação nº 035/2010.

2.2 AMOSTRAGEM

Foram selecionadas amostras de *V. cholerae* O1 e não O1 sacarose negativa disponibilizadas na bacterioteca da Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI) do Instituto Evandro Chagas (IEC). As amostras foram encaminhadas pelos Serviços de Vigilância Epidemiológica das Secretarias de Saúde dos Estados do Pará, Amapá e Amazonas para confirmação diagnóstica (identificação bioquímica e sorológica).

Foram avaliadas 133 amostras clínicas de *V. cholerae* O1 (131) e não O1 (2) sacarose negativa isoladas entre agosto de 1994 a novembro de 1995 de processos entéricos humanos dos Estados do Pará, Amapá e Amazonas (Quadro 1 e Anexo 1) e 5 isolados de ambiente aquático do Estado do Amapá (1994). As amostras foram selecionadas considerando os aspectos tempo e espaço. O critério de seleção dos isolados segundo o tempo teve como base o surgimento do *V.cholerae* não fermentador da sacarose em agosto de 1994 e o seu desaparecimento em novembro de 1995.

Quadro 1 - Descrição das amostras de *V.cholerae* de procedência clínica e ambiental utilizadas no estudo.

| Procedência | Sorogrupo | Número de isolados | Estado | Total |
|-------------|--------------------------|--------------------|----------|-------|
| Clínicas | <i>V.cholerae</i> O1 | 106 | Pará | 131 |
| | | 17 | Amapá | |
| | | 8 | Amazonas | |
| | <i>V.cholerae</i> não O1 | 2 | Amapá | 2 |
| Ambientais | <i>V.cholerae</i> O1 | 1 | Amapá | 5 |
| | <i>V.cholerae</i> não O1 | 4 | | |

No Estado do Pará as amostras foram provenientes de 33 municípios (Quatipuru, Cametá, Vigia, Breves, Almerim, Bagre, Belém, Igarapé-Miri, Maracanã, Colares, Santa Cruz do Arari, Chaves, Afuá, Santarém, Prainha, Acará, Moju, Curuçá, Ponta de Pedras, Limoeiro do Ajuru, Óbidos, Castanhal, São Caetano de Odivelas, Ananindeua, Mocajuba, Primavera, Bragança, Marapanim, Melgaço, Salinópolis, Portel, Augusto Corrêa e Oeiras do Pará). No Estado do Amazonas foram procedentes dos municípios de Manaus, Manacapuru, Codajás, Carreiro da Várzea, Humaitá, Nova Olinda e Lábrea e do Estado do Amapá as amostras são oriundas somente do município de Macapá (Figura 6).

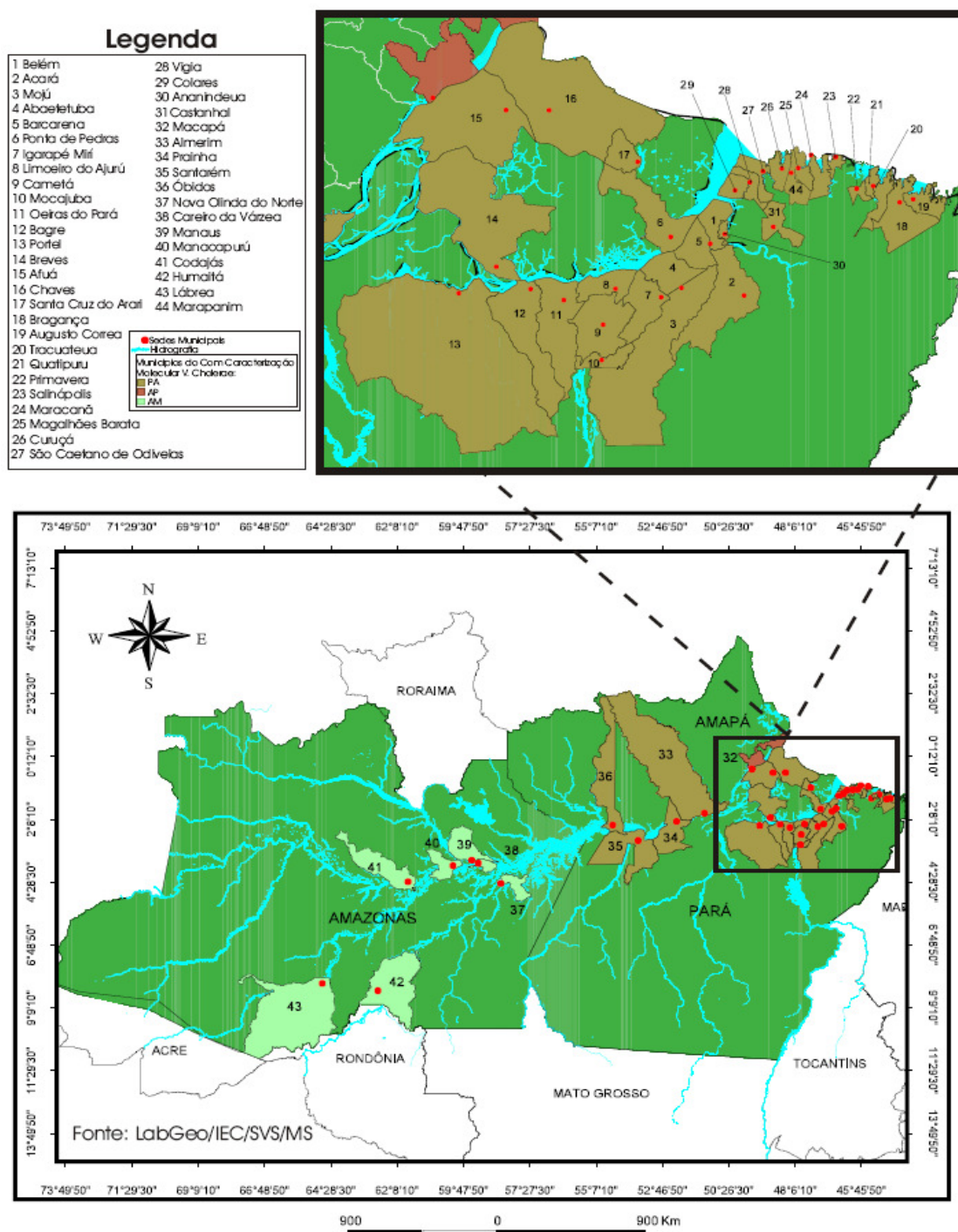


Figura 6 - Mapa destacando os Estados e municípios de onde são provenientes as amostras deste estudo.

2.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

2.3.1 Reisolamento, Reidentificação e Manutenção das Culturas de *V. cholerae* O1

As amostras foram enriquecidas em Água Peptonada Alcalina (APA, pH 8.5, Difco, USA) e após 6-8 horas a 35 °C, foram semeadas em meio seletivo indicador, ágar TCBS (Tiosulfato Citrato Bile Sacarose, Difco, USA). Em seguida colônias sacarose negativa (verde), foram repicadas para meios de triagem Kligler (Difco, USA) e LIA (Difco, USA) e incubadas a 35-37°C, durante 18-24 horas. Os isolados foram submetidos a testes bioquímicos (fermentação de glicose, lactose, sacarose, VM/VP, motilidade, Indol, Citrato, utilização de aminoácidos) (Baumann *et al.*, 1984), prova de oxidase e sorologia, utilizando antisoros polivalente O1 (Probac do Brasil, BR) e monovalente Inaba e Ogawa (Difco, USA).

As culturas puras de *V. cholerae* O1 foram armazenadas em tubos de criopreservação de dois ml contendo caldo Luria Bertani (LB) (Difco, USA) acrescido com glicerol a 20% e congelados em *freezer* a temperatura de - 70°C, bem como, em tubos 12X75mm contendo ágar Luria (Difco, USA) vedados com rolhas de borracha e parafinados, e mantidos na Bacterioteca do Instituto Evandro Chagas, constituindo assim as amostras estoques.

2.3.2 Análise da Sensibilidade aos Agentes Antimicrobianos

A sensibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados de *V. cholerae* O1 sacarose negativa foi avaliada utilizando o método de difusão pelo sistema de discos de acordo com Bauer *et al.* (1966), observando as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (2009). No antibiograma foram utilizados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacino (5 µg) e nitrofurantoína (300 µg) (Oxoid, Cambridg, UK). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle da potência dos discos (Quadro 2).

Quadro 2 - Agentes antimicrobianos, concentrações e padrão interpretativo que foram utilizados para teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

| Grupo | Antimicrobiano | Concentração | Halo de Inibição (mm) | | |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------|-----|
| | | | R | I | S |
| Penicilina | Ampicilina (AM) | 10 µg | ≤13 | 14-16 | ≥17 |
| Tetraciclina | Tetraciclina (TC) | 30 µg | ≤14 | 15-18 | ≥19 |
| Inibidor do Folato | Sulfametoxazol/ Trimetoprim (SXT) | 23,75 µg / 1,25 µg | ≤10 | 11-15 | ≥16 |
| Fenicóis | Cloranfenicol (CL) | 30 µg | ≤12 | 13-17 | ≥18 |
| Nitrofuranos | Nitrofurontoína (NI) | 300 µg | ≤14 | 15-16 | ≥17 |
| Quinolonas | Ciprofloxacino (CP) | 5 µg | ≤15 | 16-20 | ≥21 |

Fonte: CLSI, 2009.

2.3.3 Avaliação do tempo de fermentação da sacarose

Os isolados foram avaliados quanto ao tempo de fermentação da sacarose em meio líquido (*Phenol red sacchorese Broth*, Difco Laboratories, USA). Em tubos de rosca de 13x100 mm foram distribuídos sete ml da solução (camada alta). A padronização do inóculo foi feita da seguinte maneira: cada isolado foi enriquecido em APA, seguido de incubação entre 35° a 37°C, durante 6 a 8 horas; A partir desse crescimento, foi ajustado a turbidez para 0,5 na escala de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Posteriormente, foi inoculado 10 µl (alça calibrada) na solução de sacarose. Seguida de incubação em (35° a 37°C) até viragem do indicador do pH. Os horários de incubação foram anotados e os tubos foram observados por 30 dias.

Para controle de qualidade utilizamos um controle positivo (ATCC de *V. cholerae* 14035), um controle negativo (*Shigella flexneri* ATCC 25931) e branco (solução de sacarose).

Também houve avaliação da fermentação da sacarose no meio preconizado pelo Ministério da Saúde para isolamento e identificação do *V.cholerae* O1, o ágar TCBS. A fermentação neste foi observada por 24 horas.

2.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Pesquisa de Genes de Virulência do *V.cholerae*

O DNA total foi extraído dos isolados pelo método de “fervura e congelamento” (Baloda *et al*, 1995), sem adição de lisozima. Os fragmentos dos genes selecionados foram amplificados pela PCR utilizando iniciadores e condições previamente descritas (Quadro 3) . Cada reação de amplificação teve um volume final de 25 µl, contendo 1µl de DNA, tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl,-pH 8,2, 50 mM KCl, 1,5mM MgCl₂- Neo Taq), dNTP 1,5mM (Invitrogen) , 5 pmol/ µl de cada *primer* (Bioneer) e 0,5 U de taq DNA polimerase (NeoTaq). As etapas de amplificação compreenderam: desnaturação inicial a 94º C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94º C por 45 segundos, 55º C por 1 minuto e 72º C por 45 segundos, com etapa de extensão final a 72 º C por 10 minutos.

Quadro 3 - Iniciadores utilizados para o estudo de fatores de virulência do *V.cholerae*.

| Iniciadores | Sequência (5'→3') | Gene | Produto | Ref. |
|----------------|---|-------------------------|---------|-----------------------------|
| TcpAF TcpAR | ACGATAAAGAAAACCGGTCAAGA TCTCAGTAAGATTAAGATTCGTGCC | <i>tcpA</i> | 617pb | Ogierman <i>et al</i> ,1996 |
| CT F CT R | GAGGTCTAGAATCTGCCCGATATAACT AGTGATTGATATGTTTACCATCTATCCG | <i>ctxA</i> <i>B</i> | 1568pb | Feng <i>et al</i> ,2008 |

Para visualização do produto final da PCR, todas as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1%) com brometo de etídio (1.0x10⁻⁴mg/mL) contido em uma cuba de eletroforese e submerso em tampão TEB 1X, no qual foi aplicado 8 µL do amplicon, misturado a 2 µL do corante BLUE . A corrida eletroforética foi realizada com tensão de 100V por 90 minutos. Ao final, os fragmentos foram observados em transiluminador de ultravioleta (BioImaging Systems UPV, E.U.A).

Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram mensurados, unicamente pelo tamanho do produto amplificado obtido, juntamente com o controle positivo (*V.cholerae* ATCC- 14035), controle negativo e o marcador de peso molecular de 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

2.3.5 Eletroforese Em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O perfil genético dos isolados foi determinado por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após a macro-restrição do DNA pela endonuclease *NotI* utilizando o aparelho CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segundo o protocolo padronizado (Cooper *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 1997) com algumas modificações, que contém as seguintes etapas:

2.3.5.1 Preparo da Suspensão Bacteriana

Os isolados foram semeados em placas com agar *Brain Heart Infusion*-BHI (Becton, Dickinson and Company, USA) para obtenção de colônias isoladas, seguido de incubação em estufa a 37 °C/ 24h. Após esse período foi transferido três colônias para 5 ml de caldo BHI contido em erlemayer de 25 ml. Seguido de incubação em banho-maria a 37 °C sob agitação constante até observação de turvação compatível à escala 1 de McFarland. (3×10^8 UFC/mL).

2.3.5.2 Preparação e Montagem dos Blocos de Agarose

Atingida a turvação desejada, o caldo foi transferido para os tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL e centrifugado por 2 minutos a 8.000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* formado foi adicionado 300 µL de solução salina a 0,85% e 300 µL de agarose Nusieve GTG 2% (FMC, USA). A mistura foi distribuída em molde e mantida a 4°C por 20 minutos. Os blocos foram transferidos para tubos cônicos de 12x75 com tampa.

2.3.5.3 Processo de Lise Celular *in situ*

Foi adicionado aos tubos cônicos anteriormente citados 2 mL de solução de lise (NaCl 1 M, Tris-HCl 6 mM pH 7.6, EDTA 100 mM pH 8.0, Brij 58 0,5%, desoxicolato de sódio 0,2%, sarcosina 0,5%) acrescido de 0,001 g de lisozima por mL. Em seguida, foram incubados em estufa a 37 °C por 24 horas.

