



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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Vibrio*
cholerae DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

LENA LÍLLIAN CANTO DE SÁ

Belém-Pará

2009

LENA LÍLLIAN CANTO DE SÁ

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Vibrio*
cholerae DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente

Belém-Pará

2009

Sá, Lena Líllian Canto

Diversidade Genética de Isolados Ambientais de *Vibrio cholerae* da Amazônia Brasileira, Belém-Pará, 2009 / Lena Líllian Canto de Sá. --- Belém, 2009.

147f.: Il.; 30 cm.

Orientadora: Ana Carolina Paulo Vicente

Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) --- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 2009.

1. *Vibrio cholerae* 2. Diversidade 3. Amazônia brasileira

I. Vicente, Ana Carolina. II. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

LENA LÍLLIAN CANTO DE SÁ

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Vibrio cholerae* DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pela comissão formada pelos professores:

Orientadora: Prof. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente
Laboratório de Genética Molecular de
Microrganismos Instituto Oswaldo Cruz-RJ

Banca Examinadora: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva
Departamento de Genética, UFPA

Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Instituto Evandro Chagas, IEC/SVS/MS

Prof. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro
Departamento de Microbiologia, UFPA

Prof. Dra. Antonia Benedita Rodrigues Vieira
Departamento de Microbiologia, UFPA

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira (suplente)
Departamento de Farmácia, UFPA

Belém, 30 de Setembro de 2009



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



ATA DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DA TESE EM BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS, APRESENTADA E DEFENDIDA PELA DOUTORANDA LENA LÍLLIAN CANTO SÁ.

No dia 30 de setembro de dois mil e nove, às 09 horas, reuniu-se no Auditório III do Instituto Evandro Chagas, a Comissão Examinadora da Defesa da Tese em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, apresentada e defendida pela doutoranda LENA LÍLLIAN CANTO SÁ, intitulada: "**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS AMBIENTAIS DE *Vibrio cholerae* DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**". A Comissão Examinadora, organizada e obedecendo ao disposto nas Resoluções do Conselho Superior de Ensino e Pós-Graduação, foi constituída pelos seguintes Professores: Profa. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente, na condição de Presidente (sem direito a voto) e pelos Membros: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva, Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro, Profa. Dra. Antônia Benedita Rodrigues Vieira, Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro. Após haver a candidata apresentado sua Tese, e obedecendo ao prazo regimental, foi dada a palavra aos examinadores para arguição, tendo a discente respondido as perguntas formuladas. Logo após, reuniu-se a Comissão Examinadora para proceder ao julgamento, sendo atribuídas as seguintes notas: Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva, nota...10,0..., Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro, nota...10,0..., Profa. Dra. Antônia Benedita Rodrigues Vieira, nota...10,0... e Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro, nota...10,0... Assim sendo, a Comissão Examinadora decidiu recomendar a outorga do grau de DOUTORA em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários a discente LENA LÍLLIAN CANTO SÁ. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos e foi lavrada a presente Ata, que vai devidamente assinada pelo Presidente e demais Examinadores.

Belém-PA, 30 de setembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente.

Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva.

Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro.

Profa. Dra. Antônia Benedita Rodrigues Vieira

Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro

“Ele se move ao longo de grandes trilhas de convivência humana, nunca mais rápido que o caminhar do povo, e, via de regra, mais lentamente. Ao se propagar a uma ilha ou continente ainda não atingidos, surge sempre primeiramente num porto marítimo. Jamais ataca as tripulações de navios que vão de um país livre de cólera para outro onde ela se está desenvolvendo, até que eles tenham entrado num porto, ou que tenham tido contato com o litoral. O seu avanço preciso de cidade para cidade nem sempre pode ser seguido; contudo, o cólera jamais apareceu, exceto onde tenha havido abundantes oportunidades para que fosse transmitido por convívio humano.”

In: Sobre a Maneira de Transmissão do Cólera

John Snow, Londres, 1854

A Deus pelo seu infinito amor que nos momentos difíceis ajuda-me a ter esperança e a superar obstáculos e por todas as demonstrações de que sua presença é real em meu viver.

Aos meus pais Newton e Ruth Sá por todo o legado transmitido e pelo apoio em mais esta etapa de minha formação.

Ao meu marido Massimo Roberto Morais pelo seu amor incondicional a mim e aos nossos filhos; pela cumplicidade, compreensão, carinho e apoio, sem os quais, tudo seria muito mais difícil.

Aos meus filhos Letícia de Cássia (não mais presente), Ariadine Cristine (4 anos) e Matheus Máximo (5 meses) que mesmo tão pequeninos conseguem encher meu coração de força, alegria e coragem para lutar.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente pela oportunidade, incentivo, confiança, paciência, ensinamentos, conselhos e, sobretudo, pela amizade. Tenho por você grande admiração e respeito pelo que você é e pelo que representa no meio acadêmico. Serei eternamente grata pela orientação criteriosa e crítica que muito contribuíram para minha formação.

A Dra. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos, por quem cultivo profunda admiração e respeito, pelo constante apoio, incentivo, amizade, e, sobretudo, por acreditar em nosso potencial. Meus sinceros agradecimentos pela confiança.

Aos Professores Doutores Artur Silva, Edvaldo Loureiro, José Maria Vieira, Karla Ribeiro e Antonia Vieira por terem aceitado compor a banca examinadora desta tese e pelas criteriosas contribuições.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da UFPA, na pessoa do Prof. Dr. Sandro Percário, por todo apoio. Agradecimento extensivo aos coordenadores que o antecederam, Antonio Valinoto e Luis Fernando Machado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da UFPA pelos ensinamentos ministrados.

Ao Instituto Evandro Chagas/SVS/MS e seu corpo técnico e administrativo pela oportunidade e por ter possibilitado a aquisição de equipamentos, *softwares* e consumíveis necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

A FIOCRUZ/MS, por meio do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos-LGMM, pela concessão de materiais, reagentes e apoio técnico em diferentes etapas deste trabalho.

As Doutoradas Verônica Vieira, Erica Lourenço, Fernanda Freitas e Rosa Koko do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos da FIOCRUZ-RJ pelos ensinamentos sobre PFGE e pelo apoio no sequenciamento de genes.

Aos Doutores Edvaldo Loureiro, Karla Ribeiro, Lúzio Ramos e Zéa Lins pela importante participação na etapa que precedeu este estudo (isolamento e identificação de espécimes ambientais e clínicos de *Vibrio cholerae* da Amazônia brasileira no período de 1977 a 1999).

Aos Professores Doutores, Maria Paula Schneider, Marcio Nunes, Karla Lima e Luis Fernando Machado pela importante contribuição no plano de qualificação.

A Dra. Iracina Maura de Jesus, chefe da Seção de Meio Ambiente-SAMAM/IEC, pela compreensão, amizade e pelo apoio incondicional a este e a todos os outros projetos e anseios do Laboratório de Microbiologia Ambiental.

A Dra. Maria de Fátima Assis pela agradável convivência, conselhos e estímulo constante e pela revisão ortográfica do plano de qualificação e da tese.

A Juliana Perez Chaparro pela revisão do abstract e pela inestimável ajuda na finalização e impressão do manuscrito e na preparação dos slides para defesa.

Aos amigos Pio Girard, Geralda Resende e Elivam Vale por nunca me deixarem sem apoio nas horas difíceis e pelas conquistas e vitórias do Laboratório de Microbiologia Ambiental-LMA da SAMAM/IEC.

A Neila Patricia e Raimundo Pio pelo inestimável auxílio técnico na genotipagem das amostras por PFGE.

Aos recém chegados ao LMA/SAMAM/IEC, Vanessa Costa, Francisco Arimatéia e Samara Cristina pelo importante apoio técnico e amizade no decorrer da minha licença

maternidade, em especial a Vanessa, que durante este período assumiu em meu lugar a responsabilidade técnica do LMA, com muita propriedade.

Aos profissionais da SAMAM/IEC/MS, Eleomar Santiago, Isabel Jesus, Marcelo Lima, Bruno Carneiro, Kleber Faial, Rosivaldo Alcantara, Kelson Faial, Adaelson, Elane, Tereza, Elone, Alana, pelo convívio, auxílio e amizade no decorrer desta etapa.

Ao Henri Berghs e Leonardo Dagnoll pelas dicas preciosas sobre o uso do *software BioNumerics*.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DA CÓLERA	18
1.2. TAXONOMIA	24
1.3. ETIOLOGIA DA CÓLERA.....	24
1.5. ECOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DO <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	31
1.6. PATOGENICIDADE E ADAPTABILIDADE AMBIENTAL.....	33
1.7. O GENOMA DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	35
1.8. GENES RELACIONADOS A VIRULÊNCIA DO <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	36
1.8.1. O <i>pilus tcp</i> e <i>msha</i>	37
1.8.2. A toxina colérica (CTX).....	39
1.8.3. O plasmídeo TLC.....	41
1.8.4. Toxinas RTX	42
1.8.5. Hemolisina/citolisina (<i>hlyA</i>), fator quimiotático (<i>hlyB</i>), Fosfolipase (<i>lec</i>), lipases (<i>hlyC</i> ou <i>lipA</i> e <i>lipB</i>) e metaloprotease (<i>prtV</i>).....	44
1.8.6. Outras toxinas	48
1.9. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES.....	49
1.10. INTEGRONS EM <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	50
1.11. GENOTIPAGEM DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	54
1.12. OBJETIVO	60
1.12.1. OBJETIVO GERAL	60

SUMARIO

1.12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>V.CHOLERAE</i> O1 E NAG PARA O ESTUDO MOLECULAR.....	61
2.2. REATIVAÇÃO DAS BACTERIAS ISOLADAS NO PERÍODO DE 1977 A 2007	64
2.3. MANUTENÇÃO E CULTIVO DOS <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	64
2.4. LISE DO <i>VIBRIO CHOLERAE</i> POR CHOQUE TÉRMICO	65
2.5. GENOTIPAGEM POR PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DO DOS CROMOSSOMOS DO <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	65
2.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA OS GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA DO <i>VIBRIO CHOLERAE</i>	67
2.7. DETECÇÃO DE INTEGRONS DE CLASSE I (<i>INTI1</i>), II (<i>INTI2</i>) E III (<i>INTI3</i>) E SEQUENCIAMENTO DOS SEGMENTOS AMPLIFICADOS	69
3. RESULTADOS.....	72
3.1. GENOTIPAGEM	72
3.2. PREVALÊNCIA DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA.....	74
3.3. DETECÇÃO DE INTEGRONS.....	83
4. DISCUSSÃO.....	85
5. CONCLUSÕES.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática do profago VPI (~ 40kb). As cadeias abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem a direção de transcrição (adaptado de Kirn *et al.*, 2000). 40
- Figura 2: Representação esquemática do profago CTX (~ 7 kb). As fases abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem à direção de transcrição (adaptado de Boyd *et al.*, 2000). 42
- Figura 3: Representação esquemática da organização genética do *cluster* da toxina RTX em *V. cholerae*. As fases abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem à direção de transcrição. A barra representa a deleção encontrada no biotipo clássico (adaptado de Chow *et al.*, 2001). 45
- Figura 4: Representação esquemática da organização genética do locus *hly* (~ 8,2 kb) em *V. cholerae*. As fases abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem a direção de transcrição (adaptado de Ogierman *et al.*, 1997). 46
- Figura 5: Representação esquemática de um integron de classe I com cassete gênico inserido no seu segmento variável. Adaptado de Mazel *et al.*, 1998. 54
- Figura 6: Extratégia de utilização dos iniciadores da PCR para detecção e caracterização dos integrons. 72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 7: Dendograma da relação de identidade entre os isolados de *V.cholerae* O1 e NAGs ambientais da Amazônia a partir de perfis de macrorestrição (enzima de restrição NotI) definidos por PFGE. O agrupamento por similaridade foi determinado pelo coeficiente de Dice e método UPGMA. A matriz cinza/preta representa ausência/presença dos genes de virulência (definidos na barra lateral). Quadrados coloridos em verde são os O1 e em vermelho os NAGs. O registro, sorogrupo, fonte, data e origem estão listados ao lado. SG=sorogrupo, Key=registro da amostra, A=ambiental, H=humana. 76
- Figura 8: Exemplos dos perfis de macrorestrição do genoma de *V.cholerae* O1 e NAG ambientais resolvidos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) utilizando a enzima de restrição Not I. 1=NAG, 2-10=O1, 11=El Tor (N16961), 12=El Tor (121), 13=clássico (200), 14=O1, 15=Marcador de peso molecular. 77
- Figura 9: Exemplos de perfis de macrorestrição do genoma de *V.cholerae* O1 resolvidos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) utilizando a enzima de restrição Not I. 1-09=O1, 10=El Tor (N16961), 11=El Tor (121), 12=clássico (200), 13-14=O1, 15=Marcador de peso molecular. 78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 10: Exemplo dos resultados da amplificação por PCR do gene *tcpB-H* em *V.cholerae* O1 ambientais da Amazônia brasileira. 79
- Figura 11: Exemplo dos resultados da amplificação por PCR do gene do gene *ctxAB* em *V.cholerae* O1 ambientais da Amazônia brasileira. 80
- Figura 12: Exemplo dos resultados da amplificação por PCR do plamídeo TCL em *V.cholerae* O1 ambientais da Amazônia brasileira. 80
- Figura 13: Distribuição de genes associados à virulência entre os 148 isolados de *V.cholerae* O1 e NAG de fontes ambientais. A matriz cinza/preta representa ausência/presença dos genes de virulência por PCR. Os quadrados coloridos representam: verde=sorogrupo O1, vermelho=NAG. Reg=registro da amostra, SG=sorogrupo, A=ambiental, H=humano. 82
- Figura 14: Composição e organização dos integrons de classe 1 dos (A e B) isolados ambientais de *V.cholerae* NAG da Amazônia brasileira. 85
- Figura 15: Perfis de macrorestrição e de genes associados a virulência nos isolados ambientais de *V.cholerae* NAG da Amazônia brasileira com integrons de classe 1. A matriz cinza/preta representa ausência/presença dos genes de virulência por PCR. Os quadrados coloridos em vermelho=NAG. Key=registro da amostra. 85

RESUMO

Vibrio cholerae, agente etiológico da cólera, é uma bactéria nativa de ambientes aquáticos de regiões temperadas e tropicais em todo o mundo. A cólera é endêmica e epidêmica em países da África, Ásia e Americas Central e do Sul. Neste trabalho o objetivo foi estudar a diversidade genética de isolados desta espécie, de ambientes aquáticos da Amazônia brasileira. Um total de 148 isolados de *V.cholerae* não-O1 e não-O139 (NAGs) e O1 ambientais da Amazônia, obtidos entre 1977 e 2007, foram caracterizados e comparados a linhagens clínicas de *V.cholerae* O1 da sexta e sétima pandemias. Utilizou-se os perfis de macrorestrição definidos em eletroforese em gel de agarose em campo pulsado (PFGE), para determinar a relação clonal entre *V.cholerae* non-O1 e O1 ambientais e clínicos. A presença de genes de virulência (*hlyA/hem*, *hlyB*, *hlyC*, *rtxA*, *rtxC*, *tcp*, *ctx*, *zot*, *ace*, *stn/sto*) e integrons de classe 1, 2 e 3 (*intI* 1, 2 e 3), foi analisada utilizando-se a reação em cadeia da polimerase. A análise dos perfis de macrorestrição revelou que os NAGs apresentaram uma grande diversidade genética comparada aos *V.cholerae* O1. Isolados de NAGs e O1 segregaram em distintos grupos e a maioria dos O1 ambientais apresentou relação clonal com isolados clínicos da sétima pandemia de cólera. A distribuição dos genes de virulência entre os NAGs é diferente a dos O1, os quais, em geral, foram positivos para todos os genes de virulência estudados exceto *stn/sto* e integrons de classe 1, 2 e 3. Alguns *V.cholerae* O1 ambientais pertencentes a linhagem da sétima pandemia, apresentaram uma extensiva perda de genes. Diferentes NAGs foram *stn/sto*⁺ e *intI* 1⁺. Dois alelos do gene *aadA* foram encontrados: *aadA2* e *aadA7*. De modo interessante os *V.cholerae* O1 ambientais pertencentes à linhagem pandêmica, só foram isolados durante o período da última epidemia de cólera na região Amazônica brasileira (1991-1996).

ABSTRACT

Vibrio cholerae, the etiologic agent of cholera, is an autochthonous bacterium of aquatic environment in temperate and tropical regions of the world. Cholera is endemic and epidemic in many countries in Africa, Asia and Central and South America. In this study our goal was to determine the genetic diversity of *V.cholerae* environmental isolates from aquatic ecosystems in the Amazon region of Brazil. A total of 148 environmental strains of *V.cholerae* non-O1 and non-O139 (NAG) and O1 serogroups, isolated from the Amazon region since 1977 to 2007, were characterized and compared with clinical strains of *V.cholerae* O1 from sixth and seventh cholera pandemic. PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) was performed to determine the clonal relationships between *V.cholerae* non-O1, O1 environmental and clinical strains. The presence of virulence genes (*hlyA/hem*, *hlyB*, *hlyC*, *rtxA*, *rtxC*, *tcp*, *ctx*, *zot*, *ace*, *stn/sto*) and class 1, 2 and 3 integrons (*intI* 1, 2 e 3) was analyzed by polymerase chain reaction. Whole genome macrorestriction analysis revealed that the environmental *V.cholerae* NAGs were more diverse than the environmental O1 strains, both groups segregate in distinct clusters and most of environmental O1 strains show a clonal relationship with seventh cholera pandemic strains. The distribution of virulence genes in NAGs strains is largely different from that of O1 strains which, in general, were positive for all virulence genes analyzed excepting for *stn/sto* and class 1, 2 and 3 integrons. Some O1 environmental strains, belonging to the seventh pandemic lineage, went through an extensive gene loss. Distinct NAGs strains were *stn/sto*⁺ and *intI* 1⁺. Two alleles of *aadA* were found: *aadA2* and *aadA7*. Interestingly, *V.cholerae* O1 environmental strains belonging to the pandemic lineage were only isolated during the period of cholera epidemic in the Amazon region of Brazil (1991-1996).

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Vibrio* abriga atualmente 12 espécies patogênicas para humanos, incluindo o *Vibrio cholerae*. Este gênero tem sido associado a doenças veiculadas por água e alimentos (Pruzzo *et al.*, 2005a; 2008). O *Vibrio cholerae* sorogrupos O1 e O139, são considerados os de maior importância clínica devido sua associação com pandemias (O1) ou epidemias (O1 e O139) de cólera ou diarreia grave muito semelhante a cólera (*cholera-like*), em muitas partes do mundo (Kaper *et al.*, 1995; Raychoudhuri *et al.*, 2009). Outras espécies do gênero capazes de causar diarreia em humanos são: *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*, *V.alginolyticus*, *V.damsela*, *V.fluvialis*, *V.furnissii*, *V.hollisae*, *V.metschnikovii* e *V.mimicus*; todas ocorrem naturalmente em ambiente aquático, que tem um importante papel na persistência, disseminação, evolução e transmissão destes agentes para humanos (Colwell, 1996; Alam *et al.*, 2007).

A cólera (CID A09) é uma doença infecciosa intestinal aguda, exclusiva dos seres humanos, de veiculação predominantemente hídrica, causada pela enterotoxina (CTX) do *V.cholerae*. As manifestações clínicas são variadas e vão desde infecções inaparentes e quadros leves, predominantemente pelo biotipo El Tor, a graves, que se caracterizam por início repentino de diarreia aquosa e abundante, sem dor, vômitos ocasionais e câimbras. Esse quadro, quando não tratado prontamente, pode evoluir para desidratação grave, acidose metabólica, insuficiência renal e choque hipovolêmico. A taxa de mortalidade pode chegar a 50%, mas com tratamento adequado não chega a 1% (Kaper *et al.*, 1995; Nitrini *et al.*, 2002; Sack *et al.*, 2004; Matson *et al.*, 2007).

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DA CÓLERA

Segundo Barua (1992), as seis primeiras pandemias teriam ocorrido no período entre 1817 a 1923. A primeira pandemia (1817 e 1823) estendeu-se do vale do rio Ganges a regiões da Ásia e norte da África. Durante as quatro seguintes, a propagação da cólera deveu-se às rotas comerciais, migrações, e deslocamento de exércitos atingindo além da Ásia e África, a Europa e as Américas (Barua, 1992).

A segunda pandemia (1829-1851) de cólera começou quando os russos, após a invasão da Pérsia, levaram a cólera para Europa, pela primeira vez atingida em larga escala. A doença chegou ao continente Americano via México, difundindo-se ainda pelos países da América Central, América do Sul e Estados Unidos, quando surgiu nas cidades de Nova York e Philadelphia. Neste contexto, o ano de 1832 ficou marcado devido a eclosão de uma grande epidemia no Canadá, que começou em Quebec e Montreal e seguiu rapidamente pelo rio St. Lawrence e seus tributários, atingindo o interior deste país (Barua, 1992; Nitrini *et al.*, 2002).

Por ocasião da terceira pandemia de cólera (1852-1859), marcada por uma intensa produção de casos, vários países da Ásia, África, Américas e Europa foram acometidos. Nesta última, restringiu-se a França, Itália e Espanha. Foi nesta época, mais precisamente entre 1854 e 1855, que a cólera, uma doença infecciosa de etiologia ainda desconhecida, aconteceu pela primeira vez no Brasil. Os primeiros casos foram registrados na cidade do Rio de Janeiro em 1854. Já em 1855, chegou a cidade de Belém do Pará por via marítima, trazida pelo galera português “Defensor”, procedente da cidade do Porto, Portugal (Viana, 1992). A partir daí, irradiou com grande rapidez para o interior do Pará e posteriormente para o resto do país, tendo sido registrados, até

1867, aproximadamente 200 mil óbitos (Viana, 1992; Lainson *et al.*, 1997; Beltrão, 1999; Nitrini *et al.*, 2002).

A cólera voltou a fazer vítimas no Brasil durante a quarta pandemia (1863-1879) por volta dos anos 1866-1869 quando atingiu todos os estados do litoral, além de alcançar as tropas brasileiras e argentinas que lutavam na guerra do Paraguai. Por ocasião da quinta pandemia (1881-1896) também foram registrados surtos importantes no Brasil (Barua, 1992), nessa época, o agente etiológico desta doença foi descoberto. Credita-se a Robert Koch este feito, em 1883/1884, por ter sido o primeiro cientista a isolar a bactéria cultivada em placas de gelatina e denominá-la de "*cholera vibrio*". Na mesma época (1884), Filippo Paccini, que estudava um surto de cólera em Floreça, Itália, examinou a mucosa intestinal de vítimas fatais da cólera usando unicamente microscópio óptico e detectou a mesma bactéria, isolada por Koch, em todas as amostras. Nesta ocasião, Paccini sugeriu o carácter contagioso da doença enquanto os médicos e cientistas acreditavam na teoria miasmática (Brock, 1999; Nitrini *et al.*, 2002).

No mesmo período, Jonh Snow estudou a epidemiologia da cólera em várias cidades da Inglaterra, incluindo Birmingham, Manchester e Londres, tendo sido desenvolvido nesta última, o célebre estudo epidemiológico da doença, referencial teórico para esta ciência e aplicação de seu método. Jonh Snow, em 1855, recomendava já naquela época, para contenção da doença, provimento de água em quantidade e qualidade adequadas, livre de contaminação por excretas de natureza humana (Nitrini *et al.*, 2002).

Após essas descobertas, iniciava-se uma nova era na análise das condições de saúde e doença dos grupos humanos, ou seja, definir medidas profiláticas,

diagnósticas e de tratamento, desta vez baseados na etiologia correta das doenças. A partir de então, a cólera passou a se manifestar mais intempestivamente nos países onde as condições de saneamento básico eram precárias (Snow, 1999). No período de 1893-1895 a cólera retornou ao Brasil pela terceira vez, atingindo a capital do estado de São Paulo e algumas cidades do Vale do Paraíba, com extensão ao Rio de Janeiro (Lainson *et al.*, 1997; Nitrini *et al.*, 2002).

Até quase o final da sexta pandemia (1899-1923), admite-se que todos os casos de cólera haviam sido causados pelo *V. cholerae* O1 biotipo clássico, até que em 1905 foi caracterizado o *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, entretanto, este só foi relacionado às epidemias cerca de 60 anos mais tarde, por ocasião da eclosão da sétima pandemia (Barua, 1992; Lainson *et al.*, 1997; Nitrini *et al.*, 2002).

A sétima e atual pandemia teve seu início registrado em 1961 na Ilha de Sulawesi (ex-Célebes, na Indonésia). Por uma década o *V. cholerae* O1, biotipo El Tor acometeu principalmente a Ásia e Oriente Médio, já nos anos 70, dispersou-se para África, sul da Europa e ilhas do Pacífico, com eventuais achados nos Estados Unidos e Austrália (Barua, 1992; Blake, 1994). Ao atingir a África em 1970, o trânsito de navios e aeronaves entre os continentes europeu, africano e a costa brasileira, foi causa de grande preocupação por parte das autoridades internacionais, em função do alto risco da reintrodução do vibrião no hemisfério ocidental (Barua, 1992; Lainson *et al.*, 1997; Nitrini *et al.*, 2002).

Prevedo uma nova entrada da cólera no Brasil, em 1971 o Ministério da Saúde, em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), instituiu no país um Programa Nacional para Vigilância da Cólera que foi integrado à Rede Nacional de Laboratórios de Saúde

Pública, com treinamento de pessoas, capacitando-as a realizar o diagnóstico laboratorial da cólera, seguindo técnicas padronizadas pela OMS e Centro de Controle de Doenças (CDC), Atlanta, EUA. A vigilância laboratorial da cólera passou a ser realizada em todo o território brasileiro, ficando o Instituto Evandro Chagas-IEC, como referência para a região Norte (Lainson *et al.*, 1997).

Em 1973, o Ministério da Saúde criou a Comissão Nacional de Prevenção a Cólera, que se desdobrou em 17 comissões estaduais e algumas municipais, sendo responsável pela vigilância da cólera, desde 1971, a Seção de Bacteriologia do Instituto Evandro Chagas-IEC/MS-Pa. Naquele ano, o IEC deu início a investigações sobre a possível ocorrência desta bactéria na região e, em 1974, passou a investigar a presença do vibrião colérico e de outras bactérias enteropatogênicas nos esgotos sanitários de Belém. A partir de 1975, o IEC em colaboração com a Capitania dos Portos, Aeroportos e Fronteiras de Belém, passou a exercer o controle de imigrantes da Europa, África, inclusive portugueses de colônias africanas e Ásia. Num período de nove anos, foram examinadas 750 amostras de esgoto, observando-se uma frequência de isolamento de *V. cholerae* não O1 e não O139 (NAG) de 5,6% (Loureiro, 1986; Lainson *et al.*, 1997).

Com o declínio da pandemia no fim da década de 70, observou-se um relaxamento mundial na vigilância epidemiológica da cólera. No Brasil, mais especificamente no estado de São Paulo, um programa de vigilância da cólera analisou entre os anos de 1974 a 1983, 12.867 amostras. Neste período, nenhum caso de cólera foi detectado, entretanto, obteve-se o isolamento de *V. cholerae* O1 não toxigênico e *V. cholerae* NAG a partir de amostras de água de esgoto (Martins, 1988; Hofer & Fernandez, 1990; Martins *et al.*, 1991).

Em 1989, a doença passou a apresentar um recrudescimento significativo na Ásia e na África e, em janeiro de 1991, a sétima pandemia eclodiu na América do Sul. Os primeiros casos surgiram no litoral do Peru em janeiro de 1991 e, a partir daí, alastraram-se pelas Américas Central e do Sul (PAHO, 1991; Tauxe *et al.*, 1994) de modo que ao final de 1993, com exceção do Uruguai, todos os países da América do Sul já estavam afetados pelo vibrião colérico (Toledo, 1993; Lainson *et al.*, 1997; Nitrini *et al.*, 2002).

Neste contexto, a cólera ressurgiu no Brasil em 1991, através do estado do Amazonas, mais especificamente nos municípios de Benjamin Constant e Tabatinga, na tríplice fronteira do Brasil com a Colômbia e Peru, em decorrência da grande pressão de transmissão procedente de Letícia, na Colômbia, e Iquitos, no Peru. A partir daí, o *V. cholerae* O1 biotipo El Tor provocou surtos em várias comunidades ribeirinhas ao longo, principalmente, dos rios Solimões/Amazonas, espalhando-se progressivamente pela região Norte, seguindo o curso destes rios e seus afluentes, principal via de deslocamento de pessoas na região Norte (Brasil, 2005; Brasil, 2008; Nitrini *et al.*, 2002).

Ainda em 1991 o Maranhão já havia registrado sete casos. No ano seguinte, a região Nordeste, principalmente, e Sudeste, foram atingidas através dos principais eixos rodoviários. Em fevereiro de 1992, a cólera foi detectada no sertão da Paraíba e, logo em seguida no agreste de Pernambuco. Até o final deste mesmo ano, todos os estados do nordeste foram atingidos tendo sido registrado um caso autóctone no Rio de Janeiro e um no Espírito Santo. Em 1993 a doença avançou para as regiões Sudeste e Sul, tendo sido registrado casos em Minas Gerais (57), Espírito Santo (100), Rio de Janeiro (267), São Paulo (11) e Paraná (6). Em 1994, a cólera passou a ter a maioria dos

casos concentrados na região Nordeste, cujos estados (Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Alagoas) apresentavam os maiores coeficientes de incidência (Brasil, 2008).

A epidemia de cólera manteve-se na Amazônia, mais especificamente nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia e Amapá, de 1991 a 1998, com um total de 11.613 casos confirmados pelo Ministério da Saúde do Brasil. Tocantins e Roraima não registraram casos até hoje. No Pará, a epidemia manteve-se de 1991 a 1996. O número de casos confirmados foi de 4.798, tendo a maioria deles ocorrido no ano de 1992 (Tabela 1).

Tabela 1: Número e percentagem de casos de cólera no Brasil, 1991 – 2008.

REGIÃO	NÚMERO	%
Norte	11.613	6,89
Nordeste	155.357	92,15
Sudeste	860	0,51
Sul	473	0,28
Centro-Oeste	285	0,17
Brasil	168.588	100

FONTE: Adaptado de <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_colera_1991_2008.pdf> Acessado em 12/08/2009.

Após uma importante diminuição dos casos de cólera no Brasil, a partir de 1995, observou-se em 1999 um recrudescimento da epidemia, tendência que não se confirmou no ano de 2000, com o registro de 733 casos, todos procedentes da região Nordeste, em sua grande maioria dos estados de Pernambuco e Alagoas (Brasil, 2008).

Com exceção dos casos registrados por ocasião de surtos nos estados de Minas Gerais e Paraná, todos os outros computados nos anos de 1999, 2000 e 2001 ocorreram na região Nordeste. Embora em 2002 e 2003 nenhum caso da doença tenha

sido confirmado no País, o *V.cholerae* O1 foi isolado de amostras ambientais coletadas em municípios dos estados de Alagoas e Pernambuco, além disso, houve a identificação do *V.cholerae* O1, sorotipo Inaba em uma amostra clínica do estado de Alagoas, com toxigenicidade negativa. Em 2004, foram confirmados 21 casos autóctones. Em 2005 outros cinco casos autóctones foram registrados, todos procedentes do estado de Pernambuco (Brasil, 2008).

Em 2006 e 2007, não foram confirmados casos autóctones de cólera no Brasil, entretanto, um *V.cholerae* O1 Ogawa não toxigênico foi isolado de uma amostra de água superficial coletada do Igarapé Tucunduba no município de Belém-Pa (Sá, L.L.C. comunicação pessoal).