Após esse período a solução de lise foi substituída por 3,5 ml de solução de ESP (EDTA 0,5M pH 8.0, sarcosina 1%) contendo 0,1 mg/ml de proteinase K. Os

tubos foram incubados em banho-Maria por 18 h a 50°C. Posteriormente, os blocos foram lavados por 4X com tampão TE (TRIS-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 0.1mM pH 8,0).

2.3.5.4 Digestão do DNA Cromossomal com a Enzima de Restrição *NotI*

Com auxílio de alça bacteriológica descartável, foi transferido 1 bloco por amostra para um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL e adicionado 200 µL da solução de digestão. Os blocos foram incubados com 30 U de *NotI* (Promega, BR) a 37°C por 24 horas.

2.3.5.5 Montagem do Gel e Condições da Corrida Eletroforética

Após a digestão, os blocos foram fundidos a 80°C e aplicados, em gel de agarose a 1% (*Pulsed Field Certified Agarose*, Bio-Rad, USA) preparado com 100 mL de Tris-Boreto-EDTA (TBE 0,5X-TBE 10X, EDTA 2 mM; Tris pH 8.4, 89 mM; ácido bórico 89 mM). O tampão de corrida utilizado foi o TBE 0,5X, pH 8.

Em cada gel foi utilizado o marcador peso molecular (Lambda Ladder PFG marker/ BIOLABS New England Biolabs, MA, USA). A cepa padrão N16961 de *V.cholerae* O1 El Tor foi também usada em cada gel.

A corrida teve os seguintes parâmetros: tempo de corrida, 24 h; gradiente de voltagem, 6 V/cm; tempo de pulso inicial, 5 s; tempo de pulso final, 30 s; ângulo de inclusão, 120°.

Após o tempo de corrida o gel foi corado com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) por 30 minutos, e em seguida visualizado em transiluminador e fotografado sob luz UV.

2.3.5.6 Interpretação e Análise dos Dados do PFGE

Os padrões de PFGE obtidos neste estudo foram denominados de pulsotipos. Como as amostras foram isoladas de um surto que ocorreu entre os anos de 1994 e 1995 foi aplicado o critério de interpretação de autoria de Tenover *et. al.* (1995). As diferenças de bandas foram interpretadas de acordo com o quadro a seguir:

Quadro 4- Interpretação do PFGE segundo Tenover *et. al.* (1995).

| Nº de diferença de bandas | Nº de diferença genética | Interpretação | Significado Epidemiológico |
|---------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 0 | Indistinguível | Isolados oriundos do mesmo clone |
| 1-3 | 1 | Estritamente Relacionados | Isolados provavelmente relacionados |
| 4-6 | 2 | Possivelmente Relacionados | Isolados possivelmente relacionados |
| = >7 | = >3 | Diferente | Isolados diferentes |

As imagens dos perfis eletroforéticos gerados por PFGE foi analisado pelo software BioNumerics (version 7.1, Applied Maths/Bélgica), seguida de inspeção visual das fotografias. As imagens dos géis foram digitalizadas no formato TIFF utilizando-se o sistema de fotodocumentação, modelo *Photo-Print IP-010.SD*, Versão 10 (Vilber Lourmat, France).

As imagens foram normalizadas com um padrão de peso molecular (Lambda Ladder PFG marker/ BIOLABS New England Biolabs, Beverly, MA, USA) entre 48,5 e 436,5 kilobase.

Os percentuais de similaridades do dendograma foram obtidos pelo Coeficiente de Dice, onde foram calculados com 1,7% de tolerância utilizando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*).

2.2.5.7 Cepas de Referência Utilizadas no estudo

Foram utilizados as cepas referência de *V.cholerae* O1 biotipo El Tor N16961 (Bangladesh, 1971) e 121 (Índia, 1973) e Biotipo clássico (200) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental da Secção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas.

3 RESULTADOS

3.1 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos utilizando o método de disco- difusão foi realizado para 131 isolados clínicos de *V.cholerae* O1 (tabela 1), 2 isolados clínicos não O1, 1 isolado ambiental de *V.cholerae* O1 e 4 isolados ambientais não O1 (tabela 02) utilizando 8 diferentes antibióticos. Todos os isolados foram sensíveis para o cloranfenicol, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetropim e ciprofloxacino.

Para a ampicilina, entre os isolados clínicos O1, 29% (38/131) foram sensíveis, 8,4% (11/131) foram resistentes (IEC 1079, IEC1214, IEC207, IEC210, IEC230, IEC24, IEC538, IEC 673, IEC 680, IEC758 e IEC794) e 62,6% (82/131) foram intermediárias. Todos os isolados clínicos não O1 foram sensíveis ao referido antibiótico. O isolado ambiental O1 foi sensível a ampicilina e os não O1, 25% (1/4) foi sensível e 75% (3/4) foram intermediárias.

Para a nitrofurontoína, entre os isolados clínicos O1, 96,2% (126/131) foram sensíveis, 0,8% (1/131) foi resistente (IEC473) e 3% (4/131) foram intermediárias. Todos os isolados clínicos não O1 foram sensíveis ao antibiótico citado. O isolado ambiental O1 foi sensível a nitrofurontoína e os não O1, 75% (3/4) foram sensíveis e 25% (1/4) foi intermediária.

A Tabela 1 indica os percentuais de isolados sensíveis, intermediárias e resistentes entre os *V.cholerae* O1 e não O1 de procedência clínica e ambiental.

Tabela 1: Perfis de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados de *V.cholerae* O1 e não O1 de procedência clínica e ambiental.

| Antibacteriano | Clínicas | | | | | | | | | Ambientais | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------|------|----------|------|----------|-----|--------------------------|-----|----------|----------------------|----------|---|--------------------------|-----|----------|---|----------|---|---|-----|---|----|---|---|
| | <i>V.cholerae</i> O1 | | | | | | <i>V.cholerae</i> não O1 | | | <i>V.cholerae</i> O1 | | | <i>V.cholerae</i> não O1 | | | | | | | | | | | |
| | S | | I | | R | | S | | I | R | S | | I | R | S | | I | R | | | | | | |
| | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | <i>n</i> | % | | | | | | |
| Cloranfenicol | 131 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampicilina | 38 | 29 | 82 | 62,6 | 11 | 8,4 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 25 | 3 | 75 | 0 | 0 |
| Tetraciclina | 131 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sulfametoxol/ Trimetropim | 131 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nitrofurontoína | 126 | 96,2 | 4 | 3 | 1 | 0,8 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 75 | 1 | 25 | 0 | 0 |
| Ciprofloxacino | 131 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |

3.2 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO DA SACAROSE.

O tempo de fermentação da sacarose foi avaliado para todos os 138 isolados de *V.cholerae*. A Tabela 2 representa os tempos de fermentação do carboidrato em caldo de acordo com a procedência.

Tabela 2 -Avaliação do tempo fermentação da sacarose em caldo pelo *V.cholerae*.

| Procedência | Sorogrupo | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h |
|-------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|-------------|
| Clínicas | <i>V.cholerae</i> O1 (n=131) | 54 (41,2%) | 37 (28,2%) | 38 (29,2%) | 1 (0,7%) | 1 (0,7%) |
| | <i>V.cholerae</i> Não-O1 (n=2) | 2 (100%) | - | - | - | - |
| | <i>V.cholerae</i> O1 (n=1) | 1 (100%) | - | - | - | - |
| Ambientais | <i>V.cholerae</i> Não-O1 (n=4)* | 1 (25%) | - | - | - | - |

*Entre os isolados ambientais três não fermentaram a sacarose em 120 horas (IEC1088, IEC 1096 e IEC1099).

Também se observou a fermentação do carboidrato em ágar TCBS e todos os isolados não fermentaram a sacarose em 24 horas no referido meio (Figura 7).

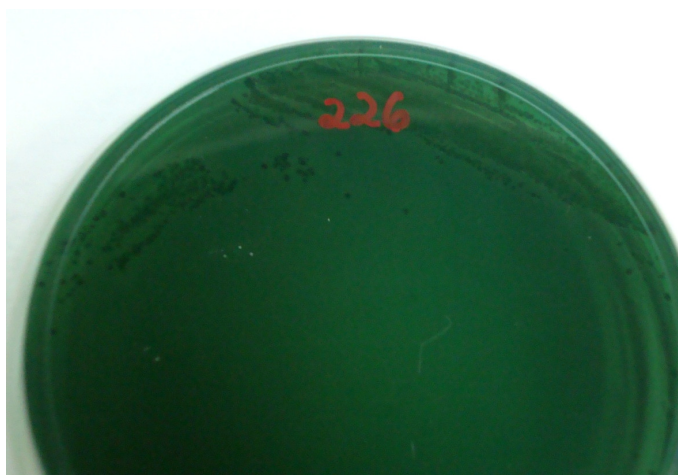


Figura 7 - Agar TCBS com colônias *V.cholerae* O1 não fermentadoras da sacarose.

3.3 DETECÇÃO DOS GENES ASSOCIADO À VIRULÊNCIA

A detecção da presença dos genes associados à virulência nos isolados de *V.cholerae* de procedência clínica e ambiental foi feita através da técnica de PCR utilizando iniciadores para as regiões *tcpA* e *ctxAB*. Em relação ao gene que codifica o *pillus* TcpA, observou-se que 96,2% (126/131) dos *V.cholerae* O1 clínicos mostraram resultado positivo (Tabela 03). Os isolados que não apresentaram amplificação para o *tcpA* entre os *V.cholerae* O1 clínicos foram: IEC 667, IEC 221, IEC 233, IEC 241 e IEC 247. Dos dois isolados clínicos de *V.cholerae* não O1, apenas uma teve resultado positivo (IEC185). Entre as ambientais, a única representante do sorogrupo O1 teve o gene amplificado (IEC 1081) e os NAGs não mostraram amplificação.

O gene *ctxAB* estava presente em 97% (127/131) dos *V.cholerae* O1 clínicos . As cepas IEC 1086, IEC1148, IEC664 e IEC788 foram as que tiveram resultado negativo para este gene.

Entre os *V.cholerae* não O1 clínicos o gene não estava presente. Entre as cepas ambientais, na representante do sorogrupo O1 (IEC1081) o gene estava presente e entre os NAGs não houve amplificação (Tabela 3).

Tabela 3 - Prevalência dos genes associados á virulência entre os *V. cholerae* de procedência clínica e ambiental.

| Procedência | Sorogrupo | n | Genes | |
|-------------|--------------------------|-----|-------------|--------------|
| | | | <i>tcpA</i> | <i>ctxAB</i> |
| Clínica | <i>V.cholerae</i> O1 | 131 | 126 (96,2%) | 127 (97%) |
| | <i>V.cholerae</i> não O1 | 2 | 1 (50%) | 0 |
| Ambiental | <i>V.cholerae</i> O1 | 1 | 1 (100%) | 1 (100%) |
| | <i>V.cholerae</i> não O1 | 4 | 0 | 0 |

Na figura 8 demonstram-se a amplificação dos genes *tcpA* e *ctxAB* nos isolados clínicos de *V.cholerae* O1.

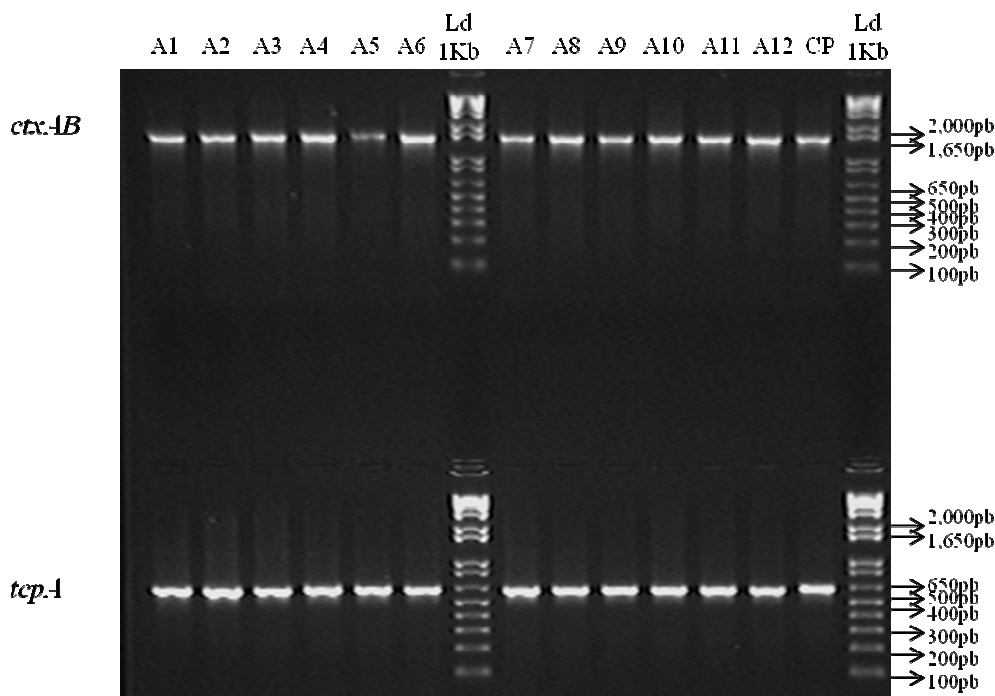


Figura 8- Amplificação por PCR de fragmento de 1568pb do gene *ctxAB* e 617 do gene *tcpA* em gel de agarose 2%. Linhas A1 a A6: amostras IEC 256, 304, 303, 285, 688 e 307. Ld : *Ladder 1 Kb plus*. Linhas A7 a A12: amostras IEC408, 402, 415, 470, 472, 473. CP: controle positivo (ATCC de *V.cholerae*).

3.4 DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Os perfis de macrorestrição do genoma do *V.cholerae* O1 e NAG (Figura 9) obtidos com a enzima de restrição *NotI* geraram de 15-18 fragmentos maiores que 48,5 kb .

A análise dos 131 isolados de *V.cholerae* O1 de procedência clínica e uma O1 de origem ambiental estão apoiados por um percentual médio de similaridade de 71,3% (Figura 10) e estes isolados apresentaram diferença de 1 a 3 bandas.

A análise dos 138 isolados de *V.cholerae* O1 e NAG de procedência clínica e ambiental geraram 22 pulsotipos. Estes estão agrupados em dois *clusters* (A e B) apoiados por um percentual médio de similaridade $\geq 65,7\%$ (figura 11).