1.2. TAXONOMIA

O gênero *Vibrio* compreende, atualmente, 72 espécies reconhecidas e está incluído na família Vibrionaceae juntamente com os gêneros *Photobacterium* (N=16), *Aliivibrio* (N= 4), *Enterovibrio* (N=4), *Salinivibrio* (N=3) e *Grimontia* (N=1). Ao todo o grupo dos vibrios, incluindo todas as espécies da família Vibrionaceae, compreende 100 espécies (Euzéby, 2009).

1.3. ETIOLOGIA DA CÓLERA

O agente etiológico da cólera é o *V.cholerae* O1, biotipo clássico e El Tor. Mais recentemente, o sorogrupo O139 desta espécie tem também sido incluído na etiologia desta doença (Nitrini *et al.*, 2002). Segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1984), a família Vibrionaceae é composta por bacilos Gram-negativos,

retos ou curvos, com flagelação polar única, são quimiorganotróficos e possuem metabolismo fermentativo e oxidativo. A maioria produz oxidase e requer de 2% a 3% de cloreto de sódio para crescimento ótimo, entretanto, o *V.cholerae* apresenta crescimento tanto em caldo nutritivo sem adição de NaCl quanto com adição deste sal a 1%. É oxidase positivo, reduz nitrato a nitrito, apresenta reação negativa nas provas de fermentação do *mio*-inositol e arginina diidrolase e positiva nas provas da lisina e ornitina descarboxilase (Nitrini *et al.*, 2002; Winn Jr *et al.*, 2008).

Os *V. cholerae* NAG tem sido reconhecidos como agentes etiológicos de casos isolados e surtos de diarreia muito semelhante a cólera (Bhattacharya *et al.*, 1992; Russel *et al.*, 1992; Ramamurthy *et al.*, 1993; Dakin *et al.*, 1974; Sharma *et al.*, 1998). Muitos apresentam características epidemiológicas de crescente importância, pois nem sempre se detecta qualquer fator de virulência conhecido entre eles (Bag *et al.*, 2008) ou, como já observado em outros casos, é possível a detecção da toxina colérica (CTX) e/ou do *pilus* TCP, toxina termoestável (ST), além do gene regulatório *ToxR* em isolados de casos clínicos ou de origem ambiental (Ramamurthy *et al.*, 1993; Bagchi *et al.*, 1993; Dalsgaard *et al.*, 1995b; Mukhopadhyay *et al.*, 1995; Nandy *et al.*, 1995; Ghosh *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 2001).

O *V. cholerae* é classificado em sorogrupos ou sorovares com base nos seus antígenos somáticos (antígenos O), de modo que até o momento, 206 já foram identificados, sendo os sorogrupos O1 e O139 toxigênicos diretamente associados à cólera epidêmica (O1 e O139) ou pandêmica (O1) (Raychoudhuri *et al.*, 2009). O restante dos sorogrupos de *V. cholerae*, possuem as mesmas características morfológicas e bioquímicas dos sorogrupos O1 e O139, porém, não aglutinam com estes antisoros específicos e sim com seus próprios antisoros e, por este motivo, ficaram

conhecidos como não O1 e não O139 (NAG-*non agglutination group*). Vale a pena ressaltar que a transformação de um sorogrupo em outro pode ocorrer, inclusive, em reservatórios aquáticos (Colwell *et al.*, 1995) e são provenientes de recombinações homólogas, entre as regiões codificadoras dos determinantes antigênicos, genes *rfb* (Blokesch & Schoolnik, 2007), ou por mutação e/ou rearranjo, como ocorrido com a linhagem Bengal O139 (Salles *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2002). Deste modo, a caracterização sorológica isoladamente, representa uma ferramenta insuficiente do ponto de vista epidemiológico.

O *V. cholerae* O1 pode ser caracterizado por dois principais sorotipos, Inaba e Ogawa, além do sorotipo Hikojima que raramente é identificado. Esta classificação também é baseada na detecção das frações A, B e C do antígeno somático O. O sorotipo Inaba apresenta as frações A e C, o Ogawa (A e B) e o Hikojima (A, B e C) (Sakazaki, 1970; Kaper *et al.*, 1995; Sack *et al.*, 2004; Winn Jr *et al.*, 2008).

Linhagens de *V. cholerae* O1 podem pertencer aos biotipos, clássico e El Tor. Esta classificação taxonômica subespecífica não é diretamente relacionada aos processos de manejo clínico da cólera, entretanto, é de grande importância epidemiológica em saúde pública visto que permite a identificação da fonte e dispersão da infecção, sobretudo, quando *V. cholerae* é isolado pela primeira vez em uma dada região geográfica ou país (Raychoudhuri *et al.*, 2008; Winn Jr *et al.*, 2008).

A classificação em biotipo clássico e El Tor está primariamente baseada em propriedades bioquímicas e susceptibilidade a bacteriófagos como resumido no Quadro 1 (Sakazaki, 1970; Kaper *et al.*, 1995; Sack *et al.*, 2004; Winn Jr *et al.*, 2008). Entretanto, métodos de biotipagem molecular tem demonstrado variações entre estes dois biotipos. Uma delas diz respeito a subunidade principal da proteína TCP, gene *tcpA*, que apresenta diferentes alelos entre os biotipos (Kesler & Hall, 1993). O

bacteriófago CTX Φ é ladeado pelo elemento RS1 contendo o gene *rstC* somente nos isolados toxigênicos de *V.cholerae* O1 El Tor e O139 (Waldor *et al.*, 1997). O gene *rtxC* tem sido observado apenas no biotipo El Tor (Lin *et al.*, 1999). A hemolisina *hlyA* do biotipo clássico apresenta uma deleção de 11 nucleotídeos (Rader & Murphy, 1988) e esta diferença tem sido utilizada como marcador para diferenciar o clássico do El Tor (Alm & Manning, 1990). Baseados na estrutura da subunidade B da toxina CTX, Finkelstein *et al.* (1987), designaram de CT1 o protótipo elaborado pelo biotipo clássico e isolados da Costa do Golfo e CT2 aquele produzido pelo biotipo El Tor e isolados do sorogrupo O139. Outra classificação identificou genótipos do gene *ctxB*, baseada em três mudanças de bases que resultam na modificação da sequência de aminoácidos. O genótipo 1 é encontrado em isolados do biotipo clássico e da costa do Golfo, o genótipo 2 no biotipo El Tor e isolados da Austrália e o genótipo 3 é encontrado no biotipo El Tor da sétima pandemia e em cepas epidêmicas da América Latina (Olsvik *et al.*, 1993). Outra análise mostra que o *V.cholerae* El Tor, que causa a forma mais branda da doença, possui uma única cópia do operon da toxina CTX, enquanto que o biotipo clássico possui duas cópias, além disto, apresentam diferenças sutis na maneira como regulam a expressão de fatores de virulência (Dziejman *et al.*, 2002; Matson *et al.*, 2007). Por outro lado, o biotipo El Tor parece possuir melhor adaptabilidade ao ambiente aquático, já tendo sido identificado em diversos ecossistemas aquáticos do mundo (Alam *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2007).

Com o surgimento de isolados de *V.cholerae* O1 com características de “híbridos” entre os biotipos clássico e El Tor (Ansaruzzaman *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 2006; Faruque *et al.*, 2007), além de “variantes” do biotipo El Tor (Nair *et al.*, 2006) muitos dos testes fenotípicos e genotípicos tem se mostrado insuficientes para a correta

classificação de isolados de *V.cholerae* O1, por este motivo, Raychoudhuri *et al.* (2008), propuseram aumentar o número de provas conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 1: Diferenciação entre biotipos de *Vibrio cholerae*

TESTE	CLÁSSICO	EL TOR
Teste do cordão	+	+
β-Hemolítico em ágar sangue de carneiro	-	+
Teste CAMP	-	+
Teste de Voges-Proskauer	-	+
Aglutinação de hemácias de galinha	-	+
Sensibilidade a 50U de polimixina B	S	R
Sensibilidade ao fago IV	S	R
+, teste positivo; -, teste negativo; S, sensível; R, resistente		

Fonte: Winn Jr *et al.*, 2008

O *V. cholerae* O1 biotipo clássico foi descrito por Koch no Egito e na Índia, em 1883/1884, quando o chamou de *Kommabazilus* (bacilo em forma de vírgula). O biotipo El Tor foi isolado por Gotschlich, em 1905/1906, de peregrinos provenientes de Meca, examinados na estação de quarentena de El Tor, situada na península do Sinai, no Egito, e é o responsável pela sétima e atual pandemia de cólera (Tauxe *et al.*, 1994; Nitrini *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2008; Winn Jr *et al.*, 2008).

Até meados de 1992, a relação entre as epidemias de cólera no mundo e o *V. cholerae* O1 era absolutamente direta, sendo o biotipo clássico responsável pelas seis primeiras pandemias (1817 a 1923), e o biotipo El Tor pela sétima, que teve seu início em 1961 permanecendo até hoje. Em 1992, surgiu um novo sorogrupo de *V. cholerae*, isolado por ocasião de uma expressiva epidemia de cólera no sul da Ásia (Índia e Bangladesh) (Albert *et al.*, 1993; Cholera Working Group, 1993; Nair *et al.*, 1994;

Faruque *et al.*, 1998b) onde se mantém até o presente. Esta variante não aglutinou com o anti-soro O1 ou com qualquer dos 138 anticorpos não O1 existentes na época, por isso foi denominado O139. Por ter sido o agente da epidemia iniciada no Golfo de Bengal, ficou conhecido como *V. cholerae* Bengal (Albert *et al.*, 1993). Este novo sorotipo surgiu por modificações na região codificadora dos antígenos O de um *V. cholerae* O1 El Tor (Bik *et al.*, 1995; Mooi & Bik, 1997).

Quadro 2: Novo esquema para biotipagem de *Vibrio cholerae* O1

TESTE	EL TOR	CLÁSSICO	HIBRIDO	VARIANTE EL TOR
Teste de Voges-Proskauer	+	-	+/-	+
Susceptibilidade a 50U de polimixina B	-	+	+/-	-
Agglutinação de hemácias de galinha	+	-	+/-	+
Lise pelo fago IV-clássico	-	+	+/-	-
Lise pelo fago V-El Tor	+	-	+/-	+
Epitopo da CT	CT2	CT1	CT1/CT2	CT1
Genótipo do gene <i>ctxB</i>	El Tor	clássico	El Tor/clássico	clássico
<i>rtxC</i>	+	-	+/-	+
<i>tcl</i>	+	+	+/-	+
Alelo do <i>tcpA</i>	El Tor	clássico	variável	El Tor
Elemento RS	RS1, RS2	RS2	RS1, RS2/RS2	RS1, RS2/RS2

Fonte: Raychoudhuri *et al.*, 2008

Em 1995, foi descrito uma nova linhagem do *V. cholerae* O1 oriunda de casos de diarreia típica ocorridos em 1991 e 1992, com diagnóstico clínico-epidemiológico e laboratorial de cólera, em residentes de algumas vilas da região do alto Solimões, no estado do Amazonas. Esta variante, além de não possuir nenhum dos fatores associados à virulência (CTX-*cholera-toxin* e TCP-*toxin-coregulated pilus*), não

é geneticamente relacionada aos biotipos até então associados com a cólera (clássico e El Tor). Esse foi denominado *V. cholerae* Amazônia (Coelho *et al.*, 1995a; b).

Ainda na Região Norte, e dentro da atual pandemia, mais uma vez contrariando o tradicional diagnóstico do vibrião colérico, que é reconhecido fenotipicamente por fermentar a sacarose, Ramos *et al.* (1997) isolaram em 1994, um *V. cholerae* fermentador tardio de sacarose, durante um surto de cólera no município de Oiapoque, estado do Amapá. A caracterização molecular destes isolados mostrou que estas variantes pertencem ao mesmo MLEE (perfil isoenzimático) e AP-PCR (*arbitrary primer*-PCR) da principal cepa epidêmica (*V. cholerae* O1, biotipo El Tor) e possui os genes que codificam para CTX e TCP, associados à virulência. Seria, pois, um El Tor fermentador tardio de sacarose (Vicente, A.C.P., comunicação pessoal).

Entre os anos de 1991 e 1994, foram identificadas variantes de *V. cholerae* O1 toxigênico que representam híbridos entre os biotipos clássico e El Tor, utilizando características fenotípicas e genômicas (genes *tcpA* e *rstR*, e ribotipagem). Estes foram isolados de pacientes hospitalizados com diarreia aguda em Matlab, área rural de Bangladesh e diferenciadas nos tipos Matlab I, II e III. Embora todas tenham demonstrado pertencer a ribotipos previamente encontrados entre os vibrios El Tor, o tipo I apresenta a maioria das características do biotipo clássico, enquanto que nos tipos II e III prevalecem as características do El Tor (Nair *et al.*, 2002) dados confirmados posteriormente por PFGE (Safa *et al.*, 2005).

Considerando a epidemia de cólera da América do Sul, mais uma linhagem do *V. cholerae* O1 foi descrita a partir de pacientes com cólera, residentes na província de Tucumã, Argentina, entre os anos de 1994 e 1998. A variante Tucumã, como foi denominada, também não possui a toxina colérica (CTX) e nem os outros genes que

compõe o cassete de virulência do fago CTXΦ, por exemplo, *tcpA*, *zot* e *ace*, além disso, seu genótipo difere claramente tanto da linhagem Amazônia quanto dos outros isolados clínicos *ctxA*+ da Argentina (Pichel *et al.*, 2003).

Como consequência da identificação de novas linhagens patogênicas de *V. cholerae*, temos atualmente uma nomenclatura que abriga: o *V. cholerae* O1 biotipos clássico e El Tor; *V. cholerae* O139 ou Bengal; *V. cholerae* O1 Amazônia; *V. cholerae* O1 biotipo El Tor sacarose negativo; *V. cholerae* O1 Matlab I, II e III, *V. cholerae* O1 Tucumã, *V. cholerae* NAG e ainda a possibilidade da descrição de novas linhagens patogênicas entre os NAG, a princípio não epidêmicos, mas com importância crescente para a epidemiologia, genética e evolução dos vibriões.

1.5. ECOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DO *Vibrio cholerae*

A ocorrência espacial e temporal das espécies patogênicas do gênero *Vibrio*, bem como sua associação à doença em humanos, está fortemente relacionada a fatores ambientais do habitat aquático de origem (Colwell, 1996; Lipp *et al.* 2002; Pruzzo *et al.* 2008).

Trabalhos relevantes sobre a ecologia dos vibriões de um modo geral tem sido realizados em ambientes marinhos costeiros. Os vibrios são equipados com uma bateria de mecanismos de resposta adaptativa que lhes permite persistir em ambientes hostís, com exigências específicas, tais como: limitações de nutrientes, incidência de radiação ultravioleta, variações de temperatura e protozoários predadores (Colwell, 1996).

A persistência dos vibriões no ambiente aquático tem sido associada a matrizes ambientais preferenciais que funcionam como reservatórios, dentre elas, os

substratos bióticos e abióticos. Entre os substratos bióticos destacam-se os organismos quitinosos, vários crustáceos planctônicos, como os copépodes e amphipodas (Rawlings *et al.*, 2007), e outros organismos de vida livre, como por exemplo, mosquitos da família Chironomidae (Broza *et al.*, 2005). Já o substrato abiótico mais relacionado à presença dos vibrios no ambiente são os sedimentos em suspensão na água. Em ambos os casos, esta bactéria é capaz de formar biofilme por meio de processos que podem envolver colisão randômica ou quimiotaxia, aglomeração reversível ou irreversível, formação de microcolônias ou ainda, por meio da formação de outras estruturas tridimensionais que favorecem a agregação e manutenção microbiana no ambiente (Lipp *et al.*, 2002; Pruzzo *et al.*, 2008).

Tanto os quironomídeos voadores (Broza *et al.*, 2005) quanto os crustáceos planctônicos, que se encontram dispersos na água (Rawlings *et al.*, 2007), participam do processo de disseminação de vibrios patogênicos na natureza (Vezzulli *et al.*, 2008).

A transmissão dos vibrios aos humanos pode ser mediada por contato direto com o microrganismo ou pela ingestão de células a partir do ambiente aquático (Pruzzo *et al.*, 2005b), com destaque para o consumo de moluscos crus ou parcialmente cozidos, especialmente ostra e mexilhão, que por serem filtradores de partículas em suspensão na água, terminam por concentrar espécies microbianas patogênicas (Pruzzo *et al.*, 2005b).

A persistência dos vibriões no ambiente aquático está relacionada à temperatura, salinidade, concentração de matéria orgânica e a presença de plâncton (Lipp *et al.*, 2002). Nos países onde a cólera é endêmica, por exemplo, concentrações de plânctons conteriam a dose infectante (10^6 células de *V. cholerae*) necessária para desencadeamento da cólera por meio do consumo de água não tratada (Colwell, 1996). A população de vibrios no ambiente esta relacionada também a predação entre as

cadeias tróficas, tais como, aquela realizada por protozoários sobre o *V. cholerae* (Worden *et al.*, 2006) e a lise desta espécie por bacteriófagos (Jensen *et al.*, 2006).

1.6. PATOGENICIDADE E ADAPTABILIDADE AMBIENTAL

A transferência horizontal de genes ocorre com frequência entre microrganismos no meio ambiente (Ochman *et al.*, 2000; Wilson & Saliers, 2003). No que diz respeito ao *V. cholerae* no ambiente aquático, destacam-se os recentes achados de Blokesch & Schoolnik (2007), que demonstraram o surgimento do sorogrupo epidêmico O139, via recombinação homóloga de uma cepa O1 El Tor por transferência horizontal de genes.

Outros exemplos importantes de como a transferência horizontal de genes no ambiente aquático podem favorecer a patogenicidade e adaptabilidade ecológica do *V. cholerae* são: a aquisição do fago filamentosso designado VPIΦ, onde residem os genes envolvidos na biosíntese do *pilus* TCP, um fator essencial para colonização intestinal (Davis & Waldor, 2003) e a indução do estado de competência para adquirir material genético exógeno, via transformação bacteriana, durante a fase de crescimento do *V. cholerae* no substrato quitinoso de organismos marinhos (Meibom *et al.*, 2005).

Genes responsáveis pela patogênese do *V. cholerae* podem ser trocados via transferência horizontal de genes entre membros da mesma espécie, entre gêneros distintos, ou até mesmo entre família ou níveis taxonômicos mais altos. Assim, bactérias que não carregam genes de virulência, podem recebê-los de bactérias doadoras e, no mínimo, passarem a funcionar como reservatórios ambientais destes genes. Um exemplo deste processo é a sugestão de que *Vibrio mimicus* funciona como reservatório dos fagos CTXΦ e TCPΦ configurando uma possibilidade de surgimento de novos

isolados toxigênicos de *V. cholerae* no ambiente (Boyd *et al.*, 2000). Outros genes associados à virulência do *V. cholerae* ou à regulação dessa virulência tem sido detectada em outros vibrios ambientais, entre eles *V.cholerae* NAG e *Vibrio alginolyticus* (Xie *et al.*, 2005; Baffone *et al.*, 2006).

Em relação aos estudos das características ambientais dos reservatórios bacterianos na seleção de peculiaridades da patogenicidade dos vibriões, vale a pena ressaltar os mecanismos moleculares que estão por trás da interação do *V.cholerae* com partículas de quitina ou com a superfície quitinosa dos copépodes (Zampini *et al.*, 2005; Kirn *et al.*, 2005). Nestes estudos, a mesma proteína envolvida na ligação do *V.cholerae* com a quitina, também media aderência à cultura de células epiteliais intestinais, pela mesma especificidade de ligação. Tem sido sugerido também que, fatores associados à colonização intestinal (*TCP-toxin-coregulated pilus* e *MSHA-mannose-fucose hemagglutinin*) estão implicados na ligação com a quitina e na formação de biofilmes em superfícies quitinosas, no ambiente aquático (Chiavelli *et al.*, 2001; Reguera & Kolter, 2005). Pelo fato dessas moléculas terem sido relacionadas com a colonização, tanto de superfícies presentes no ambiente quanto de seres humanos, elas tem recebido a denominação de fatores de colonização com duplo papel (*DRCF-dual role colonization factors*) (Vezzulli *et al.*, 2008). Estes fatores representam a ligação entre os dois estágios de vida do *V. cholerae* (ambiente e hospedeiros humanos) e evidenciam que alguns fatores de virulência usados pelo patógeno, durante o processo de infecção, atuam na sua interação com o ambiente natural (Pruzzo *et al.*, 2008). Deste modo, as bactérias portadoras de DRCF, em reservatório ambiental, apresentam melhores condições de adaptabilidade (*environmental fitness*) no que diz respeito a persistência, disseminação e evolução. Além disso, esta peculiaridade pode representar uma

discriminação entre os isolados ambientais e aqueles com potencial patogênico (Zampini *et al.*, 2005).

1.7. O GENOMA DE *Vibrio cholerae*

Em 2000, foi publicado o sequenciamento completo dos 2 cromossomas de *V. cholerae* do isolado El Tor N16961, mostrando que a composição do cromossoma 1 é de 2.961.146 pb (~ 3,0 Mb) e de 1.072.313 pb (~ 1,1Mb) para o cromossoma 2 (Heidelberg *et al.*, 2000). A maioria dos genes necessários para o crescimento e viabilidade celular está localizado no cromossoma 1, embora alguns genes essenciais estejam localizados no cromossoma 2. A presença de 2 cromossomas tem sido demonstrada em todas as espécies do gênero até agora analisadas (Yamaichi *et al.*, 1999).

Aproximadamente 10% do conteúdo do cromossoma 2 é formado por um mega-integron/super-integron/integron cromossomal. Os integrons são elementos de captura e expressão de informação genética (Mazel *et al.*, 1998). As seqüências presentes em elementos denominados cassetes genéticos móveis se integram em um sítio de ligação específico presente no integron (sítio *att*) através de uma recombinação sítio-específica. A recombinação é feita mediante a ação de uma integrase que é codificada por um gene presente no próprio integron, geralmente na extremidade 5' conservada. A integrase presente no integron de *V. cholerae* foi classificada como uma integrase de classe IV (*intl4*) (Mazel *et al.*, 1998) e ela reconhece como o sítio de ligação específica (sítio *att*) uma família de seqüências repetidas que foram denominadas de VCRs (*Vibrio cholerae* repeats). Os VCRs são uma família de seqüências de 123-126 pb que se repetem em mais de 100 vezes e estão concentradas

em uma única região no cromossoma 2 (Barker & Manning, 1997; Heidelberg *et al.*, 2000). O super-integron presente no isolado N16961 apresenta 216 ORFs, porém a maioria delas não possui identidade com nenhuma outra seqüência conhecida. Entre os genes identificados encontram-se genes de resistência a drogas, como cloranfenicol acetiltransferase, uma proteína que confere resistência a fosfomicina e glutathione transferase, enzimas envolvidas no metabolismo do DNA e alguns potenciais genes de virulência (hemaglutininas e lipoproteínas) (Barker *et al.*, 1994; Heidelberg *et al.*, 2000).

Até recentemente, todos os integrons conhecidos estavam, principalmente, associados a genes que conferiam resistência aos antimicrobianos, os chamados integrons de resistência classe 1, 2 e 3 (Recchia & Hall, 1995a; 1995b; 1997). A identificação de um integron com características tão peculiares como este primeiramente identificado *V. cholerae*, mas presente em várias espécies do gênero e da família, assim como em espécies de outras famílias de bactérias, sugere que os integrons tenham papel na aquisição de genes de patogenicidade assim como genes envolvidos em diferentes funções biológicas (Mazel *et al.*, 1998; Rowe-Magnus & Mazel, 1999).

1.8. GENES RELACIONADOS A VIRULÊNCIA DO *Vibrio cholerae*

A doença diarréica cólera, consequência da infecção por *V. cholerae* patogênico, envolve um mecanismo complexo com a participação dos genes do *regulon* ToxR. Além do papel essencial da toxina colérica, o TCP (*toxin-coregulated pilus*) é fundamental para a colonização do epitélio intestinal. Outros fatores de colonização incluem o *pilus* MSHA (*mannose-fucose hemagglutinin*), as proteínas regulatórias (por ex. ToxR/ToxS a ToxT), as purinas de membrana externa, os genes biossintéticos da

biotina e purina, as proteínas de membrana externa reguladas pelo ferro (por ex. IrgA), e os fatores acessórios de colonização. Motilidade e quimiotaxia também tem papel na virulência (Thompson *et al.*, 2004).

1.8.1. O *pilus tcp* e *msha*

Na evolução das gastroenterites bacterianas uma etapa essencial é a colonização do epitélio intestinal. Os fatores envolvidos permitem a adesão, persistência e multiplicação do microrganismo sobre o tecido do hospedeiro. Para os vibriões, os mais importantes são os *pilus* TCP e MSHA (Johnson *et al.*, 1992; Franzon *et al.*, 1993; Kovach *et al.*, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 1996b; Karaolis *et al.*, 1998; Karaolis *et al.*, 1999).

O *pilus* TCP possui natureza hidrofóbica, mede cerca de 5 a 7 μm de diâmetro por 10 a 15 μm de comprimento. Consiste de um homopolímero de subunidades idênticas e repetidas de pilina denominada TcpA. As pilinas são proteínas de 20 kDa codificadas pelo gene *tcpA* (Kaufman & Taylor 1994) que pertencem ao tipo 4 da classe das pilinas, proteína expressa por várias bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli* (enterotoxigênica e enteropatogênica), *Neisseria gonorrhoeae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A estrutura primária da TcpA apresenta 82% de identidade na sequência de aminoácidos entre os biotipos clássico e El Tor de *V. cholerae* (Iredell & Manning, 1994).

Todos os genes relacionados à biogênese do *pilus* TCP residem em uma ilha de patogenicidade (*pathogenicity island*-PAI ou *Vibrio pathogenicity island*-VPI), correspondendo ao genoma de um fago filamentoso, designado VPI Φ , que pode ser adquirido pelo *V. cholerae* via transferência horizontal de genes, no ambiente aquático

(Davis & Waldor, 2003). O TCP também funciona como receptor para CTX Φ , bacteriófago filamentosos que codifica a toxina colérica.

O gene *tcpA* apresenta vários alelos, os biotipos clássico e El Tor de *V.cholerae* O1 possuem alelos próprios, enquanto que a linhagem Bengal (O139) compartilha o mesmo alelo com El Tor. Além destes, vários outros alelos já foram identificados em linhagens de *V. cholerae* NAG (Novais *et al.*, 1999; Nandi *et al.*, 2000).

O conjunto dos genes *acf* que codifica quatro genes (*acfABCD*) (Parsot *et al.*, 1991) está localizado imediatamente adjacente e a jusante dos genes *tcp* (Figura 1). Adjacente aos genes *acf*, há a presença de um gene que codifica para uma integrase (*int*) da família de recombinases sítio-específica e um sítio de ligação tipo *att* de 20pb (Kovach *et al.*, 1996). À montante aos genes *tcp*, estão os genes *aldA* e *tagA*, um gene que codifica para uma transposase, algumas ORF de função ainda desconhecida e uma segunda cópia da sequência tipo *att* (Karaolis *et al.*, 1998; Kirn *et al.*, 2000). Toda essa região de aproximadamente 40 Kb, flanqueada por sequências tipo *att*, incluindo os *clusters* de genes TCP-ACF, uma integrase e uma transposase parece constituir uma ilha de patogenicidade, denominada de VPI (Karaolis *et al.*, 1998) e sugere um potencial de mobilização desse elemento como um bacteriófago (Kovach *et al.*, 1996; Karaolis *et al.*, 1998; Karaolis *et al.*, 1999). No entanto, foi visto que a ilha de patogenicidade VPI não gera partículas de fagos, contradizendo estes últimos estudos (Faruque *et al.*, 2003).

O TCP é necessário para a ligação da bactéria à mucosa do intestino humano, que é um componente crucial para a estratégia de infecção do *V. cholerae* (Kaufman & Taylor, 1994). Também foi atribuída ao TCP a função de promover a

agregação de bactérias, dando origem à microcolônias que então colonizam, mais eficientemente, o epitélio intestinal (Kirn *et al.*, 2000).

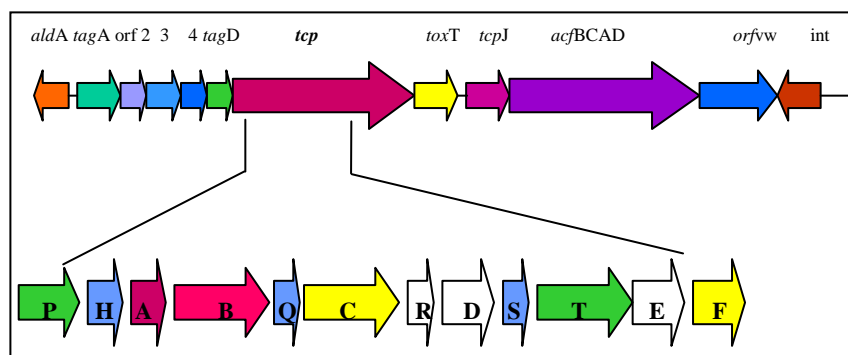


Figura 1: Representação esquemática do profago VPI (~ 40kb). As cadeias abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem a direção de transcrição (adaptado de Kirn *et al.*, 2000).

1.8.2. A toxina colérica (CTX)

A CTX é uma proteína termolábil com 82-84 kDa composta por duas subunidades denominadas A e B, que são codificadas por duas ORFs (*ctxAB*) distintas que se sobrepõem e que estão organizadas em um *operon*, podendo se apresentar em uma ou mais cópias no genoma do *V. cholerae* toxigênico (Mekalanos *et al.*, 1983; Pearson *et al.*, 1993).

Foi caracterizada em 1959 e sua estrutura completa e cristalização foram elucidadas posteriormente (Finkelstein, 1992). Apresenta semelhança estrutural e antigênica à enterotoxina LT de *E.coli*. Sua composição caracteriza-se por uma única subunidade A e cinco subunidades B que ligam a toxina ao receptor GM₁, gangliosídeo localizado na superfície do epitélio intestinal, induzindo a formação de um poro de 15 Å

no centro deste pentâmero que permite a internalização da subunidade A. Uma vez dentro da célula, um fragmento da subunidade A derivado proteoliticamente (A_1), ativa a enzima adenilato ciclase resultando no aumento da produção de AMP cíclico. Este processo resulta na secreção abundante de íons cloreto e água no lúmen intestinal caracterizando a diarreia aguda observada nos pacientes com cólera (Keen & Bujalski, 1992; Shears, 1994; Kaper *et al.*, 1995; Matson *et al.*, 2007). Pacientes com cólera chegam a perder até 20 litros de fluido em um período de 24h, resultando em rápida desidratação e morte em mais de 50% dos casos não tratados; já entre aqueles que recebem rehidratação oral ou intravenosa, a taxa de mortalidade cai para aproximadamente 1% (Matson *et al.*, 2007).

O gene que codifica para a CTX está associado aos genes da Zot (*zot*) e Ace (*ace*) que juntamente com o gene *cep* que codifica uma potencial pilina e uma ORF de função desconhecida (*orfU*), estão localizados numa região de 4,5Kb denominada de região central (*core*) que é flanqueada por uma ou mais cópias de sequências repetitivas quase idênticas chamadas de RS1 (2,7Kb) e RS2 (2,4Kb) constituindo uma organização similar a um transposon, que foi denominado de CTX (Figura 2) (Pearson *et al.*, 1993; Boyd *et al.*, 2000). Em 1996 foi mostrado que este conjunto de genes é parte do genoma de um fago filamentosos e lisogênico, CTX Φ . O genoma do fago abrange a região central e as sequências RS flanqueadoras. Essas sequências RS reúnem os genes responsáveis pelas funções de regulação, replicação e integração do fago (Waldor & Mekalanos, 1996; Waldor *et al.*, 1997).