O *cluster A* foi o que concentrou a maioria dos isolados (n=136) e contém 20 pulsotipos com 68,2% de similaridade. Este grupo abrange todos os 131 *V.cholerae*

O1 e 2 NAGs de origem clínica, 2 NAGs ambientais e um *V.cholerae* O1 ambiental, assim como, as cepas de referência de *V.cholerae* O1 El Tor (N16961 e 121). Os isolados que constituem este *cluster* são oriundas dos Estados do Pará, Amapá e Amazonas e de diferentes locais e datas de isolamento (Figura 11).

O *cluster* A está subdividido em quatro subgrupos denominados de A1, A2, A3 e A4. O subgrupo A1 (78,2% de similaridade) é constituído por 54 isolados, sendo 52 pertencentes ao sorogrupo O1 e um NAG de procedência clínica e um NAG de procedência ambiental. Estas geraram nove pulsotipos (Quadro 5). O gene da toxina colérica não estava presente em dois isolados de *V.cholerae* O1 (IEC 664 e IEC788) e o gene do *pillus* TcpA estava ausente em um isolado *V.cholerae* O1 (IEC664), ambas de procedência clínica.

Quadro 5- Característica dos isolados que constituem o *cluster* A, subgrupo A1.

| Procedência | Sorogrupo | Registro IEC | Data de Isolamento | Município | UF | ctxAB | tcpA | Pulsotipo |
|-------------|-----------|--------------|--------------------|---------------------|----|-------|------|-----------|
| Clínica | O1 | 09 | 12/1994 | Breves | PA | + | + | 1 |
| | | 303 | 04/1995 | Cametá | PA | + | + | |
| | | 415 | 05/1995 | Limoeiro do Ajuru | PA | + | + | |
| | | 448 | 05/1995 | Bragança | PA | + | + | |
| | | 450 | 05/1995 | Cametá | PA | + | + | |
| | | 470 | 05/1995 | Macapá | AP | + | + | |
| | | 472 | 05/1995 | Macapá | AP | + | + | |
| | | 522 | 05/1995 | São João de Pirabas | PA | + | + | |
| | | 538 | 05/1995 | Melgaço | PA | + | + | |
| | | 541 | 06/1995 | Salinópolis | PA | + | + | |
| | | 555 | 06/1995 | Breves | PA | + | + | |
| | | 557 | 05/1995 | Bragança | PA | + | + | |
| | | 575 | 06/1995 | Cametá | PA | + | + | |
| | | 606 | 06/1995 | Bragança | PA | + | + | |
| | | 608 | 06/1995 | Bragança | PA | + | + | |
| | | 630 | 06/1995 | Limoeiro do Ajuru | PA | + | + | |
| | | 656 | 06/1995 | Bragança | PA | + | + | |
| | | 664 | 07/1995 | Oeiras do Pará | PA | (-) | + | |
| | | 679 | 07/1995 | Curuçá | PA | + | + | |
| | | 680 | 07/1995 | Cametá | PA | + | + | |
| 688 | 04/1995 | Primavera | PA | + | + | | | |
| 684 | 07/1995 | Primavera | PA | + | + | | | |
| 707 | 07/1995 | Vigia | PA | + | + | | | |

Quadro 5- Característica dos isolados que constituem o *cluster A*, subgrupo A1 (Continuação).

| Procedência | Sorogrupo | Registro IEC | Data de Isolamento | Município | UF | ctxAB | tcpA | Pulsotipo |
|-------------|-----------|-------------------------------|--------------------|------------------------|----|-------|------|-----------|
| Clínica | O1 | 717 | 07/1995 | Chaves | PA | + | + | 1 |
| | | 748 | 07/1995 | Limoeiro do Ajuru | PA | + | + | |
| | | 751 | 07/1995 | Belém | PA | + | + | |
| | | 757 | 07/1995 | Ananindeua | PA | + | + | |
| | | 767 | 08/1995 | São Caeta. de Odivelas | PA | + | + | |
| | | 772 | 08/1995 | Quatipuru | PA | + | + | |
| | | 788 | 08/1995 | Bragança | PA | (-) | + | |
| | | 794 | 08/1995 | Vigia | PA | + | + | |
| | | 808 | 08/1995 | Chaves | PA | + | + | |
| | | 849 | 07/1995 | Monte Dourado | PA | + | + | |
| | | 1221 | 12/1994 | Monte Dourado | PA | + | + | |
| | | 473 | 05/1995 | Macapá | AP | + | + | |
| | | 654 | 06/1995 | Bragança | PA | + | + | |
| | | 667 | 07/1995 | Augusto Corrêa | PA | + | (-) | |
| | | 711 | 07/1995 | Marapanim | PA | + | + | |
| | | 579 | 06/1995 | Portel | PA | + | + | |
| | | 758 | 07/1995 | Moju | PA | + | + | |
| | | 762 | 08/1995 | Ananindeua | PA | + | + | |
| | | 771 | 08/1995 | Salinópolis | PA | + | + | |
| | | 796 | 08/1995 | Colares | PA | + | + | |
| | | 846 | 09/1995 | Vigia | PA | + | + | |
| | | 440 | 05/1995 | Marapanim | PA | + | + | |
| | | 851 | 10/1995 | Vigia | PA | + | + | |
| | | 853 | 11/1995 | Macapá | AP | + | + | 2 |
| | | 402 | 05/1995 | Breves | PA | + | + | 3 |
| | | 749 | 08/1995 | Belém | PA | + | + | 4 |
| | | 307 | 04/1995 | Ananindeua | PA | + | + | 5 |
| 24 | 12/1994 | Maracanã | PA | + | + | 7 | | |
| 37 | 01/1995 | St ^a Cruz do Arari | PA | + | + | 8 | | |
| | Não O1 | 189 | 01/1995 | Macapá | PA | (-) | (-) | 9 |
| Ambiental | Não O1 | 1096 | 08/1994 | Macapá | PA | (-) | (-) | 6 |

O subgrupo A2 apresentou similaridade de 84,6% e é constituído de 79 cepas que geraram oito pulsotipos. Este é composto exclusivamente por cepas de *V.cholerae* O1 de procedência clínicas. As cepas de referência de *V.cholerae* O1 EI

Tor (N16961 e 121) estão neste subgrupo. 72 isolados apresentaram padrão de bandas com 100% de similaridade com a cepa de referência N16961 (Figura 11 e Quadro 6). Em quatro casos (IEC221, IEC233, IEC241 e IEC247) o gene *tcpA* não foi amplificado e o gene *ctxAB* não mostrou resultado positivo em duas (IEC1086 e IEC 1148).

Quadro 6- Característica dos isolados que constituem o *cluster A*, subgrupo A2.

| Procedência | Sorogrupo | Registro IEC | Data de Isolamento | Município | UF | <i>ctxAB</i> | <i>tcpA</i> | Pulso-tipo |
|-------------|-----------|--------------|--------------------|-------------------------|----|--------------|-------------|-----------------|
| Clínica | O1 | 1 | 12/1994 | Prainha | PA | + | + | 14 (=N16961) |
| | | 1079 | 08/1995 | Cametá | PA | + | + | |
| | | 1086 | 08/1995 | Macapá | PA | (-) | + | |
| | | 1114 | 09/1995 | Macapá | PA | + | + | |
| | | 1115 | 09/1994 | Macapá | PA | + | + | |
| | | 1123 | 09/1994 | Cametá | PA | + | + | |
| | | 1126 | 09/1994 | Vigia | PA | + | + | |
| | | 1214 | 12/1994 | Belém | PA | + | + | |
| | | 1127 | 10/1994 | Breves | PA | + | + | |
| | | 1133 | 10/1994 | Bagre | PA | + | + | |
| | | 1136 | 10/1994 | Almerim | PA | + | + | |
| | | 1153 | 10/1994 | Macapá | PA | + | + | |
| | | 118 | 02/1995 | Humaitá | AM | + | + | |
| | | 1201 | 11/1994 | Macapá | AP | + | + | |
| | | 1205 | 11/1994 | Macapá | AP | + | + | |
| | | 1213 | 12/1994 | Stª Cruz do Arari | PA | + | + | |
| | | 145 | 02/1994 | Manacapuru | AM | + | + | |
| | | 15 | 12/1994 | Cametá | PA | + | + | |
| | | 159 | 10/1994 | Macapá | PA | + | + | |
| | | 177 | 12/1994 | Macapá | PA | + | + | |
| | | 18 | 01/1995 | Almerim | PA | + | + | |
| | | 186 | 12/1994 | Macapá | PA | + | + | |
| | | 191 | 01/1995 | Macapá | PA | + | + | |
| | | 199 | 01/1995 | São Caetano de Odivelas | PA | + | + | |
| | | 2 | 12/1994 | Santarém | PA | + | + | |
| | | 200 | 01/1995 | Óbidos | PA | + | + | |
| | | 204 | 02/1995 | Santarém | PA | + | + | |
| | | 207 | 02/1995 | Ananindeua | PA | + | + | |
| | | 209 | 02/1995 | Breves | PA | + | + | |
| | | 21 | 11/1994 | Igar.Miri | PA | + | + | |

Quadro 6- Característica das cepas que constituem o *cluster* A, subgrupo A2. (continuação).

| Procedência | Sorogrupo | Registro IEC | Data de Isolamento | Município | UF | ctxAB | tcpA | Pulso-tipo |
|-------------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|----|-------|------|-----------------|
| Clínica | O1 | 210 | 01/1995 | Breves | PA | + | + | 14 (=N16961) |
| | | 22 | 12/1994 | Vigia | PA | + | + | |
| | | 221 | 02/1995 | Belém | PA | + | (-) | |
| | | 224 | 11/1994 | Belém | PA | + | + | |
| | | 226 | 02/1995 | Ananindeua | PA | + | + | |
| | | 230 | 02/1995 | Santarém | PA | + | + | |
| | | 233 | 02/1995 | Limoeiro do Ajuru | PA | + | (-) | |
| | | 241 | 11/1994 | Almerim | PA | + | (-) | |
| | | 244 | 03/1995 | Mocajuba | PA | + | + | |
| | | 25 | 12/1994 | Chaves | PA | + | + | |
| | | 256 | 03/1995 | Belém | PA | + | + | |
| | | 261 | 03/1995 | Óbidos | PA | + | + | |
| | | 267 | 03/1995 | Limoeiro do Ajuru | PA | + | + | |
| | | 28 | 11/1994 | Bagre | PA | + | + | |
| | | 285 | 04/1995 | Belém | PA | + | + | |
| | | 29 | 01/1995 | Cametá | PA | + | + | |
| | | 30 | 01/1995 | Vigia | PA | + | + | |
| | | 33 | 12/1994 | Afuá | PA | + | + | |
| | | 36 | 01/1995 | Limoeiro do Ajuru | PA | + | + | |
| | | 42 | 01/1995 | Santarém | PA | + | + | |
| | | 69 | 01/1995 | Macapá | AP | + | + | |
| | | 5 | 01/1995 | Belém | PA | + | + | |
| | | 52 | 01/1995 | Chaves | PA | + | + | |
| | | 55 | 01/1995 | Manaus | AM | + | + | |
| | | 56 | 01/1995 | Maracanã | PA | + | + | |
| | | 57 | 01/1995 | Castanhal | PA | + | + | |
| | | 598 | 06/1995 | Belém | PA | + | + | |
| | | 673 | 07/1995 | Salinópolis | PA | + | + | |
| | | 7 | 12/1994 | Belém | PA | + | + | |
| | | 80 | 02/1995 | Carreiro da Várzea | AM | + | + | |
| 83 | 02/1995 | Codajás | AM | + | + | | | |
| 268 | 03/1995 | Cametá | PA | + | + | | | |
| 100 | 02/1995 | Lábrea | AM | + | + | | | |
| 108 | 02/1995 | Nova Oli. do Norte | AM | + | + | | | |

Quadro 6- Característica das cepas que constituem o *cluster A*, subgrupo A2. (continuação).

| Procedência | Sorogrupo | Registro IEC | Data de Isolamento | Município | UF | ctxAB | tcpA | Pulsotipo |
|-------------|-----------|--------------|--------------------|------------------|----|-------|------|-----------------|
| Clínica | O1 | 1120 | 10/1994 | Igarapé-Miri | PA | + | + | 14 (=N16961) |
| | | 247 | 03/1995 | Maracanã | PA | + | (-) | |
| | | 304 | 04/1995 | Breves | PA | + | + | |
| | | 408 | 05/1995 | Belém | PA | + | + | |
| | | 1200 | 10/1994 | Belém | PA | + | + | |
| | | 20 | 11/1994 | Breves | PA | + | + | |
| | | 844 | 09/1995 | Belém | PA | + | + | |
| | | 568 | 06/1995 | Santarém | PA | + | + | |
| | | 1082 | 08/1995 | Macapá | AP | + | + | 10 |
| | | 72 | 02/1995 | Manaus | AM | + | + | 11 |
| | | 838 | 06/1995 | Almerim | PA | + | + | 12 |
| | | 215 | 02/1995 | Cametá | PA | + | + | 13 |
| | | 32 | 01/1995 | Pontas de Pedras | PA | + | + | 15 |
| | | 1148 | 10/1994 | Macapá | AP | (-) | + | 16 |
| 690 | 07/1995 | Primavera | PA | + | + | 17 | | |

O subgrupo A3 foi constituído por dois NAGs (IEC1081 e IEC 1116) com 86,7% de similaridade entre si, obtidos em 1994 no município de Macapá. Estes NAGs têm distinta fonte e data de isolamento (Quadro 7).

Quadro 7- Característica dos isolados que constituem o *cluster A*, subgrupo A3.

| Procedência | Sorogrupo | Registro IEC | Data de Isolamento | Município | UF | ctxAB | tcpA | Fonte de Isolamento | Pulsotipo |
|-------------|-----------|--------------|--------------------|-----------|----|-------|------|----------------------|-----------|
| Ambienta | O1 | 1081 | 08/1994 | Macapá | AP | + | + | Rio Oiapoque | 19 |
| | Não O1 | 1116 | 09/1994 | Macapá | AP | (-) | (-) | Igarapé da Fortaleza | 20 |

O subgrupo A4 foi constituído de um isolado de *V.cholerae* não O1 de procedência clínica (IEC185), obtido em 1994 no município de Macapá. Este gerou um pulsotipo (Figura 11). Neste o gene *tcpA* estava presente e o da toxina colérica ausente.

O *cluster* B, com similaridade de 72%, foi constituído apenas de isolados de *V.cholerae* não O1 de origem ambiental (IEC1099 e IEC 1088) e a cepa de referência *V.cholerae* O1 clássico (200). A amostra IEC1099 teve 88,9 % de similaridade com a cepa de referência 200. Neste *cluster* há dois pulsotipos (Figura 11). Não houve amplificação dos genes de virulência pesquisados neste estudo para estes isolados.