Além da toxina colérica, a região central do genoma do CTX Φ codifica a toxina que atua na *zônula ocludens* (Zot) e a enterotoxina acessória (Ace). A toxina Zot é reconhecida como capaz de alterar a permeabilidade da mucosa do intestino delgado

afetando a estrutura da junção intercelular ou zônula ocludens (Fasano *et al.*, 1991). A enterotoxina colérica acessória (Ace) é capaz de provocar, de modo similar à toxina colérica (CTX), o acúmulo de fluido em modelo experimental de infecção em alça ileal ligada de coelho (Trucksis *et al.*, 1993). Sugere-se que a agregação de multímeros de Ace na membrana de células eucarióticas levariam à formação de canal iônico desestabilizador do equilíbrio eletrolítico celular (Trucksis *et al.*, 1993).

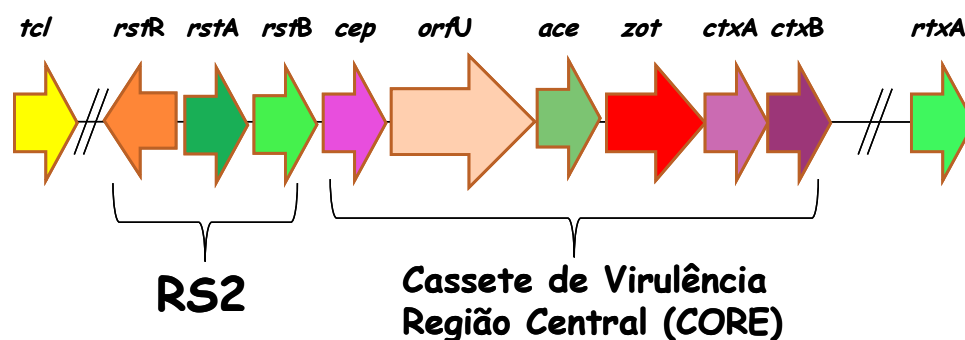


Figura 2: Representação esquemática do profago CTX (~ 7 kb). As fases abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem à direção de transcrição (adaptado de Boyd *et al.*, 2000).

1.8.3. O plasmídeo TLC

Em 1998, Rubin e colaboradores identificaram um plasmídeo críptico de 4,7 Kb em todos os isolados de *V. cholerae* toxigênicos testados, que estava ausente nos isolados ambientais não toxigênicos. O plasmídeo, na forma integrada ao cromossomo, encontra-se adjacente ao profago CTX (figura 2), devido esta proximidade foi designado de TLC- *toxin-linked cryptic*. O pTLC, como foi denominado, quando está na forma extracromossômica circular, pode emergir do cromossoma a partir de uma recombinação homóloga entre as repetições diretas das cópias do elemento TLC. O

elemento TLC parece ter algum papel na biologia do CTX ϕ , possivelmente facilitando tanto sua aquisição quanto sua replicação, já que o TLC parece ser similar aos elementos RS1, que frequentemente flanqueiam o CTX ϕ no cromossoma de *V. cholerae* (Rubin *et al.*, 1998).

1.8.4. Toxinas RTX

As toxinas RTX são membros do sistema de secreção de exoproteína do tipo I que está presente em uma grande variedade de bactérias Gram-negativas. Uma das características desta família de toxinas é a variação que elas apresentam em relação à atividade citotóxica nos diferentes hospedeiros e tipos celulares. Podem ser classificadas em 3 grupos funcionais: as hemolisinas, leucotoxinas e citotoxinas. As hemolisinas são ativas em diferentes tipos celulares (eritrócitos, leucócitos, etc) de uma grande variedade de espécies. As leucotoxinas possuem o menor espectro tendo alvo apenas o grupo dos leucócitos. As citotoxinas possuem um espectro intermediário, atuando em grupos com especificidade mista (Welch, 2001).

Altas concentrações da toxina RTX induziriam uma rápida morte celular, com características de necrose, entretanto, baixas concentrações desta toxina desencadeiam alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares associadas à apoptose (Lally *et al.*, 1999).

A toxina RTX necessita de uma modificação pós-traducional para se tornar biologicamente ativa. Essa ativação é feita pelo produto do gene *rtxC* e de uma proteína carreadora de acil. A toxina produzida na ausência da RtxC é biologicamente inativa (Issartel *et al.*, 1991; Stanley *et al.*, 1994). 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, que são necessários para a funcionalidade da toxina RTX, estão agrupados em um operon em que a ordem dos genes se apresenta da seguinte maneira: *rtxC*, *rtxA* (gene que codifica a toxina propriamente dita), *rtxB* e *rtxD*. Em *E. coli*, um gene adicional, *tolC*, é necessário para a secreção da toxina (Lin *et al.*, 1999).

O operon da RTX em *V. cholerae* parece ser único, pois há uma inversão nos genes *rtxC* e *rtxA*, resultando em uma transcrição divergente dos genes *rtxB* e *rtxD* e alterando também a ordem do operon (*rtxACBD*), como demonstrado na Figura 3. O gene *tolC* também pode ser identificado, porém sem nenhuma ligação com o *cluster* da RTX. No biotipo clássico, houve uma deleção que removeu o terminal 5' do gene *rtxA*, todo o gene *rtxC* e uma parte do terminal 5' do gene *rtxB*. A deleção é de 7.869 pb (Lin *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 2001). O *cluster* RTX é intacto nas linhagens de *V. cholerae* O139 e em isolados ambientais, sugerindo então que a presença do *cluster* RTX precede a aquisição do elemento vizinho CTX (Lin *et al.*, 1999). Uma análise da composição trinucleotídica sugere que a região da RTX foi adquirida horizontalmente junto com mais dois genes que se encontram a jusante ao *cluster* da RTX que codificam para um sensor histidina quinase e um regulador, podendo estes estarem envolvidos na expressão da unidade transcricional da RTX (Heidelberg *et al.*, 2000).

A RTX de *V. cholerae* é diferente em sua estrutura, das demais toxinas RTX conhecidas, não estando ainda completamente definida a sua forma de ação (Lin *et al.*, 1999). O efeito citológico que a RtxA de *V. cholerae* induz em culturas de células é o arredondamento celular, fenótipo que é mantido mesmo nos mutantes em CTX (Fullner & Mekalanos, 2000). A formação de poros e necrose estaria excluída da atividade da toxina RTX dessa espécie bacteriana.

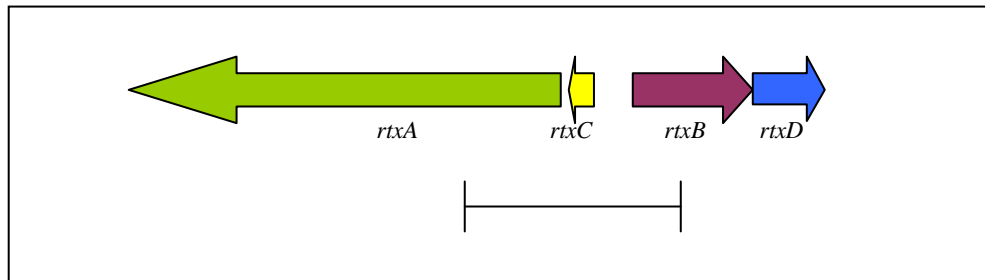


Figura 3: Representação esquemática da organização genética do *cluster* da toxina RTX em *V. cholerae*. As fases abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem à direção de transcrição. A barra representa a deleção encontrada no biotipo clássico (adaptado de Chow *et al.*, 2001).

1.8.5. Hemolisina/citolisina (*hlyA*), fator quimiotático (*hlyB*), Fosfolipase (*lec*), lipases (*hlyC* ou *lipA* e *lipB*) e metaloprotease (*prtV*)

Acoplado ao locus *hly* de *V. cholerae* estão vários determinantes associados a virulência, incluindo uma fosfolipase (*lec*), uma hemolisina (*hlyA*), e um transdutor quimiotático (*hlyB*). Análise da sequência da região a jusante revelou três ORFs que correspondem aos genes *lipA*, *lipB* e *prtV* cujas localizações encontram-se apresentadas na Figura 4 (Ogierman *et al.*, 1997). Essa mesma organização foi demonstrada em outras espécies do gênero *Vibrio*, como por exemplo, em *Vibrio mimicus* (Kang *et al.*, 1998). A presença do locus lecitinase-hemolisina-lipase, entre as linhagens toxigênicas de *V. cholerae* dos diversos sorogrupos e biotipos, sugere que a lecitinase possa ser um componente de um grupo de enzimas cuja função é causar dano à membrana celular dos enterócitos (Fiore *et al.*, 1997).

Em *V. cholerae* foi identificado o gene *lec* que codifica para uma fosfolipase denominada de lecitinase. A análise de sua sequência mostrou uma fase aberta de leitura de 1254 pb codificando uma proteína de 418 aminoácidos (Fiore *et al.*, 1997). Essa

fosfolipase parece causar citotoxicidade, porém não provoca acúmulo de fluido nas alças intestinais de coelhos (Fiore *et al.*, 1997).

A região *hly* foi clonada em 1984 (Goldberg & Murphy, 1984; Manning *et al.*, 1984) e apresentada a seguinte composição de genes, *hly A*, *hly B*, e *hly C*, que na ocasião supos-se estarem envolvidos na produção de uma hemolisina/citolisina (Manning *et al.*, 1984).

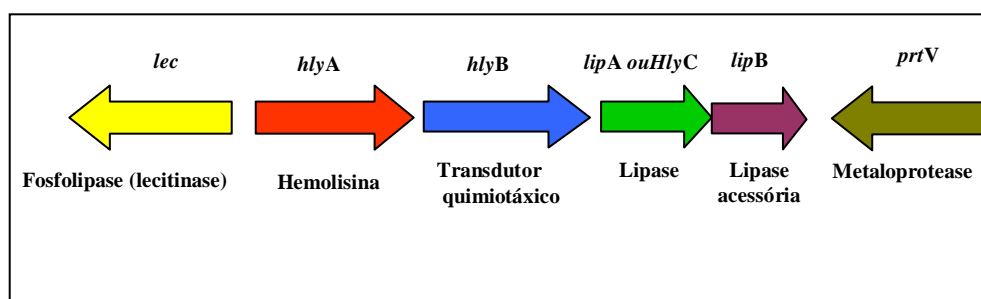


Figura 4: Representação esquemática da organização genética do locus *hly* (~ 8,2 kb) em *V. cholerae*. As fases abertas de leitura são mostradas como setas que correspondem a direção de transcrição (adaptado de Ogierman *et al.*, 1997).

Cepas de *V. cholerae* El Tor produzem e secretam uma toxina citolítica (*El Tor citolysin/hemolysin*) em meio de cultura. O gene *hlyA*, que representa o gene estrutural da citolisina, ao ser deletado (Kaper *et al.*, 1989) do DNA cromossomal de uma cepa de *V. cholerae* El Tor, resultou na perda da sua atividade hemolítica. Por este motivo, passou-se a utilizar, entre outros, este marcador para diferenciar o *V. cholerae* biotipo clássico do El Tor.

A citolisina/hemolisina produzida pelas cepas de *V. cholerae* NAG é imunologicamente e estruturalmente indistinguível da citolisina/hemolisina do El Tor

(Yamamoto *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1986) e tem atividade enterotóxica (Ichinose *et al.*, 1987), sugerindo que esta pode contribuir para patogênese da gastroenterite causada por algumas cepas de *V. cholerae* que não possuem o gene que codifica para a toxina colérica (Ichinose *et al.*, 1987).

Esta citolisina/hemolisina (HlyA) é a toxina mais amplamente distribuída entre os vibrios patogênicos (Shinoda, 1999) e parece estar ausente ou com uma baixa expressão nas supostas linhagens ambientais avirulentas (Kaper *et al.*, 1995; Guhathakurta *et al.*, 1999). Apresenta efeito hemolítico em uma grande variedade de eritrócitos e efeitos citotóxicos em culturas de células de mamíferos (Honda & Finkelstein, 1979; McCardell *et al.*, 1985). A citolisina/hemolisina provoca acúmulo de fluido em alças ileais de coelho e em modelos de camundongo recém-nascido, porém, o efeito produzido em resposta à hemolisina é distinto daquele causado pela CTX, já que o fluido produzido vem acompanhado de sangue e muco (Ichinose *et al.*, 1987; Zitzer *et al.* 1993).

Estudos realizados por Coelho *et al.* (2000) e por Figueroa-Arredondo *et al.* (2001) mostraram também que a indução da formação de vacúolos em culturas de células HeLa e Vero por filtrados de *V. cholerae* está associada a esta citolisina/hemolisina. Esse efeito vacuolítico é parecido com o induzido pela citotoxina VacA de *Helicobacter pylori* (Montecucco & Rappuoli, 2001).

O papel da hemolisina como fator diarreiogênico ainda é debatido (Singh *et al.*, 1996). Um estudo com a vacina feita com mutantes de *V. cholerae* indicou que a hemolisina não teria papel na patogênese desta bactéria (Levine *et al.*, 1988), porém a deleção do gene *hlyU*, um regulador da expressão do gene da HlyA, levou a uma drástica diminuição da virulência em modelo animal (Williams *et al.*, 1993). Além

disso, existem várias evidências para a atividade tanto citotóxica (Honda & Finkelstein, 1979; McCardell *et al.*, 1985; Zitzer *et al.*, 1997) quanto enterotóxica (McCardell *et al.*, 1985; Ichinose *et al.*, 1987) desta molécula.

HlyB, um transdutor quimiotático também codificado neste locus, pode monitorar o estatus de nutrientes do ambiente em que o microrganismo se encontra e sinalizar para que a bactéria movimente-se de acordo (Ogierman *et al.*, 1997).

O operon da lipase de *V. cholerae* consiste dos genes *lipA* e *lipB* (Ogierman *et al.*, 1997). O gene *lipA* foi anteriormente descrito como *hlyC* que codificava para uma proteína de 18.3kDa (Alm & Manning, 1990; Manning 1994; Casanova & Peterson, 1995), entretanto, estudos posteriores mostraram tratar-se de uma proteína com 33kDa na sua forma não processada e 30kDa na sua forma processada (Ogierman *et al.*, 1997).

O papel da lipase (*lipA* ou *hlyC*) na virulência e/ou patogenicidade do *V. cholerae* ainda permanece obscuro. A lipase poderia atuar na destruição de células do sistema imune do hospedeiro hidrolisando a membrana lipídica e então liberando ácidos graxos, que seriam metabolizados pelo *V. cholerae*. Foi proposto também que a lipase ajudaria na quebra da camada de muco que protege o epitélio intestinal, aumentando então, a capacidade de colonização (Fiore *et al.*, 1997). Em relação a lipase acessória, codificada pelo gene *lipB*, tem sido demonstrada sua essencial participação na efetivação da atividade da proteína LipA (Ogierman *et al.*, 1997).

O gene *prtV* parece codificar uma metaloprotease baseado na homologia com uma metaloprotease de *B.thuringiensis* (Ogierman *et al.*, 1997). De um modo geral, toda esta região (Figura 4) pode ser parte de uma ilha de patogenicidade que é capaz de

causar dano as células do hospedeiro e/ou alterar as condições intestinais para favorecer o crescimento bacteriano (Ogierman *et al.*, 1997).

1.8.6. Outras toxinas

Embora a maioria das linhagens de *V. cholerae* NAG não tenha potencial epidêmico, algumas são identificadas como agentes causadores de casos clínicos esporádicos e surtos localizados, relacionados a uma gastroenterite similar à cólera em vários países, incluindo Índia e Bangladesh, Guiana, Brasil, Peru, Argentina, Japão e Estados Unidos (Levine *et al.*, 1982; Morris & Black, 1985; Honda *et al.*, 1988; Rodrigue *et al.*, 1994; Dalsgaard *et al.*, 1995b; Coelho *et al.*, 1995b; Saha *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998; Pal *et al.*, 1999; Pichel *et al.*, 2003). Além das infecções gastrointestinais, essas linhagens estão associadas a várias infecções no homem como infecções em feridas (Hughes *et al.*, 1978), celulite (Gelbart & Prabhudesai, 1986), e septicemia (Safrin *et al.*, 1988). Alguns isolados de *V. cholerae* NAG produzem toxinas CTX-like; apesar da maioria não produzi-las (Zinnaka & Carpenter, 1972; Spira & Fedorka-Cray, 1983; Yamamoto *et al.*, 1983), foi possível a detecção de atividades hemolítica e citotóxica *in vitro* na maioria das linhagens enteropatogênicas CTX negativas estudadas até agora (Moyenuddin *et al.*, 1992; Dalsgaard *et al.*, 1995b; Saha *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998; Coelho *et al.*, 2000; Pichel *et al.*, 2003). A diarreia secretória, similar à cólera, é determinada por mecanismo distinto daquele relacionado à patogênese da cólera propriamente dita e pode envolver a participação de um ou mais fatores citotóxicos (Yamamoto *et al.*, 1986; Gyobu *et al.*, 1991a; 1991b; Dalsgaard *et al.*, 1995b; Mitra *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1998; Lally *et al.*, 1999; Coelho *et al.*, 2000; Pichel *et al.*, 2003). Alguns fatores de virulência foram propostos para tentar

explicar as manifestações clínicas produzidas por essas linhagens enterotóxicas não toxigênicas. A enterotoxina termo-estável ST é considerada um potencial fator de virulência detectado quase que exclusivamente no grupo não-O1 (Ogawa *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1990; Hoge *et al.*, 1990; Pal *et al.*, 1992; Vicente *et al.*, 1997). Vários outros fatores de virulência também já foram descritos em isolados de *V. cholerae* não toxigênicos, como hemolisinas (Yamamoto *et al.*, 1986), TDH (hemolisina direta termoestável) similar a do *Vibrio parahaemolyticus* (Honda *et al.*, 1985), toxina Shiga-like (SLT) (O'Brien *et al.*, 1984), enterotoxina termo-lábil (Yamamoto *et al.*, 1983) e hemaglutininas (Hanne & Finkelstein, 1982; Datta-Roy *et al.*, 1986). A evidência da presença de outro fator citotóxico ainda desconhecido, capaz de iniciar uma resposta secretória, também pode ser percebido em estudos com voluntários que foram vacinados com vacinas orais recombinantes onde foi observada uma diarreia residual (Mitra *et al.*, 1998).

1.9. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES

A transferência horizontal de genes entre procariotos é um fenômeno permanente que tem um importante significado na evolução bacteriana (de la Cruz & Davies, 2000; Ochman *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2002).

Estudos demonstraram que a transferência horizontal de genes contribui para algumas importantes características de vibrios, como patogenicidade e exploração de nichos ecológicos (Boyd *et al.*, 2000; Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Rowe-Magnus *et al.*, 2002). O *V. cholerae* compreende uma variedade de linhagens e biotipos que recebem e transferem genes de toxinas, fatores de colonização, resistência a antibióticos, polissacarídeos capsular e novos antígenos de superfície (lipopolissacarídeo

0139 e o antígeno capsular O) (Waldor *et al.*, 1994; Bik *et al.*, 1995; Brown & Taylor, 1995; Waldor & Mekalanos, 1996; Karaolis *et al.*, 1999; Hochhut & Waldor, 1999; Yildiz & Schoolnik, 1999). Esses eventos mediaram a transformação de cepas avirulentas para aquelas cepas que foram capazes de causar surtos de diarreia (Boyd *et al.*, 2000).

1.10. INTEGRONS EM *Vibrio cholerae*

O sequenciamento do genoma completo de um isolado de *V.cholerae* do biotipo El Tor (Heidelberg *et al.*, 2000) mostrou a presença de um *cluster* gênico (Hall *et al.*, 1993) contendo estruturas características de recombinação e aquisição de genes, da mesma forma que, a presença de um superintegron (Recchia *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 2000) está também demonstrada nesta bactéria. Estudos recentes tem sugerido o mapeamento de integrons por PCR e o sequenciamento do DNA de seu conteúdo genético como uma importante ferramenta epidemiológica para estudar a evolução e a disseminação de resistência aos antimicrobianos em *V.cholerae* (Dalsgaard *et al.*, 2000b).

Os integrons são elementos genéticos versáteis caracterizados por sua capacidade de inserir, arranjar e expressar genes através de um sistema de recombinação sítio-específico. Esses elementos foram identificados pela primeira vez por Stokes & Hall (1989). Estas estruturas não são elementos móveis, mas, quando associados a transposons e/ou plasmídeos conjugativos, podem atuar como veículos da transmissão intra- e inter-específica de material genético. Desta forma, podem ser observados em vários contextos genéticos e estar distribuídos em uma grande variedade de espécies Gram-negativas e Gram-positivas (Rowe-Magnus & Mazel, 2001).

Um integron é basicamente constituído por três elementos, o gene que codifica uma integrase (*intI*), um sítio de recombinação (*attI*) e uma região promotora. Podem ser divididos em dois grandes grupos: os integrons de resistência (RI, *resistance integrons*) e os superintegrons (SI). Os RI, que podem estar localizados no cromossomo, nos plasmídios ou nos transposons, carregam principalmente os cassetes gênicos que codificam para resistência a antibióticos e desinfetantes (Fluit & Schmitz, 2004). O acúmulo de loci exógeno pelo RI cria o integron de multi-resistência (MRI) (Rowe-Magnus & Mazel, 1999). O SI é um extenso integron que está localizado no cromossoma bacteriano e que contém cassetes gênicos que apresentam uma variedade de funções (Fluit & Schmitz, 2004).

Cassetes gênicos são elementos móveis que consistem de uma sequência codificadora (um gene funcional ou ORF) e uma sequência de recombinação (sítio *attC*). São unidades que podem ser inseridas nos integrons independentemente, por ação das integrases presentes nos mesmos. O arranjo de cassetes gênicos na região variável dos integrons pode ser alterado pela excisão ou re-inserção de cassetes individuais ou ainda pela introdução precisa de novos cassetes gênicos (Collis *et al.*, 1993).

Existem várias classes de integrons, baseados no tipo de gene da integrase (*intI*), que estas estruturas abrigam (Recchia *et al.*, 1994; Collis *et al.*, 2002a; Hansson *et al.*, 2002). Mais de 20 tipos de *intI* já foram identificadas (Collis *et al.*, 2002a). Dentre as inúmeras classes de integron já identificadas, os de classes 1, 2 e 3 são os mais frequentemente detectados e representam os chamados integrons de resistência (RI) ou de multiresistência (MRI) por carregarem genes de resistência a antibióticos (Rowe-Magnus & Mazel, 2001). Mais de 70 diferentes cassetes gênicos de resistência a

antibióticos já foram caracterizados nestas três classes de integrons (Mazel & Davies, 1999).

Os integrons de classe 1 (IntI1) são os mais prevalentes e estudados dentre as diferentes classes já descritas (Collis *et al.*, 2001; Collis *et al.*, 2002a). Esta classe de integron é frequentemente encontrada em plasmídios conjugativos ou associada com a família de transposon Tn21, o que favorece a dispersão dos cassetes gênicos de resistência a antibióticos (Hall, 1997; Girlich *et al.*, 2001; Fluit & Schmitz, 2004) sendo os mais relatados e onipresentes em bactérias com resistência a antibióticos, sobretudo, isolados clínicos.

A estrutura básica de um integron classe 1 (Figura 5) compreende uma região 5' conservada (CS) que inclui o gene da integrase de classe 1 (*intI1*), cujo produto catalisa as reações de recombinação sítio-específico, um sítio de recombinação (*attI1*, *attC* e sítios secundários), que consiste na região variável do integron, onde cassetes são inseridos, uma região promotora (P_{ant} ou P_c), responsável pela expressão dos cassetes gênicos inseridos no integron e uma região 3' conservada, que usualmente abriga os genes *qacEΔ1* e *sulI* que conferem resistência aos compostos quaternários e sulfonamidas, respectivamente (Stokes & Hall, 1989; Recchia & Hall, 1995b; Hall & Collis, 1995; Mazel *et al.*, 1998; Rowe-Magnus *et al.*, 2002; Fluit & Schmitz, 2004).

Os cassetes gênicos, quando presentes, se encontram entre os segmentos 5'-CS e 3'-CS. Essa região de inserção de cassetes é denominada segmento variável do integron, devido ao fato de apresentar uma enorme variação quanto ao número e tipo de cassetes gênicos nela encontrados, predominantemente genes associados à resistência aos antimicrobianos. A maioria dos cassetes possui a região de início de tradução, que compreende o codon de iniciação, a sequência de Shine-Dalgarno e um espaçador

adequado (Fluit & Schmitz, 2004). Os cassetes gênicos também são caracterizados pela ausência de uma região promotora, embora essa estrutura já tenha sido identificada fazendo parte de um cassette gênico (Hall & Stokes, 1993). Dessa forma, essas unidades móveis, quando inseridas em um integron, são expressas pela ação do promotor P_{ant} ou PC, localizado no segmento 5'-CS desse elemento (Stokes & Hall, 1989).

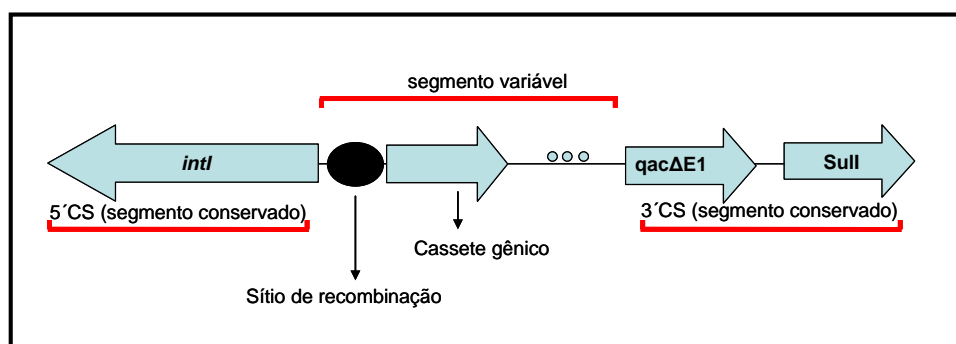


Figura 5: Representação esquemática de um integron de classe I com cassette gênico inserido no seu segmento variável. Adaptado de Mazel *et al.*, 1998.

Integrans de classe 1 tem sido caracterizados em isolados clínicos e ambientais de uma grande variedade de espécies bacterianas. Já foi identificado em *V. cholerae* clínico de diferentes áreas geográficas do mundo e sua distribuição e importância tem sido amplamente discutida (Dalsgaard *et al.*, 1999; Falbo *et al.*, 1999; Dalsgaard *et al.*, 2000a; 2000b; Dalsgaard *et al.*, 2001; Thungapathra *et al.*, 2002; Ehara *et al.*, 2004; Iwanaga *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 2008).

Os integrans de classe 2 ocorrem em associação com transposons da família do Tn7 e usualmente carregam três cassettes gênicos de resistência: Trimetropina (*dfrA1*), estreptotricina (*sat1*) e estreptomicina/espectinomicina (*aadA1*) (Hansson *et al.*,

2002; Opintan *et al.*, 2008). O transposon Tn7 é comumente encontrado em organismos entéricos onde se encontra integrado a plasmídios conjugativos ou ao genoma bacteriano em um sítio de ligação específico entre os genes *pstS* and *glmS* do *V. cholerae* (Opintan *et al.*, 2008). Elementos Tn7-like tem sido encontrados em *V. cholerae* NAG (não O1/O139) e outros vibrios onde se mostraram integrados ao cromossomo bacteriano (Ahmed *et al.*, 2006).

O gene da integrase de classe 2 (*intI2*) apresenta uma identidade de 40% em relação ao gene da integrase de classe 1 (Recchia & Hall, 1995b). Esta classe de integron tem distribuição muito mais restrita, quando comparada ao de classe 1, e já foi descrita em isolados dos gêneros *Acinetobacter* sp., *Shigella* sp., *Salmonella* spp., *Serratia marcescens* e raramente em *V. cholerae* O1 e NAG (Radstrom *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 1998; McIver *et al.*, 2002; Orman *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2006; Crowley *et al.*, 2008; Opintan *et al.*, 2008).

Os integrons de classe 3 foram descritos em *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Pseudomonas putida*, e *Klebsiella pneumoniae* (Arakawa *et al.*, 1995; Senda *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2003; Fluit & Schmitz, 2004). A integrase de integrons de classe 3 (*IntI3*) apresenta identidade de 61% com a enzima de classe 1 (Arakawa *et al.*, 1995; Collis *et al.*, 2002b).

1.11. GENOTIPAGEM DE *Vibrio cholerae*

As informações geradas por meio da aplicação de métodos para genotipagem molecular de microrganismos podem auxiliar em diversos campos da pesquisa, entre eles, a Epidemiologia, Taxonomia, Filogenia, diversidade e estudos de

mecanismos evolucionários. Na área da Epidemiologia molecular, por exemplo, a genotipagem permite a distinção entre isolados de uma mesma espécie para monitorar epidemias, rotas de contaminação ou ainda, identificar as linhagens com potencial epidêmico, diferenciando-as das ambientais.

Diversos métodos moleculares tem sido usados para genotipagem de *V. cholerae*, tais como, detecção de genes de virulência, ribotipagem, e padrão de macro-fragmentos resolvidos em eletroforese em gel de campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis*-PFGE), eletroforese de enzimas multilocus-MLEE, polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados e detectados por fluorescência (FAFLP), polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorphism*-RFLP), *enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence*-ERIC-PCR, amplificação randômica de DNA polimorfo (*random amplification of polymorphic DNA*-RAPD), tipagem de sequências multilocus (*multilocus sequence typing*-MLST) e *simple sequence repeats* (SSR) (Cameron *et al.*, 1994; Arakawa *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000a; 2000b; Rivera *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2002; Zo *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003; Kotetishvili *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2004; Danin-Poleg *et al.*, 2007).

O PFGE tem oferecido excelentes resultados no que diz respeito à análise da relação genética entre isolados clínicos e ambientais de *V. cholerae* (Islam *et al.*, 2004). É uma técnica que pode também ser utilizada para monitorar a disseminação do patógeno, acompanhar a emergência de novos clones e para investigações epidemiológicas devido ao seu alto poder discriminatório (Cameron *et al.*, 1994; Mahalingam *et al.*, 1994; Popovic *et al.*, 1995; Dalsgaard *et al.*, 1997; Arakawa *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Tapchaisri *et al.*, 2008; Bakhshi *et al.*,

2008; Safa *et al.*, 2009). O PFGE separa grandes fragmentos de DNA gerados por meio da digestão do DNA genômico total da bactéria com endonucleases de restrição de cortes raros.

A comparação do PFGE em relação ao MLEE ou ribotipagem, como método para genotipagem de *V. cholerae*, tem demonstrado maior sensibilidade na distinção entre isolados não relacionados (Cameron *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2009). O mesmo foi observado também em outros estudos que utilizaram para análise a RAPD, a ribotipagem e o PFGE (Chen *et al.*, 2004). A ribotipagem, apesar de ter sido bastante aplicada à análise de *V. cholerae*, apresenta grande limitação para esta espécie, já que o sequenciamento do genoma completo mostrou que todos os oito operons ribossomais encontram-se localizados no cromossoma 1 (Heidelberg *et al.*, 2000). Portanto, ao utilizar este marcador, não se estaria levando em consideração o cromossoma 2 (~ 1Mb) o que subestimaria a diversidade.

Em estudo recente, a maioria dos isolados patogênicos de *V. cholerae* O1 e O139 ctxA (+) apresentou um único perfil por meio do MLST. Já os resultados da genotipagem por SSR (*simple sequence repeats*) e PFGE, mostraram maior diversidade entre os isolados, com poder de discriminação semelhante, 27 e 28 perfis moleculares distintos, respectivamente, entre as 32 amostras testadas (Danin-Poleg *et al.*, 2007).