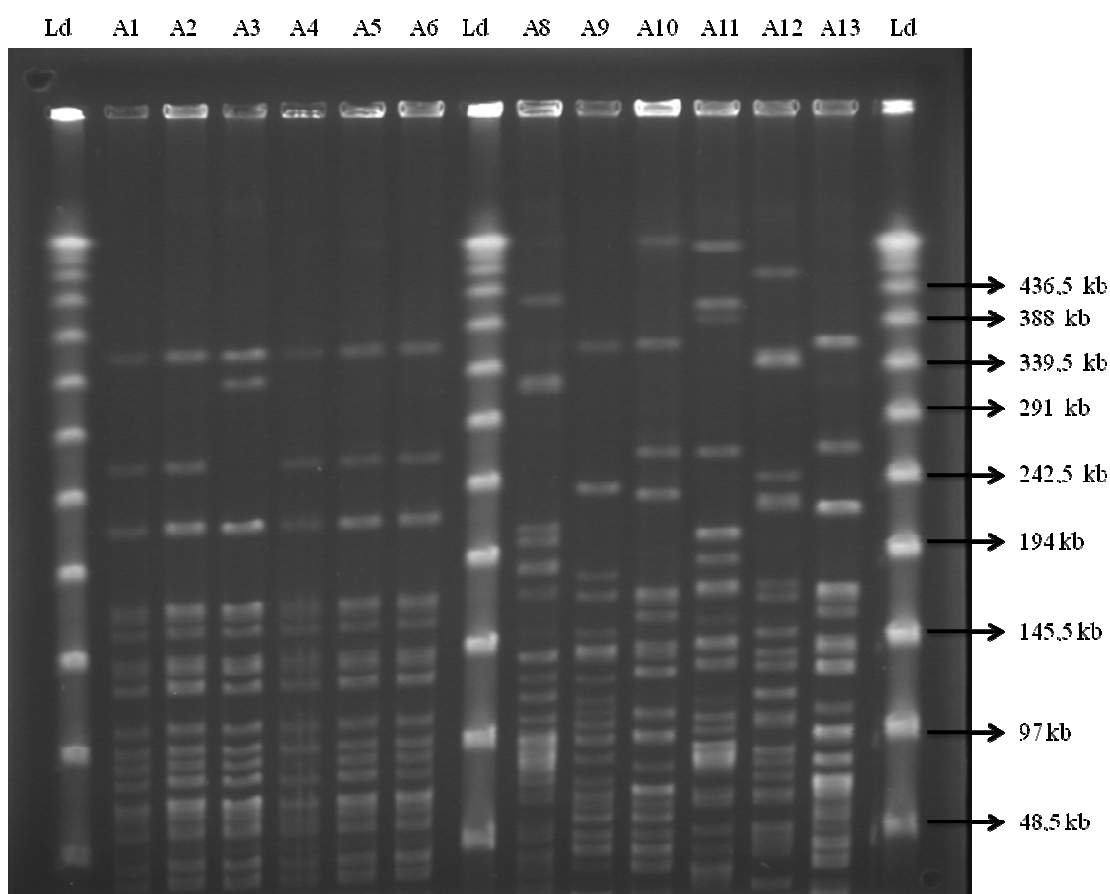


Figura 9: Padrão de bandas do PFGE gerados pela enzima de restrição *NotI* dos isolados de *V.cholerae* O1 e não O1 de procedência clínica e ambiental. Ld: *Ladder* (*Lambda Ladder PFG marker*). Linhas A1 a A6 (*V.cholerae* O1 de origem clínica): IEC 849, 664, 690, 673, 684 e 707). Linhas A8 a A12 (*V.cholerae* não O1 de origem ambiental): IEC 1099, 1116, 1081, 1088 e 1096. Linha A13: Cepa de referência *V.cholerae* O1 El Tor N16961.

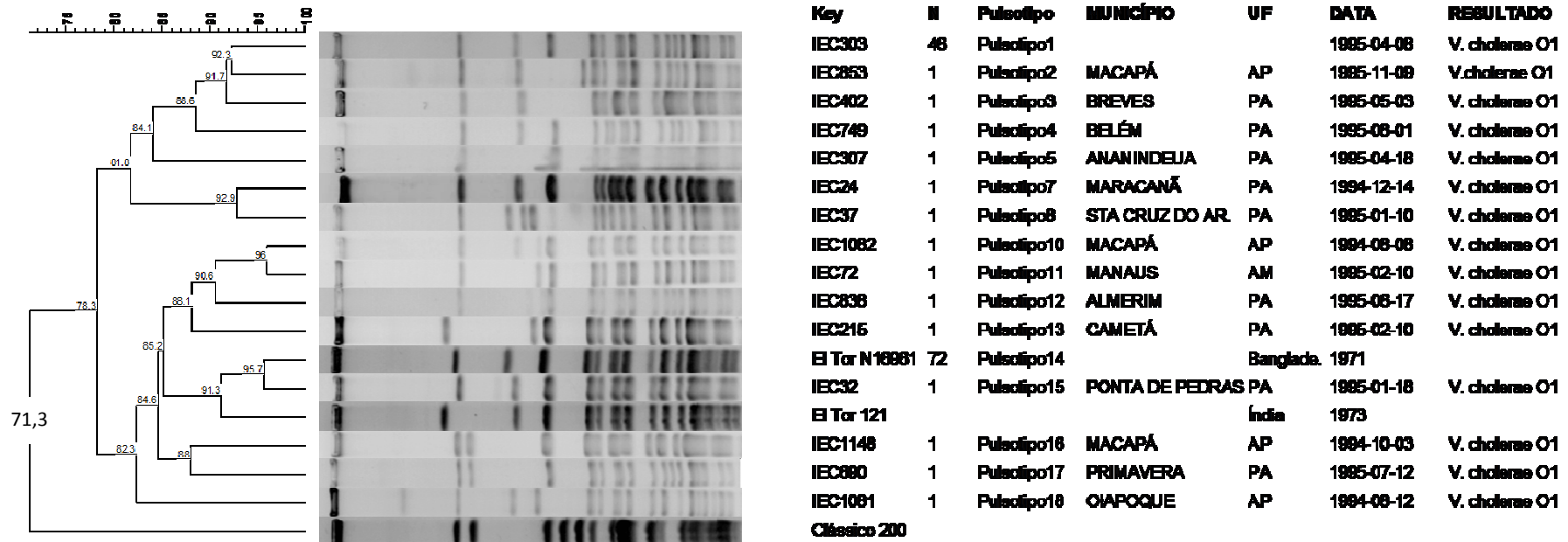


Figura 10: Relação genética entre os isolados de *V.cholerae* O1 não fermentador da sacarose de procedência clínica ambiental e as cepas de referência *V.cholerae* O1 El Tor (N16961 e 121) e clássico (200). O Dendrograma foi construído com os padrões de digestão da enzima *NotI* (pulsotipos) e foi gerado pela análise do programa *Bionumerics* usando UPGMA e coeficiente de Dice igual a 1,7%.

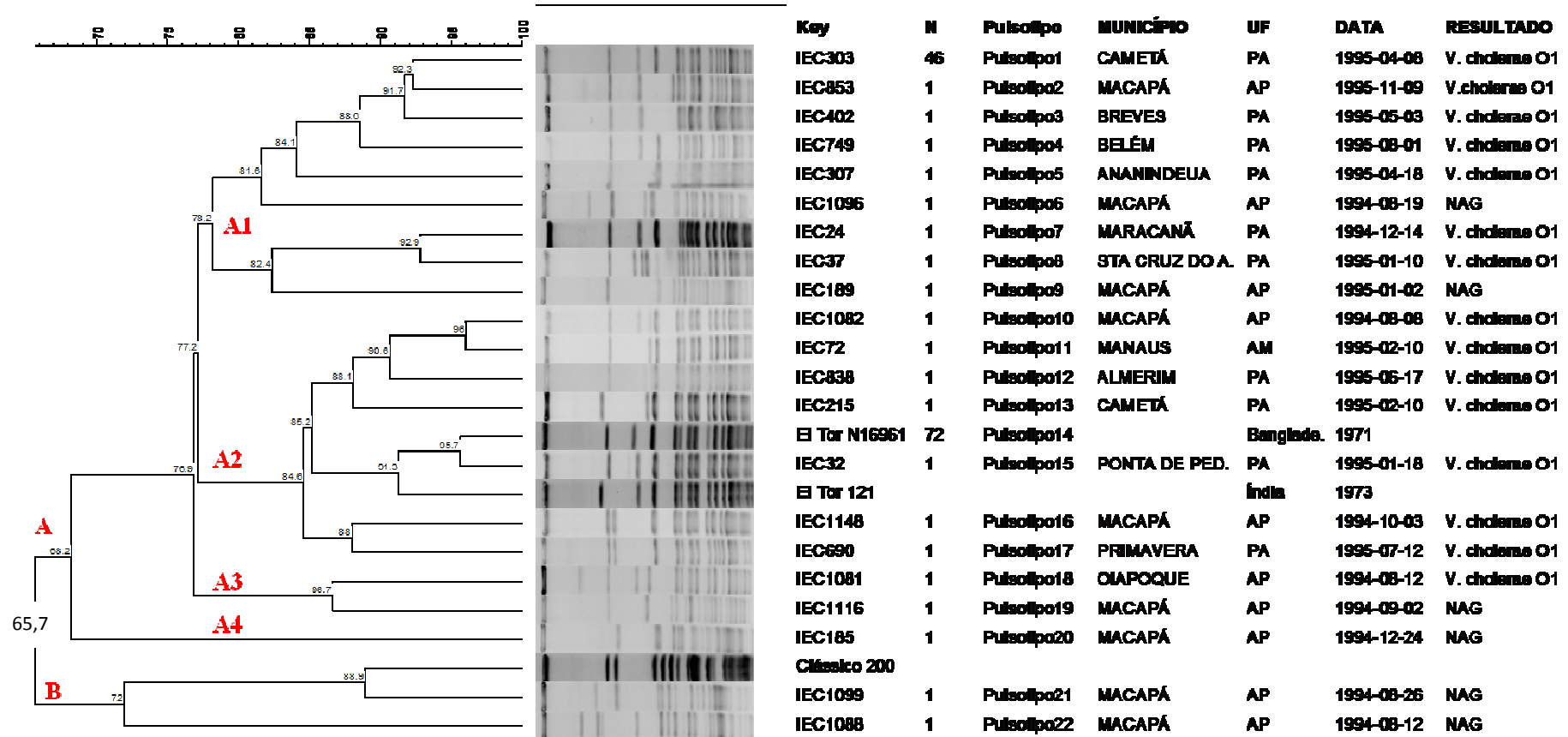


Figura 11: Relação genética entre os isolados de *V. cholerae* O1 e não O1 não fermentador da sacarose de procedência clínica e ambiental e as cepas de referência *V. cholerae* O1 El Tor (N16961 e 121) e clássico (200). O Dendograma foi construído com os padrões de digestão da enzima NotI (pulsotipos) e foi gerado pela análise do programa Bionumerics usando UPGMA e coeficiente Dice igual a 1,7%.

4. DISCUSSÃO

Um importante achado observado por Ramos *et al.* (1997) que identificaram 644 casos de cólera ocorridos nos anos de 1994 e 1995, causados por *V.cholerae* O1 não fermentador da sacarose no TCBS, serviu de alerta às autoridades dos serviços de vigilância epidemiológica e laboratorial do Brasil, no entanto estes casos ficaram restritos a região Norte.

Apesar da ocorrência inusitada de uma variante fenotípica de *V.cholerae* O1 entre 1994 e 1995 e da sua importância na identificação laboratorial, o manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera do Ministério da Saúde passou por uma ampla revisão e a versão atual publicada em 2008 faz a seguinte orientação para o isolamento e identificação do *V.cholerae* O1: “Após semeio em ágar TCBS por 18 a 24 horas, selecionar 5 a 10 colônias típicas, sacarose-positivas: colônias amarelas, circulares, de 2 a 3 mm de diâmetro, brilhantes e convexas”. O documento oficial não faz qualquer referência ao fato da existência de uma variante bioquímica do *V.cholerae* O1, que é de extrema importância para vigilância epidemiológica e laboratorial da doença.

Na concepção da vigilância epidemiológica, o laboratório desempenha um papel de relevância não só no levantamento das infecções provocadas pelas enterobactérias, mas, principalmente, no diagnóstico bacteriológico das primeiras evidências de circulação do *V. cholerae* (amostras clínicas, ambientais e de alimentos) e na monitorização das diarreias e do ambiente, após o restabelecimento do silêncio epidemiológico (Brasil, 2008). Por tal razão, é de suma importância o estabelecimento de uma rede de laboratórios, com pessoal habilitado na execução do diagnóstico etiológico das infecções intestinais e com capacidade suficiente para isolar e identificar o *V.cholerae* O1 e suas variantes. A ausência disto pode levar a sérios problemas no controle da cólera.

O resultado deste estudo confirma o observado por Ramos *et al.*(1997), em que o *V.cholerae* O1 não fermenta a sacarose em agar TCBS em 24 horas de incubação. No entanto, quando a fermentação foi feita em caldo observamos que 43% utilizaram a sacarose em tempo inferior ou igual a 24 horas, 27 % em 48 horas, 28% em 72 horas e 1% em 96 e 120 horas. Na literatura há poucos relatos de cólera que tem como agente etiológico variante bioquímica de *V.cholerae*.

Ansaruzzaman *et al.*(1995) observou cepas de *V.cholerae* O139 não fermentadoras da sacarose no TCBS e que fermentavam tardiamente (72 horas) quando eram testadas em caldo de 1% da sacarose. Wei *et al.*(2008) relatou surto da doença causada por variantes *V.cholerae* não O1 e não O139 que não fermentavam a sacarose no TCBS e eram β -galactosidase deficientes. Não é conhecido o exato mecanismo que resulta na emergência dessas variantes, mas sabe-se que o ambiente aquático tem um importante papel na persistência, disseminação, evolução e transmissão destes agentes para humanos (Colwell, 1994; Alam *et al.*, 2007). E que, o provável motivo do surgimento e não persistência desta variante pode ser devido à falta de adaptabilidade às condições físico-químicas e biológicas do ambiente amazônico (Merrell *et al.*, 2002; Sá, 2009).

A disseminação da resistência aos antimicrobianos tem sido reconhecido pela OMS como um problema extremamente grave, uma vez que complica enormemente o tratamento de doenças infecciosas. No caso da cólera, embora a base do tratamento seja a reidratação oral, a terapia antimicrobiana nos casos graves é obrigatória para reduzir o volume das fezes e encurtar a duração da doença (Hossain *et al.*, 2002; Ghosh & Ramamurthy, 2011).

O agente etiológico da doença, o *V. cholerae*, permaneceu sensível à maioria das drogas por um longo período. Em uma pesquisa mundial realizada em 1976, apenas 3% das amostras coletadas ao acaso foram resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados (O'Grady *et al.*, 1976). Devido ao uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos, este cenário mudou rapidamente. Hoje, as cepas de *V.cholerae* isoladas pelo mundo são resistentes a múltiplos antimicrobianos (Falbo *et al.*, 1999; Hofer *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2006; Okeke *et al.*, 2007; Bina *et al.*, 2008; Opitan *et al.*, 2008, Puglise *et al.*, 2009).

O presente estudo não identificou nenhuma cepa com múltipla resistência, o que discorda das informações dos trabalhos publicados que revelam grande preocupação com este resultado no antibiograma. Os isolados de *V.cholerae* O1 não fermentador da sacarose no TCBS apresentaram baixo percentual de resistência aos antimicrobianos 8,7% (12/138), sendo 8% resistente a ampicilina e 0,7 % a nitrofurantoína, revelando somente perfil de monoresistência. Porém, foi observado que em 62% das cepas apresentavam o perfil intermediário frente a ampicilina. Este resultado torna-se interessante , uma vez que a ampicilina é a droga de primeira escolha terapêutica para gestantes e nutrízes, já que a tetraciclina atravessa a

placenta e causam descoloração permanente dos dentes, hipoplasia do esmalte e inibição do crescimento ósseo do feto

(Rang, 2000). O elevado número de isolados com perfil intermediário servem de sinais de alerta para uma melhor vigilância no surgimento de amostras resistentes (Rodriguez *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002).

É interessante que apesar da aplicação em larga escala da terapia com a tetraciclina nas áreas epidêmicas de cólera, particularmente na África, e preconizado para o tratamento de pessoas com oito ou mais anos no Brasil, o fenômeno da resistência ao fármaco neste estudo não foi observado, embora na literatura, fortuitamente se registrem surtos provocados por formas resistentes (Mandomando *et al.*, 2007; Okeke *et al.*, 2007; Roychowdhury *et al.*, 2008).

Apesar de *V. cholerae* O1 e O139 permanecerem como os únicos causadores conhecidos de cólera, vários trabalhos sugerem que os NAGs estão sendo associados com casos isolados e surtos de cólera ou diarreia muito semelhante à cólera em muitos países (*cholera-like*) (Dalsgaard *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1998; Dalsgaard *et al.*, 1999; Kamble *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2009).

Um grande número de pesquisas tem se concentrado na identificação e regulação dos fatores de virulência do *V. cholerae* O1 e O139 (DiRita, 1992; Kaper *et al.*, 1995; Faruque *et al.*, 1998; Krukoniš & DiRita, 2003). No entanto, fatores de virulência do *V. cholerae* não O1 e não O139 diarreio-gênicos ainda não estão completamente elucidados.

O potencial patogênico do *V. cholerae* O1 e O139 é devido em especial, a toxina colérica (CT) e o *pillus* TCP. A CT é codificada pelo genes *ctxAB* que está incluído no genoma do bacteriófago filamentosso lisogênico CTX Φ (Waldor & Mikalanos, 1996). A toxina coreguladora de pilus TCP desempenha um papel crucial no processo de colonização intestinal (Chatterjee *et al.*, 2009). Os genes necessários para codificar o *pillus* TCP estão localizados dentro de um conjunto de genes conhecido como Ilha de Patogenicidade do *Vibrio* (VPI) (Karaolis *et al.*, 1998, Kovach *et al.*, 1996). Além do seu papel na colonização intestinal, o *pillus* TCP também age como receptor para o fago CTX Φ (Waldor & Mikalanos, 1996).

Ao contrário das linhagens patogênicas (O1 e O139), os NAGs geralmente são desprovidas dos genes *ctxAB* e VPI. Neste estudo foi observado que entre os isolados clínicos O1 os genes *ctxAB* e *tcpA* não estavam presentes em 3% (4/131) e 3,8% (5/131), respectivamente. Isto, de acordo com Somerville *et al.*, (2002) pode ter

acorrído pela perda de parte dos genes destes óperons, em função dos seguidos repiques realizados no laboratório.

Neste trabalho foi observado um isolado clínico NAG *tcpA*⁺ (IEC185). De acordo com alguns pesquisadores os potenciais fatores de virulência dos NAGs clínicos inclui hemolisinas, toxina termo-estável, toxina semelhante Shiga (*Shiga-like*) e a toxina RTX (Dalsgaard *et al.*, 1995; 2001; Saha *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 1999; Guhathakurta *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999). Foi sugerido também que esses NAGs possuíam um VPI alterado com variantes alélicas nos genes *tcpA* e *toxT* (Chatterjee *et al.*, 2009).

Por isso, tem sido sugerido que os NAGs atuariam como reservatórios ambientais de genes de virulência para linhagens potencialmente epidêmicas emergentes (Rivera *et al.*, 2001, Singh, *et al.*, 2001).

Neste trabalho foi estudada a diversidade genética dos isolados de *V. cholerae* O1 não fermentador de sacarose no TCBS, identificados durante a última pandemia que atingiu o Brasil. Não foi observada grande diversidade genética entre as amostras estudadas. Os isolados de *V. cholerae* O1, de procedência clínica e ambiental, independente da data, local de isolamento e presença de fatores de virulência, de acordo com os critérios de Tenover *et al.* (1995) estão estritamente relacionados, sugerindo que essa variante bioquímica foi oriunda da expansão do clone da sétima pandemia asiática. (Wachsmuth *et al.*, 1991; Faruque & Albert, 1992; Wachsmuth *et al.*, 1993). As amostras de referência N 16961 e 121, ambas do biótipo El Tor agruparam com estas amostras e constituíram o grupo A.

Convém ressaltar, que houve agrupamento de dois NAGs de origem ambiental (IEC1096 e IEC1116) com o *cluster* que contém os isolados toxigênicos. Este interessante fato também foi observado por Sing *et al.* (2001) na Índia.

Foi demonstrado que NAGs estão envolvidos com a emergência de novos isolados patogênicos e isto é decorrente da transferência horizontal de genes que ocorre entre as espécies de *Vibrio* (Karolis *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2001).

Também no *cluster* A foi agrupado um NAG de origem clínica (IEC185) com *tcpA*⁺ e *ctxAB*⁻, porém com baixa relação genética (68,2%) com os restantes dos subgrupos. Corroborando, deste modo, com estudos que indicam a habilidade de alguns *V. cholerae* não 1 e não O139 em causar diarreia por mecanismos inteiramente diferente dos sorogrupos O1 e O139 (Dalsgaard *et al.*, 1995;1999; Sharma *et al.*, 1998; Kamble *et al.*, 2000; Sing *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2009).

Estudar o padrão desses NAGs fornece informações úteis sobre a evolução do patógeno.

Os resultados indicam que os isolados de *V.cholerae* clínicos mostraram padrão do PFGE, aqui denominados de pulsotipos, semelhante a uma amostra do sorogrupo O1 (IEC1081) e duas NAGs (IEC1096 e IEC1116) de procedência ambiental. Isso suporta a hipótese de Colwell & Huq (1995) de que isolados de *V.cholerae* são autóctones do ambiente aquático e que esse ambiente serve como reservatório para *V.cholerae* toxigênicos (O1 e O139) e não toxigênicos (não O1 e não O139).

Dois NAGs ambientais (IEC1999 e IEC1088) tiveram relação genética distante dos isolados de *V.cholerae* O1. Ambos foram obtidos no município de Macapá-AP e apresentam o mesmo padrão de virulência (*tcpA*⁻ e *ctxAB*⁻). O isolado IEC1099, está relacionado geneticamente (88,9%) a amostra de referência clássica (200), que foi a linhagem determinante da sexta pandemia de cólera e que atualmente é considerada extinta (Barua, 1992). Algumas pesquisas revelam que há uma real possibilidade de conversão de sorogrupos entre os isolados de *V.cholerae* no meio ambiente (Blokesch & Schoolnik, 2007) por isso é necessário a constante monitorização deste patógeno através de técnicas de tipagem molecular, como o PFGE.

5. CONCLUSÕES

- ✓ Os isolados apresentaram 8,7% de resistência a antimicrobianos. O antibiograma revelou somente perfil do monoresistência.
- ✓ A maioria dos isolados (57%) fermentaram a sacarose em caldo tardiamente.
- ✓ Em relação aos genes de virulência, de um modo geral, os isolados de *V.cholerae* O1 apresentavam o *tcpA* e o *ctxAB*. Nos NAGs estes genes estavam ausentes, com exceção de um isolado clínico não O1 (gene *tcpA*⁺), revelando que os NAGs podem atuar como reservatórios ambientais de genes de virulência para linhagens potencialmente epidêmicas e emergentes.
- ✓ A análise do PFGE revelou que os *V.cholerae* O1 de procedência clínica e ambiental apresentaram relação clonal com isolados de referência da sétima pandemia. E os NAGs apresentam relação genética distante dos primeiros.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M., SULTANA, M., NAIR, G.B., SIDDIQUE, A.K., HASAN, N.A., SACK R.B., SACK, D.A., AHMED, K.U., SADIQUE, A., WATANABE, H., GRIM, C.J., HUQ, A., COLWELL, R.R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **104**:17801-17806, 2007.
- ALBERT, M.J., ANSARUZZAMAN, M., BARDHAN, P.K., FARUQUE, A.S.G., FARUQUE, S.M., ISLAM, M.S., MAHALANABIS, D., SACK, R.B., SALAM, A.K., SIDDIQUE, M.D., YUNUS, M.D., ZAMAN, K. (Cholera Working Group, International Centre for Diarrheal Diseases Research, Bangladesh.) Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. **Lancet**, **342**: 387–90, 1993.
- AMITA, C.R., THUNGAPATHRA, M., RAMAMURTHY, T., NAIR, G.B., GHOSH, A. Class 1 integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India. **Emerging Infectious Diseases**, **9**: 500-2, 2003.
- ANSARUZZAMAN, M., BHUIYAN, N.A., NAIR, G.B., SACK, D.A., LUCAS, M., DEEN, J.L., AMPUERO, J., CHAIGNAT, C.L. Cholera in Mozambique, Variant of *Vibrio cholerae*, **Emerging Infectious Diseases**, **10**: 2057-2059, 2004.
- ANSARUZZAMAN, M., BHUIYAN, N.A., SAFA, A., SULTANA, M., MCUAMULE, A., MONDLANE, C., WANG, X.Y., DEEN, J.L., VON, S.L., CLEMENS, J.D., LUCAS, M., SACK, D.A., NAIR, G.B. Genetic diversity of El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 with hybrid traits isolated from Bangladesh and Mozambique. **International Journal of Medical Microbiology**, **297**:443-449, 2007.
- ANSARUZZAMAN, M., RAHMAN, M., KIBRIYA, A.K.M.G., BHUIYAN, N.A., ISLAM, M.S., ALBERT, M.J. Isolation of Sucrose Late-Fermenting and Nonfermenting Variants of *Vibrio cholerae* O139 Bengal: Implications for Diagnosis of Cholera. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 1339-1340, 1995.
- ARAKAWA, E., MURASE, T., MATSUSHITA, S., SHIMADA, T., YAMAI, S., ITO, T., WATANABE, H. Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates from domestic and imported cases of cholera in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 424–426, 2000.
- BALODA, S.B., KROVACER, K., ERICSSON, L., LINNE, T., MANSSON, I. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strain isolated from drinking water, fisher and foods by polymerase chain reaction. **Comparative Immunology and Microbiology Infections Diseases**, **18**: 17-26, 1995.
- BARUA, D. History of Cholera. In: **Cholera**. Barua, D. & Greenough III, W.B. (eds). New York, Plenum Medical, 1992. p.1-36.

- BASU, I.R., MITRA, P., SAHA, K., GHOSH, A.N., BHATTACHARYA, J., CHAKRABARTI, M.K., TAKEDA, Y., NAIR, G.B. Morphological and cytoskeletal changes caused by non-membrane damaging cytotoxin of *Vibrio cholerae* on int 407 and HeLa cells. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, **179**:255–263, 1999.
- BAUDRY, B.A., FASANO, J.K., KAPER, J.B. Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **60**: 428-434, 1992.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, **45**: 493-496, 1966.
- BAUMANN, P., FURNISS, A.L., LEE, J.V. Genus I. *Vibrio*. In: **Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, N.R. & Holt J.G. (eds). Vol. I, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, p. 518-538.
- BELKUM, A.V., TASSIOS, P.T., DIJKSHOORN, L., HAEGGMAN, S., COOKSON, B., FRY, N.K., FUSSING, V., GREEN, J., FEIL, E., GERNER-SMIDT, P., BRISSE, S., STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **13**: 1–46, 2007.
- BELTRÃO, J.F. Memórias da cólera no Pará (1855 e 1991): tragédias se repetem? **História, Ciências, Saúde – Manguinho**, **14**:145-167, 2007.
- BINA, X.R., PROVENZANO, D., NGUYEN, N., BINA, J.E. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production and colonization of the infant mouse small intestine. **Infection and Immunity**, **76**: 3595-605, 2008.
- BLOKESCH, M., SCHOOLNIK, G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. **PLoS Pathogens**, **3**:81, 2007.
- BRASIL- DATASUS (a), Indicadores e Dados Básicos-IDB 2008-**Taxa de Incidência de Cólera**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/d109.def>> acesso em 23/01/2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério do Meio Ambiente. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: MS, 2009. Caderno 5.p.15-31.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera**. Brasília: MS, 2008. p.09-70.
- BRASIL-DATASUS (b), Indicadores e Dados Básicos-IDB 2008-**Taxa de Incidência de Cólera**. < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/d109.def>. > acesso em 23/01/2010.

- BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**. 2^o Ed. New York: Springer, 2005.
- BURRUS, V., MARRERO, J., WALDOR, M.K. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. **Plasmid**. **55**: 173-83.2006.
- BURRUS, V., WALDOR, M.K. Formation of SXT tandem arrays and 12. SXT-R391 hybrids. **The Journal of Bacteriology**, **186** : 2636-2645, 2004.
- CAMERON, D.N., KHAMBATY, F.M., WACHSMUTH, I.K., ROBERT V. TAUXE, R.V., BARRETT, T.J. Molecular Characterization of *Vibrio cholerae* O1 Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of clinical microbiology**, **32**: 1685-1690, 1994.
- CAMPOS, L.C., FERREIRA, E.D.O. *Vibrio cholerae*. In :**Microbiologia**. Luiz Rachid Trabulsi e Flávio Alterthum (Eds), Atheneu, 2008. p.347-354.
- CHATTERJEE, S., PATRA, T., GHOSH, K., RAYCHOUDHURI, A., PAZHANI, G.P., DAS, M., SARKAR, B., BHADRA, R.K., MUKHOPADHYAY, A.K., TAKEDA, Y., NAIR, G.B., RAMAMURTHY, T., NANDY, R.K. *Vibrio cholerae* O1 clinical strains isolated in 1992 in Kolkata with progenitor traits of the 2004 Mozambique variant. **Journal of Clinical Microbiology**, **58**: 239-247, 2009.
- CHEN, C.H., SHIMADA, T., ELHADI, N., RADU, S., NISHIBUCHI, M. Phenotypic and genotypic characteristics and epidemiological significance of *ctx+* strains of *Vibrio cholerae* isolated from seafood in Malaysia. **Applied and Environmental Microbiology**, **70**:1964-1972, 2004.
- CHOW, K.H., NG, T.K., YUEN, K.Y., YAM, W.C. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio Cholerae* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **39**: 2594-2597, 2001.
- CHUN, J., GRIM, C.J., HASAN, N.A., LEE, J.H., CHOI, S.Y., HALEY, B.J., TAVIANI, E., JEON, Y.S., KIM, D.W., LEE, J.H., BRETTIN, T.S., BRUCE, D.C., CHALLACOMBE, J.F., DETTER, J.C., HAN, C.S., MUNK, A.C., CHERTKOV, O., MEINCKE, L., SAUNDERS, E., WALTERS, R.A., HUQ, A., NAIR, G.B., COLWELL, R.R. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **106**:15442–15447, 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI/NCCLS Publication M100-S19, 2009. 83p.
- COELHO A, ANDRADE JRC, VICENTE ACP, SALLES CA. A new variant of *Vibrio cholerae* O1 from clinical isolates in Amazonia. **Journal of Clinical Microbiology** **33**: 114-118, 1995.

- COELHO, A., ANDRADE, J., VICENTE, A., DIRITA, C.V. Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. **Infection and Immunity**, **68**:1700-1705, 2000.
- COLWELL, R. R., HUQ, A. Vibrios in the environment viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. **In: Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives I**. K. Wachsmuth, P. A. Blake, and O. Olsvik (ed.), ASM Press, Washington, D.C. 1994.p. 117–133.
- COLWELL, R.R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. **Science**, **274**:2025–2031, 1996.
- COLWELL, R.R., HUQ, A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*: the causative agent of cholera. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **740**:44–54, 1994.
- COLWELL, R.R., HUQ, A., CHOWDHURY, M.A., BRAYTON, P.R., XU, B. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. **Canadian Journal of Microbiology**, **41**:946–950, 1995.
- COOPER, D.B. The new 'black death': cholera in Brazil, 1855-1856. **Social Science History**, **10**: 467-488, 1986.
- COOPER, K.L.E., LUEY, C.K.Y., BIRD, M., TERAJIMA, J., NAIR, G.B., KAM, K.M., ARAKAWA, E., SAFA, A., CHEUNG, D.T., LAW, C.P., WATANABE, H., KUBOTA, K., SWAMINATHAN, B. Development and Validation of a PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Vibrio cholerae*. **Foodborne Pathogenesis and Disease**, **3**:51-58, 2006.
- DALSGAARD, A., FORSLUND, A., PETERSEN, A., BROWN, D.J., DIAS, F., MONTEIRO, S., MOLBAK, K., AABY, P., RODRIGUES, A., SANDSTROM, A. Class 1 integronborne, multiple-antibiotic resistance encoded by a 150-kilobase conjugative plasmid in epidemic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Guinea-Bissau. **Journal of Clinical Microbiology**. **38**: 3774–3779, 2000.
- DALSGAARD, A., ALBERT, M.J., TAYLOR, D.N., SHIMADA, T., MEZA, R., SERICHANTALERGS, O., ECHEVARRIA, P. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 2715–2722, 1995.
- DALSGAARD, A., FORSLUND, A., BODHIDATTA, L., SERICHANTALERGS, O., PITARANGSI, C., PANG, L., SHIMADA, T., ECHEVERRIA, P. A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous non-O1, non-O139 O-serotypes. **Epidemiology and Infection**, **122**:217–226, 1999.
- DALSGAARD, A., SERICHANTALERGS, O., FORSLUND, A., LIN, W., MEKALANOS, J., MINTZ, E., SHIMADA, T., WELLS, J.G. 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**, **39**:4086–4092, 2001.

- DALSGAARD, A., SERICHANTALERGS, O., SHIMADA, T., SETHABUTR, O., ECHEVERRIA, P. Prevalence of *Vibrio cholerae* with heat-stable enterotoxin (NAG-ST) and cholera toxin genes: restriction fragment length polymorphisms of NAG-ST genes among *V. cholerae* O serogroups from a major shrimp production area in Thailand. **Journal of Medical Microbiology**, **43**:216–220, 1995.
- DALSGAARD, A., SKOV, M.N., SERICHANTALERGS, O., ECHEVERRIA, P., MEZA, R., TAYLOR, D.N. Molecular Evolution of *Vibrio cholerae* O1 Strains Isolated in Lima, Peru, from 1991 to 1995. **Journal of Clinical Microbiology**, **35**: 1151-1156, 1997.
- DANIN-POLEG, Y., COHEN, L.A., GANCZ, H., BROZA, Y.Y., HANOH GOLDSHMIDT, H., MALUL, E., VALINSKY, L., LERNER, L., BROZA, M., KASHI, Y. *Vibrio cholerae* Strain Typing and Phylogeny Study Based on Simple Sequence Repeats. **Journal of Clinical Microbiology**, **45**:736- 746, 2007.
- DIRITA, V.J. Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, **6**:451–458, 1992.
- DUBOIS, V., DEBREYER, C., LITVAK, S., QUENTIN, C., PARISSI, V. A new 6. in vitro strand transfer assay for monitoring bacterial class 1 integron recombinase IntI1 activity. **PLoS One**, **2**: 1315, 2007.
- DUTTA, B., GHOSH, R., SHARMA, N.C., PAZHANI, G.P., TANEJA, N., RAYCHOWDHURI, A., SARKAR, B.L., MONDAL, S.K., MUKHOPADHYAY, A.K., NANDY, R.K., BHATTACHARYA, M.K., BHATTACHARYA, S.K., RAMAMURTHY, T. Spread of cholera with newer clones of *Vibrio cholerae* O1 El Tor, serotype inaba, in India. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**:3391–3393, 2006.
- DZIEJMAN, M., BALON, E., BOYD, D., FRASER, C.M., HEIDELBERG, J.F., E MEKALANOS, J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **99**:1556–1561, 2002.
- FALBO, V., CARATTOLI, A., TOSINI, F., PEZZELA, C., DIONISI, A.M., LUZZI, I., Antibiotic Resistance Conferred by a Conjugative Plasmid and a Class I Integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Strains Isolated in Albania and Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43**: 693-696. 1999.
- FARUQUE, S.M., ALBERT, M.J. Genetic relation between *Vibrio cholerae* O1 strain in Ecuador and Bangladesh. **Lancet**, **339**:740-741, 1992.
- FARUQUE, S.M., ALBERT, M.J., MEKALANOS J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62**:1301–1314, 1998.
- FASANO, A., BAUDRY, B.T., UMLINT, D WASSERMAN, S.S., TALL, B.D., KETLEY, J.M., KAPER, J.B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin,

which affects intestinal tight junctions. **Proceedings of the National Academy of science of the United State of America**, **88**:5242-5246, 1991.

FENG, L.,REEVES, P.R.,LAN, R., REN, Y., GAO,C.,ZHOU,Z., REN,Y., CHENG., J.,WANG, W. WANG, J., QUIAN,W., LI.D., WANG.,L.A recalibrated molecular clock and independent origins for the cholerae pandemic clones. **Plos One**, **3**:2008.

GHOSH, A., RAMAMURTHY, T. Antimicrobials & cholera: are we stranded?. **Indian Journal of Medical Research**, **133**: 225-231, 2011.

GOERING, R.V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evalution**, **10**: 866-875, 2010.

GRIFFITH, C.D., KELLY-HOPE, L, A., MILLER, M.A. Review of reported cholera outbreaks worldwide,1995-2005. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **75**: 973–977.2006.

GUHATHAKURTA, B., SASMAL, D., PAL, S., CHAKRABORTY, S., NAIR, G.B. DATTA, A. Comparative analysis of cytotoxin, hemolysin, hemagglutinin and exocellular enzymes among clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O139 and non-O1, non-O139. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, **179**:401–407, 1999.

GUTHMANN, J. Epidemic Cholera in Latin America: Spread and Routes of Transmission. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **98**:419-427, 1995.

HALL, R.H., DRASAR, B.S. *Vibrio cholerae* HlyA Hemolysin Is Processed by Proteolysis. **Infection and Immunity**, **58**:3375-3379, 1990.

HEIDELBERG, J.F, EISEN JA, NELSON WC, CLAYTON RA, GWINN ML, DODSON RJ, HAFT DH, HICKEY EK, PETERSON JD, UMayAM L, GILL SR, NELSON KE, READ TD, TETTELIN H, RICHARDSON D, ERMOLAEVA MD, VAMATHEVAN J, BASS S, QIN H, DRAGOI I, SELLERS P, MCDONALD L, UTTERBACK T, FLEISHMANN RD, NIERMAN WC, WHITE O, SALZBERG SL, SMITH HO, COLWELL RR, MEKALANOS JJ, VENTER JC, AND FRASER CM: DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, **406**: 477-483.2000.

HOCHHUT, B.,LOFTI, Y.,MAZEL, D.,FARUQUE, S.M.,WOODGATE, R.,WALDOR, M.K. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **45**: 2991–3000, 2001.

HOFER, E. Cholera in Brazil: analysis of some bacteriologic, clinical, and epidemiologic characteristics. *In: Cholera on the American Continents*. Pestana de Castro AF and Almeida (ed.).p. 167-170, 1993.

- HOFER, E., QUINTAES, B.R., REIS, E.M.F., RODRIGUES, D.P., LI SEKI, L.M., FEITOSA, I.S., RIBEIRO, L.H.F.F., FERREIRA, M.R. Emergence of multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* isolated from patients with gastroenteritis in Ceará, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **32**:151-156, 1999.
- HOSSAIN, M.S., SALAM, M.A., RABBANI, G.H., KABIR, I., BISWAS, R., MAHALANABIS, D. Tetracycline in the treatment of severe cholera due to *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **Journal of Health, Population and Nutrition**, **20**:18-25, 2002.
- HUGHES, K. J., EVERISS, K. D., KOVACH, M. E., PETERSON, K. M. Isolation and characterization of the *Vibrio cholerae* *acfA* gene, required for efficient intestinal colonization. **Gene**, **156**:59-61, 1995.
- ISLAM, M.S., TALUKDER, K.A., KHAN, N.H., MAHMUD, Z.H., RAHMAN, M.Z., NAIR, G.B., SIDDIQUE, A.K.M., YUNUS, M., SACK, D.A., SACK, R.B., HUQ, A., COWELL, R.R. Variation of toxigenic *V.cholerae* O1 in the aquatic environment of Bangladesh and its correlation with the clinical strains. **Microbiology and Immunology**, **48**: 773-777, 2004.
- JIANG, S.C., MATTE, M., MATTE, G., HUQ, A., COLWELL, R.R. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**: 148-153, 2000.
- KAM, K.M., LUEY, C.K., TSANG, Y.M., LAW, C.P., CHU, M.Y., CHEUNG, T.L., CHIU, A.W. Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 and O139 by pulsed-field gel electrophoresis in Hong Kong: correlation with epidemiological events from 1994 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 4502-4511, 2003.
- KAMBLE, T. K., MORE, S.R., CHAVAN, S.S., KULKARNI, N.D., LODHA, N.S., KAMBLE, A.S. Clinical profile of non-O1 strain-O139 of *Vibrio cholerae* in the region of Ambajogai, Maharashtra. **Journal of Association of Physicians of India**, **48**:505-506, 2000.
- KAPER, J.B., MORRIS, J.G., LEVINE, M.M. Cholera Review. **Clinical of Microbiology**, **8**:48-86, 1995.
- KARAOLIS, D.K.R., JOHNSON, J.A., BAILEY, C.C., BOEDEKER, E.C., KAPER, J. B., REEVES, P.R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. **Proceedings of the National Academy Sciences of United States of Americas**, **95**:3134-3139, 1998.
- KARAOLIS, D.K.R., LAN, R., REEVES, P.R., The Sixth and Seventh Cholera Pandemics Are Due to Independent Clones Separately Derived from Environmental, Nontoxigenic, Non-O1 *Vibrio cholerae*. **Journal of Microbiology**, **177**:3191-3198, 1995.

- KEDDY, K.H., NADAN, S., GOVIND, C., STURM, A.W. Evidence for a clonally different origin of the two cholera epidemics of 2001–2002 and 1980–1987 in South Africa. **Journal of Medical Microbiology**, **56**: 1644–1650, 2007.
- KERAMAT F, HASHEM SH, MAMANI M, RANJBA M, ERFANI H. Survey of antibiogram tests in cholera patients in the 2005 epidemic in Hamadan, Islamic Republic of Iran. **La Revue de Santé de la Méditerranée orientale**, **14**:768-775, 2008.
- KOCH R. An address on cholera and its bacillus. **British Medical Journal** **1894**, **2**: 453–459, 1894.
- KONDO, S., TRAKOOLSOMBOON, S., SMITTIPAT, N., JUTHAYOTHIN, T., PALITTAPONGARNPIM, P. Pulsed Field Gel Electrophoresis Analysis of *Vibrio cholerae* Isolates in Southern Thailand. **Southeast Asian Journal Tropical Medical Public Health**, **41**: 410-417, 2010.
- 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**, **142**:2165–2174, 1996.
- KRUKONIS, E. S., DIRITA, V.J. From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. **Current Opinion in Microbiology**, **6**:186–190, 2003.
- LAINSON, Z.C.L., ABDON, N.P., PARDAUIL, C.R.B., PAES, A.L.V., QUEIROZ, B.H.S. COLERA. IN: LEÃO, R.N.Q., BICHARA, C.N.C., MIRANDA, E.C.B.M.; CARNEIRO, ICRS.; OLIVEIR, MRF.; ABDON, NP.; VASCONCELOS, PFC.; SILVA, BM.; PAES, ALV.; MARSOLA, LR(Org). Doenças infecciosas e parasitárias. Cejub, UEPA/Instituto Evandro Chagas, p.449-468, 1997.
- LALLY, E. T., HILL, R. B., KIEBA, L. R., AND KORSTOFF., J. The interaction between RTX toxins and target cells. **Trends Microbiology** **7**:356-361, 1999.
- LAN, R. E REEVES, P.R. Pandemic spread of cholera: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**: 172–181, 2002.
- LIN, W., FULLNER, K.J., CLAYTON, R., SEXTON, J.A., ROGERS, M.B., CALIA, K.E., CALDERWOOD, S.B., FRASER, C., MEKALANOS, J.J. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**:1071–1076, 1999.
- LIPP, E.K., HUQ, A., COLWEL, R.R. Effects of Global Climate on Infectious Disease: The Cholera Model. **Clinical Microbiology Reviews**, **15**: 757-770, 2002.