Safa *et al.* (2005), utilizaram o PFGE para verificar a relação genética de uma nova variante patogênica de *V. cholerae* O1 (variante Matlab tipos I, II e III) com isolados dos biotipos clássico e El Tor. A análise indicou que os diferentes tipos da variante Matlab não são idênticos ao clássico ou El Tor e sim parecem ter derivado deles, visto que, a variante I agrupou com o biotipo clássico e os tipos II e III com a do biotipo El Tor.

Utilizando as técnicas moleculares de genotipagem, *restriction fragment length polymorphisms*-RFLP dos genes ribossomais (rRNA) e *ctxA*, sequenciamento do DNA da subunidade B da toxina colérica (gene *ctxB*), e eletroforese de enzimas multilocus (MLEE) para caracterizar 197 isolados de *V. cholerae* O1 El Tor toxigênicos, foi sugerida a existência de pelo menos quatro distintos clones no mundo: o da sétima pandemia detectado no Hemisfério Oriental (incluindo o “Bengal” O139), Costa do Golfo (USA), Austrália e América Latina. Foi discutido também, que o clone latino-americano provavelmente representa uma extensão daquele relacionado à sétima pandemia no Hemisfério Oriental, enquanto que o da Costa do Golfo parece ter evoluído separadamente (Wachsmuth *et al.*, 1993).

Jiang *et al.* (2000a), analisando isolados clínicos e ambientais de *V. cholerae* da Ásia, África e América Latina obtidos durante um período de 20 anos (antes, durante e depois de epidemias de cólera), concluíram que um único clone ou clones da Ásia com a mesma origem foram responsáveis pela dispersão da sétima pandemia de cólera nestes três continentes. O achado de isolados ambientais com o mesmo perfil encontrado nas clínicas sugeriu que o ambiente aquático serve como reservatório para transmissão e dispersão da cólera.

A exemplo do que possa ter ocorrido com o clone epidêmico da Costa do Golfo que parece ter evoluído separadamente (Wachsmuth *et al.*, 1993), muitos casos e surtos de cólera pelo mundo, incluindo América Latina, parecem ser causados por linhagens patogênicas com características distintas das epidêmicas (Coelho *et al.*, 1995a; b; Pichel *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2002; Safa *et al.*, 2005; Lizárraga-Partida & Quilici, 2009). No estudo realizado por Jiang *et al.* (2000a), a maioria das evidências foi

relacionada às amostras do México, entretanto, amostras do Brasil, Zaire, Kenia e Bangladesh também apresentaram variações importantes do ponto de vista genético.

Estudo com isolados de diversas partes do mundo, e utilizando MLEE mostraram que a cepa responsável pela epidemia sul-americana difere do clone da sétima pandemia no locus LAP, desse modo, a sétima pandemia do Velho Mundo é causada pelo *V. cholerae* zimovar 14A (alelo 1) e a pandemia americana pelo *V. cholerae* zimovar 14B (alelo 3) (Freitas *et al.*, 2002).

Um estudo da diversidade genética do *V. cholerae* O1 e NAG com amostras clínicas do Brasil mostrou que esta espécie é bastante diversificada geneticamente, com ausência de agrupamentos genéticos relacionados a regiões ou períodos de isolamento, apesar do achado de cepas ambientais e clínicas no mesmo grupo genômico. Caracterizou-se também a persistência de isolados geneticamente relacionadas durante vários anos e distintas regiões geográficas o que evidenciou a capacidade de adaptabilidade aos ambientes (Thompson *et al.*, 2003).

Apesar do *V. cholerae* ser natural do ambiente aquático os estudos acerca da estrutura populacional ou diversidade desta espécie são, na sua maioria, voltados para isolados clínicos toxigênicos dos sorogrupos O1 e O139 provenientes de áreas endêmicas ou não para cólera. Dados divulgados ao longo dos últimos anos tem mostrado a importância de se estudar tanto as linhagens O1 não toxigências, quanto os outros sorogrupos desta espécie, além do O1, visto que a transferência horizontal de genes pode levar a transformação de linhagens ambientais em potenciais patógenos.

Outro aspecto que deve ser considerado é o fato de que raramente se isola os sorogrupos O1 e O139 toxigêncios do ambiente aquático durante períodos interepidêmicos ou em áreas não endêmicas para cólera. No Brasil, onde a sétima e

última epidemia se manteve mais intempestivamente nas regiões Norte e Nordeste entre os anos de 1991 e 2000, este fato tem sido relatado, entretanto, a relação genética destes isolados com àqueles oriundos de casos clínicos ou cepas referências de epidemias tem sido raramente demonstrada.

Já em áreas endêmicas para cólera, como Bangladesh, por exemplo, a relação genética entre isolados ambientais e clínicos de *V. cholerae* O1 toxigênicos foi bem demonstrada utilizando PFGE como método de genotipagem. Perfis diversificados foram encontrados entre os isolados ambientais, sendo que um deles prevaleceu também entre os clínicos, caracterizando vantagem seletiva de um clone sobre os outros para causar a doença em quatro distintas áreas geográficas deste País, em um período de tempo determinado (Islam *et al.*, 2004). É fato que os outros clones podem também causar doença, entretanto, o prevalente no ambiente e em humanos parece apresentar melhores condições de adaptabilidade para manter-se no ambiente e atingir novos hospedeiros (Islam *et al.*, 2004).

O achado de isolados ambientais de *V. cholerae* toxigênico com o mesmo perfil de PFGE de isolados clínicos foi observado também entre amostras da Malásia (alimentos marinhos) e Tailândia (pacientes) do mesmo ano e, entre isolados da Malásia (alimentos e água do mar) e Índia (pacientes) de anos diferentes, sugerindo a persistência de clones toxigênicos no ambiente com potencial de causar a cólera (Islam *et al.*, 2004).

Estudos de genética populacional e epidemiologia molecular do *V. cholerae* contribuem para o entendimento da dispersão desta bactéria/doença nos diferentes hemisférios, entretanto, somente um limitado número de isolados ambientais do Brasil, até o presente, foram analisados.

1.12. OBJETIVO

1.12.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a diversidade genética de isolados ambientais de *V. cholerae* O1 e NAG da Amazônia brasileira obtidos durante um período de 30 anos.

1.12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar as amostras do estudo;
- Verificar a presença dos genes (*ctxA*, *orfU*, *tcpB/H*, *tcl*, *zot*, *ace*, *toxR*, *rtxA*, *rtxC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyC* e *sto/stn*) associados à virulência do *V.cholerae* nas amostras do estudo;
- Detectar a presença de integrons de classe 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) e 3 (*intI3*) nos isolados do estudo;
- Caracterizar geneticamente os integrons detectados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE *V.cholerae* O1 E NAG PARA O ESTUDO MOLECULAR

A Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas-IEC/Secretaria de Vigilância em Saúde-SVS/Ministério da Saúde-MS é referência regional para cólera e outras enteroinfecções bacterianas e vem realizando desde 1975 um trabalho de isolamento e identificação de *V.cholerae*. A partir de 1992, a Seção de Meio Ambiente/IEC encarregou-se do monitoramento ambiental desta doença, de modo que, atualmente, o IEC possui uma vasta coleção de isolados ambientais e clínicos de *V.cholerae* compreendendo os períodos pré-epidêmico, epidêmico e pós-epidemia de cólera na região amazônica.

Obedecendo a uma ordem cronológica e espacial, foi selecionado para este estudo 148 isolados bacterianos (ANEXO 1) de ambientes aquáticos da Amazônia brasileira (Amazonas, Pará, Amapá e Acre), sendo 127 isolados de *V.cholerae* NAG obtidos entre os anos de 1977 e 2007 (Quadro 3), 20 amostras epidêmicas de *V.cholerae* O1 (1991-1994), um isolado pós-epidêmico de *V.cholerae* O1 do ano de 2007 (Quadro 4).

Foram utilizados também neste estudo isolados clínicos da Índia e do Brasil (Amazonas e Pará), além das cepas referência de *V.cholerae* O1 biotipo clássico (200) e biotipo El Tor (N16961), todos fornecidos pelo Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz (Quadro 5).

Quadro 3: Número, procedência e data de isolamento dos 127 isolados de *V.cholerae* não-O1 e não O139 (NAG) utilizados neste estudo.

TOTAL	MUNICÍPIO	ESTADO	ANO	Nº		
101	BELÉM	PARÁ	1977	22		
			1978	9		
			1979	1		
			1980	11		
			1981	5		
			1993	1		
			1994	3		
			1995	1		
			1996	3		
			1998	3		
			1999	6		
			2000	3		
			2001	5		
			2002	3		
			2003	3		
			2004	3		
			2005	4		
			2006	4		
			MOSQUEIRO		1997	2
			ICOARACI		1998	1
	BARCARENA		1992	4		
	MARUDÁ		1995	2		
			1997	2		
21	MACAPÁ	AMAPÁ	1991	7		
			1992	6		
	1994		6			
	1994		1			
	1994		1			
5	RIO BRANCO	ACRE	1993	5		

Quadro 4: Número, procedência e data de isolamento dos 21 isolados de *V.cholerae* sorogrupo O1 utilizados neste estudo.

TOTAL	MUNICÍPIO	ESTADO	ANO	Nº
10	BELÉM	PARÁ	1993	8
			1994	
			1994	
			1994	
			1994	
			1991	
			1992	
			2007	
	BARCARENA		1991	1
MOSQUEIRO		1992	1	
4	MACAPÁ	AMAPÁ	1991	3
			1991	
			1991	
	OIAPOQUE		1994	1
5	TABATINGA	AMAZONAS	1992	5
			1992	
			1992	
			1992	
			1992	
2	SANTA ROSA	ACRE	1993	1
	RIO BRANCO		1993	1

Quadro 5: Descrição das amostras de *V.cholerae* O1 utilizadas como referência neste estudo.

VARIANTES DE <i>Vibrio cholerae</i>	PROCEDÊNCIA	ANO	CÓDIGO
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biotipo clássico	ÍNDIA		200/GP48
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biotipo EI Tor	Bangladesh	1971	N16961
	Índia	1973	121/4507
	Amazonas-BR	1991	512
	Amazonas-BR	1992	513
	Belém-PA-BR	1992	514
	Bagre-PA-BR	1994	816
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Variante Amazônia	Amazonas-BR	1992	L34

2.2. REATIVAÇÃO DAS BACTERIAS ISOLADAS NO PERÍODO DE 1977 A 2007

O procedimento para reativação dos *V. cholerae* seguiu os critérios de cultivo e identificação como detalhados a seguir. Inicialmente cada amostra foi repicada para um caldo de enriquecimento (água peptonada alcalina-APA pH 8,5) e submetida a uma temperatura de 35-37°C/18-24h de acordo com Choopun *et al.* (2002). Cada cultivo foi, em seguida, plaqueado em ágar TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*) para verificação das características das colônias (morfologia e fermentação da sacarose). De cada placa, foram selecionadas pelo menos duas colônias características que foram submetidas as provas de triagem: fermentação de açúcares (*Kligler Iron Agar*), utilização de aminoácidos (LIA-lysine iron Agar), teste da oxidase, prova do fio (*String* teste) e sensibilidade ao agente vibriostático (O129) 10 e 150µg. Em seguida foram submetidas a identificação bioquímica: Glicose, Lactose, Sacarose, Indol, VM (vermelho de metila), VP (Voges-Proskauer), Citrato, Fenil Alanina, Motilidade, Lisina, Arginina, Motilidade, Controle, Manose, Arabinose, Inositol e Manitol (Baumann *et al.*, 1984). Após a caracterização bioquímica, realizou-se a sorologia utilizando antisoros para o antígeno O (Baumann *et al.*, 1984).

2.3. MANUTENÇÃO E CULTIVO DOS *Vibrio cholerae*

Os estoques foram feitos a partir de colônias puras crescidas em placas de TCBS à 37°C por 12-18 horas. Essas colônias foram repicadas em 3 mL de meio líquido (LB-Luria Broth) e crescidas à 37°C com agitação constante de 200 oscilações por minuto por mais 12-18 horas. Essas culturas foram então repicadas para tubos contendo ágar nutriente inclinado e incubadas à 37°C por 24 horas. Após observação

de crescimento, eram então cobertas com óleo mineral previamente esterilizado e mantidos à temperatura ambiente por até 6 meses. Para obtenção de massa bacteriana para os experimentos, foram feitos repiques a partir do estoque para tubos contendo de 3-5 mL de caldo LB e incubados à 37°C por 12-18 horas com agitação.

2.4. LISE DO *Vibrio cholerae* POR CHOQUE TÉRMICO

As amostras foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo LB que foram incubados a 37°C por 12-18 horas com agitação. Um mL de cultura foi transferido para um tubo tipo Eppendorf e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em 500 µL de água milli-Q esterilizada. Esta suspensão foi submetida a banho-maria fervente (100°C) por 10 minutos e, imediatamente após este período, foi congelada à -20°C. Este material foi posteriormente descongelado a temperatura ambiente e centrifugado rapidamente (14000 rpm por 15 segundos) para que o sobrenadante pudesse ser transferido para outro tubo e armazenado a -20°C. O lisado foi utilizado nas reações de PCR (Baloda *et al.*, 1995).

2.5. GENOTIPAGEM POR PERFIL DE MACRORESTRIÇÃO DO DOS CROMOSSOMOS DO *Vibrio cholerae*

Para caracterizar a diversidade entre isolados de *V. cholerae* O1 e NAG, foram gerados perfis moleculares por meio da digestão do DNA genômico total das amostras seguido da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). O DNA genômico foi preparado como descrito previamente pela técnica de lise *in situ* em blocos de

agarose (Cameron *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1997). Em resumo, uma alíquota de 500 μL do crescimento bacteriano em fase exponencial foi centrifugada e as células obtidas ressuspensas em tampão PIV (NaCl 1M; TRIS-HCl 10mM pH 7,6). Foi adicionada à 500 μL da suspensão de células, 500 μL de agarose *low melting point* (BIO-RAD, HERCULES, CA, USA) na concentração de 2% em tampão PIV, a uma temperatura de 52° C. A mistura foi homogeneizada, distribuída em moldes e mantida a 4° C por 10 minutos. Os blocos foram então transferidos para tubos contendo 4 mL de solução de lise (NaCl 1M; TRIS-HCl 6mM pH 7,6; EDTA 100mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5%; desoxicolato 0,2%; sarcosina 0,5%) e incubados a 37°C. Em seguida, o tampão de lise foi substituído pelo tampão ESP (EDTA 0,5M pH 8,0; sarcosina 1%) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K e os blocos incubados a 50°C/18h. Os blocos foram lavados 4 vezes com tampão TE (TRIS-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 0.1mM pH 8,0) a 37° C e incubados com enzima de restrição (*Not I*/ 30U) durante 24 h de acordo com as recomendações do fabricante (INVITROGEN). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose (BIO-RAD, HERCULES, CA, USA) a 1,2% preparado em tampão TBE (TRIS 44,5mM; Ác. bórico 44,5mM; EDTA 1mM pH final 8) por meio de eletroforese de campo pulsado, usando o sistema *Contour-Clamped Homogeneous Electric Field DR III apparatus* (CHEF-DR III- Bio-rad). O tampão utilizado foi o TBE, 0,5X, pH final 8. As condições de corrida foram: pulso inicial de 5 s, pulso final 30 s, 6 V/cm, ângulo de 120°, recirculação a 13°C por 24 h. O marcador de peso molecular utilizado foi o Lambda Ladder PFG marker/ BIOLABS New England Biolabs, Beverly, MA, USA.

Após a eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (1 mg ml⁻¹ SIGMA) e descorados com água livre de nuclease. O registro das imagens foi realizado

sob luz ultravioleta e utilizando o sistema de fotodocumentação da Vilber Lourmat. A reprodutibilidade da técnica foi validada durante a padronização do PFGE, cuja etapa foi realizada com a cepa referência N16961 de *V.cholerae* O1 El Tor.