- LIU, S.L., SCHRYRERS, A.B., SANDERSON, K.E., JOHNSTON, R.N. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. **Journal of Bacteriology**, **181**: 6747-55, 1999.
- MAGALHÃES, V.D., FERREIRA, J.C., BARELLI, C., DARINI, A.L., Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **64**: 155-161, 2005.
- MAHALINGAM, S., CHEONG, Y.M., KAN, S., YASSIN, R.M., VADIVELU, J., PANG, T. Molecular Epidemiologic Analysis of *Vibrio cholerae* O1 Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 2975-2979, 1994.
- MANDOMANDO, I., ESPASA, VALLE'S, X., SACARLAL, J., SIGAU, B., RUIZ, J., ALONSO, P. Antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa isolated in Manchaca District Hospital, southern Mozambique. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **60**: 662-664, 2007.
- MANNING, P. A., M. H. BROWN, AND M. W. HEUZENROEDER. Cloning of the structural gene (hly) for the haemolysin of *Vibrio cholerae* El Tor strain 017. **Gene** **31**:225-231, 1984.
- MELO, L.M., VIEIRA, R.H., HOFER, E., BATISTA, A.L., ALMEIDA, D. Cholera in Rio Grande do Norte State-Brazil: sorology and sensitivity of *Vibrio cholerae* to different antimicrobials. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **20**:8-11, 2005.
- MERRELL, D. S., BUTLER, S.M., QADRI, F., DOLGANOV, N.A., ALAM, A., COHEN, M.B., CALDERWOOD, S.B., SCHOOLNIK, G.K., CAMILLI, A. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. **Nature**, **417**:642–645, 2002.
- MIMICA, L.M.J., MENDES, C.M.F., MIMICA, I.M. Controle laboratorial do tratamento das infecções bacterianas . In **Microbiologia**. Luiz Richid Trabulsi e Flávio Alterthum (Eds), Atheneu, 2008. p.93-99.
- MOHAMED, N.F., HAQUE, Q.M. Sucrose late-fermenting variants of *V.cholerae* O1 and O139 bengal Isolated in Malaysia. **The International Medical Journal**, **2**: 2003, 221-227.
- MORRIS, J.G.J., TAKEDA, T., TALL, B.D., LOSONSK, Y.A.G., BHATTACHARYA, F.D.B., KAY, A.B., NISHIBUCHI, M. Experimental non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. **Journal of Clinical Investigation**, **85**: 697–705, 1990.
- MUKHOPADHYAY, A.K., CHAKRABORTY, S., TAKEDA, Y., NAIR, G.B., BERG, D.E. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, **183**: 4737-4746, 2001.
- NAIR, G.B., FARUQUE, S.M., BHUIYAN, N.A., KAMRUZZAMAN, M., SIDDIQUE, A.K., SACK, D.A. New Variants of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor with Attributes of the Classical Biotype from Hospitalized atients with Acute Diarrhea in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:3296–3299, 2002.

- NANDI, S., KHETAWAT, G., SEGUPTA, S., MAJUNDER, R., KAR, S., BHADRA, R.K., ROYCHOUDHURY, S., DAS, J. Rearrangements in the genomes of *Vibrio cholerae* strains belonging to different serovars. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, **47**:858-862, 1997.
- NITRINI, D.R., PEDROSA, F.A., PESSOA, M.C. E VERONESI, R. Cólera. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi R, Focaccia R (eds.), 1997. p.585-602/3585-3602.
- O'GRADY, F., LEWIS, M.J., PEARSON, N.J. Global surveillance of 1. Antibiotic sensitivity of *Vibrio cholerae*. **Bull World Health Organ**, **54**: 181-185, 1976.
- OGIERMAN, M.A., VOSS, E., MEANEY, C., FAAST, R., ATTRIDGE, S.R., MANNING, P.A. Comparison of the promoter proximal regions of the toxin-co-regulated *tcp* gene cluster in classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1. **Gene**, **17**:9-16, 1996.
- OKEKE, I.N., ABODERIN, O.A., BYARUGABA, D.K., OJO, K.K., OPITAN, J.A. Growing Problem of Multidrug- Resistant Enteric Pathogens in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, **13**:1640- 1646, 2007.
- OPITAN JA, NEWMAN MJ, NSIAH-POODOH OA, OKEKE N. *Vibrio cholerae* O1 from Accra, Ghana carrying a class 2 integron and SXT element. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. **62**: 929-933, 2008.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, **Cholera cases and deaths reported 2009**. Disponível <[HTTP://apps.who.int/globalatlas/sharedfunction/mapping/mapDisplay.asp](http://apps.who.int/globalatlas/sharedfunction/mapping/mapDisplay.asp)>, acesso em 13/02/2011.
- PANG, B., YAN, M., CUI, Z., YE, X., DIAO, B., REN, Y., GAO, S., ZHANG, L., KAN, B. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. **Journal of Bacteriology**, **189**:4837–4879, 2007.
- PARTIDA, M.L.L., QUILICI, M.L. Molecular Analyses of *Vibrio cholerae* O1 Clinical Strains, Including New Nontoxigenic Variants Isolated in Mexico during the Cholera Epidemic Years between 1991 and 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, **47**: 1364–1371, 2009.
- PASCUAL, M., RODÓ, X., ELLNER, S.P., COLWELL, R., BOUMA, M.J. Cholera dynamics and El Niño-Southern Oscillation. **Science**, **289**:1766–1769, 2000.
- PICHEL, M., RIVAS, M., CHINEN, I., MARTÍN, F., IBARRA, C., BINSZTEIN, N. Genetic Diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and Emergence of a New Variant. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**:124-134, 2003.
- POURSHAFIE, M.R., BAKHSHI, B., RANJBAR, R., SEDAGHAT, M., SADEGHIFARD, N., ZAEMI, Y.J., PARZADEH, M., E RAESI, J. Dissemination of

- a single *Vibrio cholerae* clone in cholera outbreaks during 2005 in Iran. **Journal of Medical Microbiology**, **56**: 1615–1619, 2007.
- PUGLIESE, N., MAIMONE, F., SCRASCIA, M., MATERUS, F., PAZZANI, C. SXT-related integrating conjugative element and IncC plasmids in *Vibrio cholerae* O1 strains in Eastern Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **63**: 438–442, 2009.
- RAMOS, F.L.P., LAINSON, Z.C.L., SILVA, E.L., JÚNIOR, A.A.P., MARECO, M.L., LAMARÃO, M.L.N. Cholera in North Brazil: on the Occurrence of Strains of *Vibrio cholerae* O1 which fail to Ferment Sucrose During Routine Plating on Thiosulphate-Citrate-Bile Salt –Sucrose Agar (TCBS). A new problem in Diagnosis and control?. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, **39**: 141-144, 1997.
- RAYCHOUDHURI, A., CHATTERJEE, S., PAZHANI, G.P., NANDY, R.K., BHATTACHARYA, M.K., BHATTACHARYA, S.K., RAMAMURTHY, T., MUKHOPADHYAY, A.K. Molecular characterization of recent *Vibrio cholerae* O1, El Tor, Inaba strains isolated from hospitalized patients in Kolkata, India. **Journal of Infection**, **55**: 431–438, 2007.
- RIVERA, I.N.G., CHUN, J., HUQ, A., R., SACK, B., COLWELL, R.R. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, **67**: 2421- 2429, 2001.
- RODRIGUEZ, D.S., RIZO, L.A.G., MONROY, S.P., REYES, T. Susceptibilidad antimicrobiana y serotipaje de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes VIH/SIDA. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, **54**: 142 - 146, 2002.
- ROY, S., DUTTA, B., GHOSH, A.R., SUGUNAN, A.P., NANDY, R.K., BHATTACHARYA, S.K., SEHGAL, S.C. Molecular tracking of the lineage of strains of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor associated with a cholera outbreak in Andaman and Nicobar Islands, India. **Tropical Medicine & International Health**, **10**: 604-611, 2005.
- ROYCHOWDHURY, A., PAN, A., DUTTA, D., MUKHOPADHYAY, A.K., RAMAMURTHY, T., NANDY, R.K., BHATTACHARYA, S.K., BHATTACHARYA, M.K. Emergence of Tetracycline- Resistant *Vibrio cholerae* O1 Serotype Inaba, in Kolkata, India. **Japanese Journal of Infectious Disease**, **61**: 128-129, 2008.
- SÁ, L.C.C.S., **Diversidade genética de isolados ambientais do *Vibrio cholerae* da Amazônia Brasileira**. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários)- Belém, Universidade Federal do Pará, 2009. 66p.
- SÁ, L.L.C.S., VALE, E.R., SANTOS, E.C.O.S., JESUS, I.M., MENDONÇA, N.M., THEOPHILO, G.N.D., FERREIRA, F.S.F., HOFER, E., LOUREIRO, E.C.B. Vigilância Ambiental para cólera na região Metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 á 2006. **Caderno de Saúde Coletiva**, **15**: 449-466, 2007.

- SACK, D.A., SACK, R.B., NAIR, G.B, SIDDIQUE, A.K. Cholera. **Lancet** **363**:223-233, 2004.
- SAFA, A., BHUIYAN, N.A., ALAM, M., SACK, D.A., NAIR, G.B. Genomic Relatedness of the New Matlab Variants of *Vibrio cholerae* O1 to the Classical and El Tor Biotypes as Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**:1401–1404, 2005.
- SAFA, A., NAIR, G.B., KONG, R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. **Trends in microbiology**, **18**: 46-54, 2010.
- SAHA, P.K., KOLEY, H., NAIR, G.B. Purification and characterization of an extracellular secretogenic non-membrane-damaging cytotoxin produced by clinical strains of *Vibrio cholerae* non-O1. **Infection and Immunity**, **64**:3101–3108, 1996.
- SAID, B., SMITH, H.R., SCOTLAND, S.M. , ROWE, B. Detection and differentiation of the gene for toxin co-regulated pili (*tcpA*) in *Vibrio cholerae* non-O1 using the polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, **125**: 205-210, 1995.
- SANYAL, S. C., Cholera in its present day scenario. **Journal of the Indian Medical Association**,**7**:371-376, 2000.
- SCRASCIA, M., PUGLIESE, N., MAIMONE, F., MOHAMUD,A.K., ALI,A.I, GRIMONT,A.D.P.,PAZZANI,C. Cholera in Ethiopia in the 1990s: epidemiologic patterns, clonal analysis and antimicrobial resistance. **Intenational Journal of Medical Microbiology**.**299**:367-372, 2009.
- SHARMA, C., THUNGAPATHRA, M., GHOSH, A. & 11 OTHER AUTHORS. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**:756–763, 1998.
- SHI, L., MIYOSHI, S., HIURA, M., TOMOCHIKA, K., SHIMADA, T.,SHINODA, S. Detction of genes encoding cholera toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), acessory cholerae enterotoxin (ACE) and heat-stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. **Microbiology and Immunology**, **42**:823-828, 1998.
- SHI,L., KAZUTAKA,F., SATO,T., ITO,H., GARG,P., CHAKRABRARTY,R., RAMAMURTHY,T., NAIR,G.B., TAKEDA,Y.,YAMASAKI,S. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, **55**: 575–583, 2006.
- SINGH, D.V., MATTE, M.H., MATTE, G.R., JIANG, S., SABEENA, F., SHUKLA, B.N., SANYAL, S.C., HUQ, A., E COLWELL, R.R. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, **67**: 910–921, 2001.

- SOUZA, C.O., DIAS, D.M., BARBOSA, C.C.S., RODRIGUES, S.N., YOSHIDA, P.S. Antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency virus. **Caderno de Saúde Coletiva-RJ**, **15**:379 - 392, 2007.
- SWAMINATHAN, B., BARRETT, T.J., HUNTER, S.B., E TAUXE, R.V. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases**, **7**: 382–389, 2001.
- TEIXEIRA, L.M., CARVALHO, M.G.S., MERQUIOR, V.L.C., STEIGERWALT, A.G., BRENNER, D.J., FACKLAM, R.R. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, **35**:2778-2781, 1997.
- TENOVER, F. C., ARBEIT, R.D., GOERING, R.V, MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**:2233–2239, 1995.
- THOMPSON FL AND SWINGS J, .Taxonomy of *Vibrios*. In: **The biology of Vibrios**. Thompson FL, Austin B, Swings J(eds.), 2006.p15-26.
- THOMPSON, C.C., THOMPSON, F.L., VICENTE, A.C., SWINGS, J. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of atpA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **57**: 2480–2484, 2007.
- THOMPSON, C.C., THOMPSON, F.L., VICENTE, A.C.P. Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **58**:617-621, 2008.
- THOMPSON, F.L., IIDA, T., SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Review**, **68**:403–431, 2004.
- TOLEDO, L.M. A cólera nas Américas e a sua produção no Brasil. **Informe epidemiológico do SUS**. 1:7-38, 1993.
- TRUCKSIS, T.M., JAMES, E., GALEN, T., MICHALSKI, J., FASANO, A., KAPER, J.B., Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. **Proceedings of the National Academy of science of the United State of America**, **90**:5267-5271, 1993.
- VICENTE, A.C.P., COELHO, A.M., SALLES, CA. *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* heat-stable toxin gene sequence detection by PCR. **Journal Medical Microbiology**, **46**: 1-5, 1997.
- WACHSMUTH, I.K., BOPP, C.A., FIELDS, P.I., CARRILLO, C. Difference between toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from South America and US Gulf Coast. **Lancet** **337**:1097–1098, 1991.

- WACHSMUTH, I.K., EVINS, G.M., FIELDS, P.I., OLSVIK, O., POPOVIC, T., BOPP, C.A., WELLS, J.G., CARRILLO, C., BLAKE, P.A. The molecular 142 epidemiology of cholera in Latin America. **The Journal of Infectious Disease**, **167**:621-626, 1993.
- WALDMAN, E.A., SILVA, L.J., MONTEIRO, C.A. Infectious Diseases Trends: from Polio Elimination to the Reintroduction of Cholera. **Informe epidemiológico do SUS**, **8**: 5-47, 1999.
- WALDOR, M. K., E. J. RUBIN, G. D. N. PEARSON, H. KIMSEY, J. J. MEKALANOS. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXF are encoded by regions RS2. **Molecular Microbiology**, **24**: 917–926, 1997.
- WALDOR, M.K., MEKALANOS, J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**:1910–1914, 1996.
- WEI, S.W., CHERN, L.L., WU, Y.C., WANG, Y.L., LIN, C.L., CHIOU, C.S. Foodborne disease outbreaks caused by sucrose-nonfermenting and β -galactosidase-deficient variants of *Vibrio cholerae*. **International Journal of Food Microbiology**, **122**:148–155, 2008.
- YAMAI, S., OKITSU, T., SHIMADA, T., KATSUBE, Y. Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. **Kansenshogaku Zasshi: The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases**, **71**: 1037–45, 1997.
- ZHANG, D., RAJANNA, C., SUN, W., KARAOLIS, D.K.R. Analysis of the *Vibrio* pathogenicity island-encoded Mop protein suggests a pleiotropic role in the virulence of epidemic *Vibrio cholerae*. **FEMS Microbiology Letters**, **225**:311-318, 2003.
- ZHANG, J.Y., DIAO, B.W., ZHANG, N., CUI, Z.G., ZHANG, L.J., XU, J.G., E KAN, B. Comparison of different electrophoretic parameters of Pulse-Field Gel Electrophoresis for *Vibrio cholerae* subtyping. **Journal of Microbiology Methods**, **71**:15–22, 2007.
- ZHOU, H., LOU, JING., DIAO, B., CUI, Z., PANG, B., ZHANG, L., SHAO, Z., KAN, B. Comparison of Amplified Fragment Length Polymorphism and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Subtyping of *Vibrio cholerae* Serogroups O1 and O139 **Foodborne Pathogens and Disease**, **00**: 1-8, 2010.
- ZHOU, H.J., DIAO, B.W., CUI, Z.G., PANG, B., ZHANG, L.J., E KAN, B. Comparison of automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subtyping of *Vibrio cholerae*. **Letters in Applied Microbiology**, **48**: 726–731, 2009.
- ZO, Y.G., RIVERA, I.N., RUSSEK-COHEN, E., ISLAM, M.S., SIDDIQUE, A.K., YUNUS, M., SACK, R.B., HUQ, A., COLWELL, R.R. Genomic profiles of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1 in cholera-endemic areas of

Bangladesh. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99:12409-12414, 2002.

ANEXO

Relação das amostras de *V. cholerae* O1 clínicas incluídas no estudo, 1994 a 1995.

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | UF | DATA |
|---------------------|------------------|-----------|-------------|
| IEC1082 | MACAPÁ | AP | 08/08/1994 |
| IEC1086 | MACAPÁ | AP | 10/08/1994 |
| IEC1079 | CAMETÁ | PA | 11/08/1994 |
| IEC1123 | CAMETÁ | PA | 02/09/1994 |
| IEC1114 | MACAPÁ | AP | 20/09/1994 |
| IEC1115 | MACAPÁ | AP | 20/09/1994 |
| IEC1126 | VIGIA | PA | 30/09/1994 |
| IEC1148 | MACAPÁ | AP | 03/10/1994 |
| IEC1153 | MACAPÁ | AP | 06/10/1994 |
| IEC1127 | BREVES | PA | 08/10/1994 |
| IEC1136 | ALMERIM | PA | 09/10/1994 |
| IEC1133 | BAGRE | PA | 13/10/1994 |
| IEC1120 | IGARAPÉ-MIRI | PA | 22/10/1994 |
| IEC159 | MACAPÁ | AP | 23/10/1994 |
| IEC1200 | BELÉM | PA | 26/10/1994 |
| IEC20 | BREVES | PA | 05/11/1994 |
| IEC1201 | MACAPÁ | AP | 07/11/1994 |
| IEC21 | IGARAPÉ-MIRI | PA | 07/11/1994 |
| IEC1205 | MACAPÁ | AP | 08/11/1994 |
| IEC28 | BAGRE | PA | 08/11/1994 |
| IEC224 | BELÉM | PA | 22/11/1994 |
| IEC241 | ALMERIM | PA | 25/11/1994 |
| IEC9 | BREVES | PA | 02/12/1994 |
| IEC15 | CAMETÁ | PA | 10/12/1994 |
| IEC22 | VIGIA | PA | 12/12/1994 |

Relação das amostras de *V. cholerae* O1 clínicas incluídas no estudo, 1994 a 1995.

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | UF | DATA |
|---------------------|---------------------|-----------|-------------|
| IEC1213 | SANTA CRUZ DO ARARI | PA | 14/12/1994 |
| IEC1214 | BELÉM | PA | 14/12/1994 |
| IEC1221 | MONTE DOURADO | PA | 14/12/1994 |
| IEC24 | MARACANÃ | PA | 14/12/1994 |
| IEC25 | CHAVES | PA | 16/12/1994 |
| IEC177 | MACAPÁ | AP | 20/12/1994 |
| IEC186 | MACAPÁ | AP | 24/12/1994 |
| IEC33 | AFUÁ | PA | 29/12/1994 |
| IEC1 | PRAINHA | PA | 30/12/1994 |
| IEC2 | SANTARÉM | PA | 30/12/1994 |
| IEC18 | ALMERIM | PA | 02/01/1995 |
| IEC191 | MACAPÁ | AP | 02/01/1995 |
| IEC5 | BELÉM | PA | 03/01/1995 |
| IEC29 | CAMETÁ | PA | 07/01/1995 |
| IEC7 | ACARÁ | PA | 08/01/1995 |
| IEC37 | SANTA CRUZ DO ARARI | PA | 10/01/1995 |
| IEC30 | VIGIA | PA | 11/01/1995 |
| IEC55 | MANAUS | AM | 12/01/1995 |
| IEC69 | MACAPÁ | AP | 15/01/1995 |
| IEC32 | PONTA DE PEDRAS | PA | 18/01/1995 |
| IEC42 | SANTARÉM | PA | 19/01/1995 |
| IEC210 | BREVES | PA | 20/01/1995 |
| IEC36 | LIMOEIRO DO AJURU | PA | 21/01/1995 |
| IEC200 | ÓBIDOS | PA | 22/01/1995 |
| IEC52 | CHAVES | PA | 23/01/1995 |

Relação das amostras de *V. cholerae* O1 clínicas incluídas no estudo, 1994 a 1995

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | PA | DATA |
|---------------------|-------------------------|-----------|-------------|
| IEC56 | MARACANÃ | PA | 24/01/1995 |
| IEC57 | CASTANHAL | PA | 24/01/1995 |
| IEC199 | SÃO CAETANO DE ODIVELAS | PA | 28/01/1995 |
| IEC204 | SANTARÉM | PA | 01/02/1995 |
| IEC209 | BREVES | PA | 05/02/1995 |
| IEC207 | ANANINDEUA | PA | 09/02/1995 |
| IEC100 | LÁBREA | AM | 10/02/1995 |
| IEC108 | NOVA OLINDA DO NORTE | AM | 10/02/1995 |
| IEC118 | HUMAITÁ | AM | 10/02/1995 |
| IEC145 | MANACAPURU | AM | 10/02/1995 |
| IEC215 | CAMETÁ | PA | 10/02/1995 |
| IEC72 | MANAUS | AM | 10/02/1995 |
| IEC80 | CAREIRO DA VÁRZEA | AM | 10/02/1995 |
| IEC83 | CODAJÁS | AM | 10/02/1995 |
| IEC221 | BELÉM | PA | 14/02/1995 |
| IEC233 | LIMOEIRO DO AJURU | PA | 16/02/1995 |
| IEC230 | SANTARÉM | PA | 19/02/1995 |
| IEC226 | ANANINDEUA | PA | 21/02/1995 |
| IEC247 | MARACANÃ | PA | 02/03/1995 |
| IEC267 | LIMOEIRO DO AJURU | PA | 05/03/1995 |
| IEC268 | CAMETÁ | PA | 09/03/1995 |
| IEC244 | MOCAJUBA | PA | 13/03/1995 |
| IEC261 | ÓBIDOS | PA | 16/03/1995 |
| IEC256 | BELÉM | PA | 18/03/1995 |
| IEC304 | BREVES | PA | 02/04/1995 |

Relação das amostras de *V. cholerae* O1 clínicas incluídas no estudo, 1994 a 1995.

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | UF | DATA |
|---------------------|-------------------|-----------|-------------|
| IEC303 | CAMETÁ | PA | 08/04/1995 |
| IEC285 | BELÉM | PA | 10/04/1995 |
| IEC688 | PRIMAVERA | PA | 14/04/1995 |
| IEC307 | ANANINDEUA | PA | 18/04/1995 |
| IEC402 | BREVES | PA | 03/05/1995 |
| IEC408 | BELÉM | PA | 03/05/1995 |
| IEC415 | LIMOEIRO DO AJURU | PA | 08/05/1995 |
| IEC470 | MACAPÁ | AP | 09/05/1995 |
| IEC684 | PRIMAVERA | PA | 09/05/1995 |
| IEC472 | MACAPÁ | AP | 15/05/1995 |
| IEC473 | MACAPÁ | AP | 19/05/1995 |
| IEC450 | CAMETÁ | PA | 21/05/1995 |
| IEC448 | BRAGANÇA | PA | 23/05/1995 |
| IEC440 | MARAPANIM | PA | 24/05/1995 |
| IEC522 | SALINÓPOLIS | PA | 31/05/1995 |
| IEC538 | MELGAÇO | PA | 31/05/1995 |
| IEC557 | BRAGANÇA | PA | 31/05/1995 |
| IEC608 | BRAGANÇA | PA | 01/06/1995 |
| IEC541 | SALINÓPOLIS | PA | 02/06/1995 |
| IEC555 | BREVES | PA | 03/06/1995 |
| IEC606 | BRAGANÇA | PA | 03/06/1995 |
| IEC575 | CAMETÁ | PA | 05/06/1995 |
| IEC568 | SANTARÉM | PA | 06/06/1995 |
| IEC579 | PORTEL | PA | 06/06/1995 |
| IEC598 | BELÉM | PA | 07/06/1995 |
| IEC630 | LIM. DO AJURU | PA | 14/06/1995 |

Relação das amostras de *V. cholerae* O1 clínicas incluídas no estudo, 1994 a 1995.

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | UF | DATA |
|---------------------|----------------------------|-----------|-------------|
| IEC654 | BRAGANÇA | PA | 16/06/1995 |
| IEC838 | ALMERIM | PA | 17/06/1995 |
| IEC656 | BRAGANÇA | PA | 26/06/1995 |
| IEC667 | AUGUSTO CORRÊA | PA | 01/07/1995 |
| IEC664 | OEIRAS DO PARÁ | PA | 03/07/1995 |
| IEC673 | SALINÓPOLIS | PA | 03/07/1995 |
| IEC751 | BELÉM | PA | 04/07/1995 |
| IEC679 | CURUÇÁ | PA | 06/07/1995 |
| IEC680 | CAMETÁ | PA | 06/07/1995 |
| IEC849 | MONTE DOURADO | PA | 08/07/1995 |
| IEC690 | PRIMAVERA | PA | 12/07/1995 |
| IEC707 | VIGIA | PA | 12/07/1995 |
| IEC711 | MARAPANIM | PA | 25/07/1995 |
| IEC717 | CHAVES | PA | 25/07/1995 |
| IEC748 | LIMOEIRO DO AJURU | PA | 25/07/1995 |
| IEC757 | ANANINDEUA | PA | 28/07/1995 |
| IEC758 | MOJU | PA | 28/07/1995 |
| IEC749 | BELÉM | PA | 01/08/1995 |
| IEC788 | BRAGANÇA | PA | 01/08/1995 |
| IEC794 | VIGIA | PA | 02/08/1995 |
| IEC771 | SALINÓPLIS | PA | 03/08/1995 |
| IEC772 | QUATIPURU | PA | 05/08/1995 |
| IEC767 | SÃO CAETANO DE ODIVELAS | PA | 06/08/1995 |
| IEC796 | COLARES | PA | 09/08/1995 |
| IEC762 | ANANINDEUA | PA | 16/08/1995 |

Relação das amostras de *V. cholerae* O1 clínicas incluídas no estudo, 1994 a 1995.

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | UF | DATA |
|--------------|-----------|----|------------|
| IEC808 | CHAVES | PA | 25/08/1995 |
| IEC844 | BELÉM | PA | 01/09/1995 |
| IEC846 | VIGIA | PA | 04/09/1995 |
| IEC851 | VIGIA | PA | 01/10/1995 |
| IEC853 | MACAPÁ | AP | 09/11/1995 |

Relação das amostras de *V.cholerae* não O1 de procedência clínica

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | ESTADO | DATA DE ISOLAMENTO |
|--------------|-----------|--------|--------------------|
| IEC189 | MACAPÁ | AP | 02/01/1995 |
| IEC185 | MACAPÁ | AP | 24/12/1994 |

Relação das amostras de *V.cholerae* O1 e não O1 de procedência ambiental

| REGISTRO IEC | MUNICÍPIO | UF | DATA DE ISOLAMENTO | FONTE | SOROGRUPO |
|--------------|-----------|----|--------------------|------------------------------|---------------------------|
| IEC1081 | OIAPOQUE | AP | 12/08/1994 | ÁGUA DO RIO OIAPOQUE | <i>V. cholerae</i> O1 |
| IEC1088 | MACAPÁ | AP | 12/08/1994 | ÁGUA DO RIO OIAPOQUE II | <i>V. cholerae</i> não O1 |
| IEC1096 | MACAPÁ | AP | 19/08/1994 | ÁGUA DO BALNEÁRIO DO ARAXÁ I | <i>V. cholerae</i> não O1 |
| IEC1099 | MACAPÁ | AP | 26/08/1994 | ÁGUA DO CANAL DO JANDIÁ | <i>V. cholerae</i> não O1 |
| IEC1116 | MACAPÁ | AP | 02/09/1994 | ÁGUA DO IGARAPÉ DA FORTALEZA | <i>V. cholerae</i> não O1 |