As imagens dos perfis eletroforéticos gerados por PFGE e digitalizadas em formato TIFF, foram analisadas utilizando o software BioNumerics Version 5.1 (APPLIED MATHS, Inc., Austin, TX) seguindo as instruções do fabricante. As imagens foram normalizadas por alinhamento com um padrão de peso molecular (Lambda Ladder PFG marker/ BIOLABS New England Biolabs, Beverly, MA, USA). As bandas foram selecionadas automaticamente pelo programa e em seguida, procedeu-se com assistência visual para correção e/ou adição de bandas. O dendograma foi criado a partir dos valores de similaridades entre as bandas computadas pelo programa de acordo com suas posições. Foi utilizado o coeficiente de Dice para calcular a similaridade e UPGMA para agrupamento dos perfis eletroforéticos (tolerância de 1%). Para determinação dos *clusters* foi utilizado o algoritmo (*cluster cutoff algorithm*) do BioNumerics Version 5.1 (Applied Maths, Inc., Austin, TX). Para definição de isolados clonais utilizamos valores de similaridade de perfis de PFGE $\geq 90\%$ (Chokesajjawatee, *et al.*, 2008)

2.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA OS GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA DO *Vibrio cholerae*

Os iniciadores utilizados nas reações de PCR para os genes de virulência encontram-se descritos na Tabela 2.

As reações individuais foram compostas de água esterilizada, tampão de reação 1X (INVITROGEN), 3 mM de MgCl₂ (INVITROGEN), 10 mM de cada dNTP

(*ultrapure dNTP set* [dATP, dCTP, dGTP e dTTP] – INVITROGEN), 250 ng de cada iniciador (Tabela 2), 1,5 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (INVITROGEN) e 3µL do DNA obtido por choque térmico, como descrito anteriormente (item 3.4), em um volume final de 50µL. As condições da reação foram: pré-desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto/1Kb. O resultado foi visualizado através da eletroforese de 7µL da reação em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X.

Tabela 2: Iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção de genes associados à virulência do *Vibrio cholerae*.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	GENE	PRODUTO	REFERENCIA
TcpB	GGTGACTTTGTGTGGTTAAATG	<i>tcp</i> H-B	889 pb	LGMM*
TcpH	CCATAATCCGACACCTTG			
CT-8	GCAGTCAGGTGGTCTTATTGC	<i>ctxAB</i>	982 pb	LGMM*
CT- 10	TCCAGATATGCAATCCTCAG			
Orf U1	GCTGCATTTATCCTTATTGCC	<i>orfU</i>	770 pb	LGMM*
Orf U2	TGTAACCAAACGCCTCGAC			
Zot A	TAAACCTTGAACGCATAG	<i>zot</i>	840 pb	LGMM*
Zot B	CGCCCATAGACCACGATA			
Ace 1	TAAGGATGTGCTTATGATGGACACCC	<i>ace</i>	314 pb	Shi <i>et al.</i> 1998
Ace 2	GGTGATGAATAAAGATACTCATAGG			
TLCF	CTACGCCAGACCATCAAACAG	<i>ptcl</i>	699 pb	Rubin <i>et al.</i> , 1998
TLCR	CACCCTCACTCAGGTTTTGC			
ToxR f 202	TCGGATTAGGACACAACCTC	<i>toxR</i>	560 pb	LGMM*
ToxR r 762	CTGCGAGGGGAAGTAAGAC			
Rtx A f	CTGAATATGAGTGGGTGACTTACG	<i>rtxA</i>	417 pb	Chow <i>et al.</i> 2001
Rtx A r	GTGTATTGTTTCGATATCCGCTACG			

Tabela 2: Iniciadores utilizados nas reações de PCR para detecção de genes associados à virulência do *Vibrio cholerae*. (continuação)

INICIADOR	SEQUÊNCIA	GENE	PRODUTO	REFERENCIA
Rtx C f	CGACGAAGATCATTGACGAC	<i>rtxC</i>	263 pb	
Rtx C r	CATCGTCGTTATGTGGTTGC			
ST-1	GAGAAACCTATTCATTGCA	<i>stn/sto</i>	216 pb	Vicente <i>et al.</i> , 1997
ST-2	GCAAGCTGGATTGCAAC			
Hem f	GAGCGTAATGCGAAGAATGC	<i>hlyA</i>	604 pb	Coelho <i>et al.</i> , 2000
Hem r	GAGTCAGGTTTTGGTTACAGG			
HlyB f	CAAGCCTTCGCCAATAAC	<i>hlyB</i>	622 pb	LGMM*
HlyB r	CCACTTTTTTCCCTTCACC			
HlyCF	AAATCCGCCACTTCTCTTC	<i>hlyC</i>	653 pb	LGMM
HlyCR	AATCAAAGCCACCAAGCC			

* Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz

2.7. DETECÇÃO DE INTEGRONS DE CLASSE I (*INTI1*), II (*INTI2*) E III (*INTI3*) E SEQUENCIAMENTO DOS SEGMENTOS AMPLIFICADOS

A detecção de integrons de classe I, II e III foi realizada utilizando a técnica de PCR seguida de sequenciamento. Os iniciadores utilizados para este fim encontram-se descritos na Tabela 3. Uma vez determinada a ocorrência de integron, pelo resultado positivo para a presença do gene da integrase nas amostras, uma série de outros PCRs foram realizados visando a recuperação de outros segmentos dos mesmos. As estratégias de amplificação e iniciadores encontram-se descritos na Tabela 3 e Figura 6. As concentrações de reagentes e condições de reação foram as mesmas aplicadas a pesquisa dos genes associados a virulência (item 3.6).

Tabela 3: Oligonucleotídeos usados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento da estrutura básica dos integrons e seus segmentos variáveis (cassetes gênicos).

NOME	SEQUÊNCIA DO NUCLEOTÍDEO (5'-3')	ALVO DO PCR	PRODUTO (PB)	REFERÊNCIA
IntI f	AAAACCGCCACTGCGCCGTTA	Gene da integrase de classe I	1068	Fonseca <i>et al.</i> , 2005
IntI r	GAAGACGGCTGCACTGAACG			
InF-5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Segmento variável do integron de classe I	Variável	Fonseca <i>et al.</i> , 2005
InB-3'CS	AAGCAGACTTGACCTGAT			
Qac _{EM} -F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	3'CS do integron de classe I	800	Fonseca <i>et al.</i> , 2005
SulI-B	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC			
Int2 f	GCGTTTTATGTCTAACAGTCC	Gene da integrase de Class II	972	LGMM
Int2 r	AAGTAGCATCAGTCCATCC			
Int3 f	ACTTTCAGCACATGCG	Gene da integrase de Class III	239	LGMM
Int3 r	TCTGTGGACCCACAAAC			

F= iniciador forward r= iniciador reverse CS = seguimento conservado

Os amplicons correspondentes ao gene da integrase, segmento variável e região 3'conservada foram purificados utilizando Wizard SV Gel e PCR Clean-UP System kit (PROMEGA) que posteriormente serviram de DNA molde nas reações de sequenciamento com o Kit comercial Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (APPLIED BIOSYSTEMS) utilizando os seguintes volumes e concentrações: i) 3 µL do produto da PCR purificado, ii) 1 µL de *ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing ready reaction mix* (APPLIED BIOSYSTEMS), iii) 3 µL do iniciador (50 ng/µL), iiiii) 1,5 de tampão 5x e 1,5 µL de água MilliQ esterilizada. O programa de ciclagem consistiu de 30 ciclos de 15 min. a 96°C, 1 seg. a 35°C e 4 min. a 60°C. O sequenciamento foi realizado utilizando o modelo de seqüenciador automático de DNA 3130 *Genetic Analyzer* (APPLIED BIOSYSTEMS / HITACHI). As seqüências nucleotídicas foram editadas com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 1999) e

comparadas aquelas disponíveis no banco de sequências GenBank, cujo acesso é feito no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

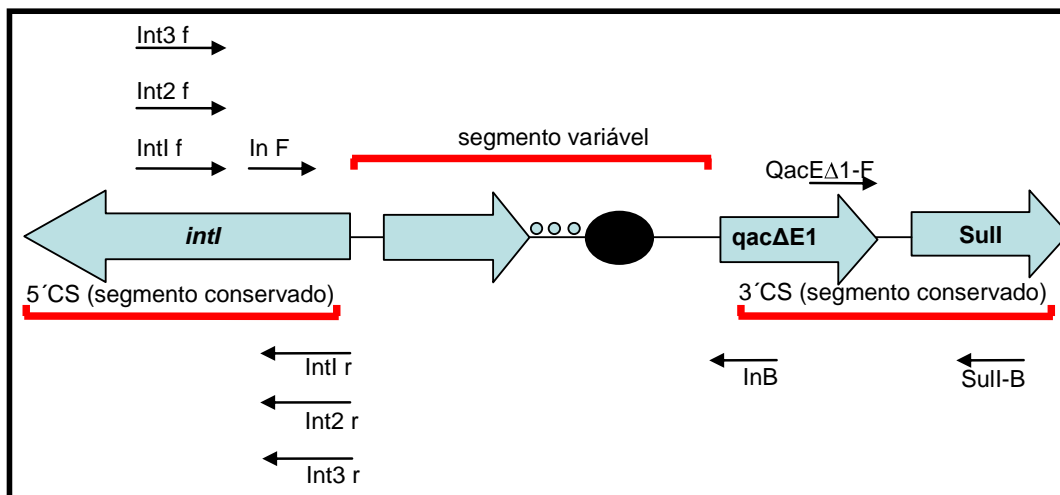


Figura 6: Estratégia de utilização dos iniciadores da PCR para detecção e caracterização dos integrons.

3. RESULTADOS

3.1. GENOTIPAGEM

Os perfis de macrorestrição do genoma de *V.cholerae* O1 e NAGs resolvidos por eletroforese em gel de campo pulsado, encontram-se analisados na Figura 7 e exemplificados nas Figuras 8 e 9.

A genotipagem dos isolados de *V.cholerae* neste estudo revelou grande heterogeneidade genética como representado na (Figura 7). Dos 148 isolados ambientais analisados, 126 (21/O1 e 105/NAG) produziram 107 perfis de macrorestrição distintos, sendo 7 perfis entre os O1 e 100 entre os NAG's (Figura 7). Após sucessivas tentativas, nenhum perfil de bandas pode ser observado para as 22 amostras de NAG restantes.

Os 107 perfis de macrorestrição formaram oito agrupamentos genômicos (*clusters*) principais, não correlacionados a datas ou locais de isolamento particulares, representados por números de um a oito e circunscritos pelas linhas pretas no dendograma apresentado na Figura 7. Estes *clusters* foram definidos por um algoritmo do *Bionumerics* 5.10 (*cluster cutoff algorithm*) e apoiados por um percentual médio de similaridade $\geq 75\%$. Com exceção do *cluster* 1, todos os outros (dois a sete) se mostraram compostos exclusivamente por isolados de *V.cholerae* não O1 e não O139 (NAG) ambientais, compreendendo 37 amostras.

O *cluster* 1 foi o que concentrou um maior número de amostras (n=85) e um maior número de perfis eletroforéticos (n=69) com 75,21% de similaridade. Este grupo compreende NAGs ambientais (n=64), todos os *V.cholerae* O1 ambientais (n=21), todos os O1 de origem humana utilizados como referência (n=4), um isolado do sorogrupo O1 linhagem Amazônia, assim como, as cepas referências de *V.cholerae* O1 El Tor (N16961 e 121) e clássico (200).

O *cluster* 1, contém 23 subgrupos (similaridade média intra subgrupo $\geq 90\%$) distintos de *V.cholerae* O1 ou NAGs isolados do ambiente em diferentes estados amazônicos, fontes de isolamento e/ou datas identificados por letras (A – X) na Figura 7. O subgrupo (B) contém 24 *V.cholerae* O1, incluindo as referências, e um NAG (LMA541-3/Belém-PA, 2000), isolados de amostras de água superficial e esgoto nos estados do Amazonas, Pará, Amapá e Acre, no período de 1991 a 1994, ou seja, no decorrer da última epidemia de cólera na Amazônia. Onze destas amostras (V.1125, V.482, V.485, V.543, V.548, V.613, V.725, V.733, V.736, V.737, V.794, VC512 e VC513 e a cepa referência N16961 isolada de paciente com cólera na Índia em 1970) apresentaram 100 % de similaridade entre si, sendo que duas delas (V.482, V.485) representam distintos isolados, porém, da mesma amostra de esgoto coletada em 1994 em Belém-Pa. Curiosamente, apresentaram perfis de genes de virulência distintos e a amostra V.485 perdeu parte do fago CTX, o pTLC e dois genes do operon *hly*, *hlyB* e *hlyC* (Figura 7 e 8).

O subgrupo (C) foi constituído por três NAGs (V.1090, V.946 e V.951) com 100% de similaridade entre si, além de um isolado de *V.cholerae* O1 (V.1124) obtido em 1994 no município de Macapá. Estes NAGs (V.1090, V.946 e V.951) tem fonte e data de isolamento distintas (Figura 7).

As amostras LMA3984-4 e a cepa referência 200 de *V.cholerae* O1, biotipo clássico, foram agrupadas no subgrupo (E) com 92,31% de similaridade. Já a amostra L34 de *V.cholerae* O1 linhagem Amazônia, não foi relacionada a nenhum dos subgrupos com similaridade $\geq 90\%$.

No subgrupo (O), foram agrupadas duas amostras com similaridade de 91,76%, sendo um *V.cholerae* O1 (V.735/Tabatinga-AM, 1992) e um NAG (LMA750-

1/Belém-PA, 2001). Considerando a presença dos genes associados à virulência, o *V.cholerae* O1 (V.735) não apresentou o gene *ctxA* enquanto que o NAG (LMA750-1) só mostrou resultado positivo para o gene da toxina Zot (Figura 7 e 13).

Ainda no *cluster* 1 (Figura 7), dezenove outros subgrupos, desta vez constituídos exclusivamente de isolados de NAG ambientais, foram identificados. Cinco deles compostos por dois isolados distintos de uma mesma amostra: V.490 e V.496 (95,24 % de similaridade); V.491 e V.492 (95,65 %); V.520 e V.521 (93,33%); V.504 e V.505 (100,00 %) e V.493 e V.494 (90,91 %). Em dois casos o perfil de virulência foi idêntico (V.491 e V.492; V.493 e V.494).

Os *clusters* 2, 4 e 8 foram compostos por dois NAGs cada um. Nos *clusters* 3, 5, 6 e 7 outros subgrupos foram identificados.

3.2. PREVALÊNCIA DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA

A detecção de genes associados à virulência nos isolados ambientais de *V. cholerae* foi feita através da técnica de PCR utilizando iniciadores específicos para as seguintes regiões: VPI (*tcpH/B*, *ToxR1/2*), CTX ϕ (*ctxA/B*, *zot*, *ace* e *orfU1/2*), plasmídeo críptico associado ao CTX ϕ (TLC1/2), hemolisina (*hlyAf/r*), lipase (*hlyCf/r*), transdutor quimiotático (*hlyBf/r*), toxina RTX (*rtxA1/2* e *rtxC1/2*) e a toxina termoestável ST (*stn/sto*) (Tabela 4, Figuras 7 e 13). Em relação aos genes da ilha de patogenicidade (VPI), que codifica o *pilus* TCP, observou-se que alguns *V.cholerae* do sorogrupo O1 (V.1125, V.737, V.778 e LMA3984-4) não mostraram resultado positivo na reação de amplificação do gene *tcpB/H* (Figura 10), assim como, todos os NAGs. A maioria dos O1 (95,23%) foram positivos para o *toxR*, já entre os NAGs, este percentual foi de 59,05% (Tabela 4).

NotI) definidos por PFGE. O agrupamento por similaridade foi determinado pelo coeficiente de Dice e método UPGMA. A matriz cinza/preta representa ausência/presença dos genes de virulência (definidos na barra lateral). Quadrados coloridos em verde são os O1 e em vermelho os NAGs. O registro, sorogrupo, fonte, data e origem estão listados ao lado. SG=sorogrupo, Key=registro da amostra, A=ambiental, H=humana.

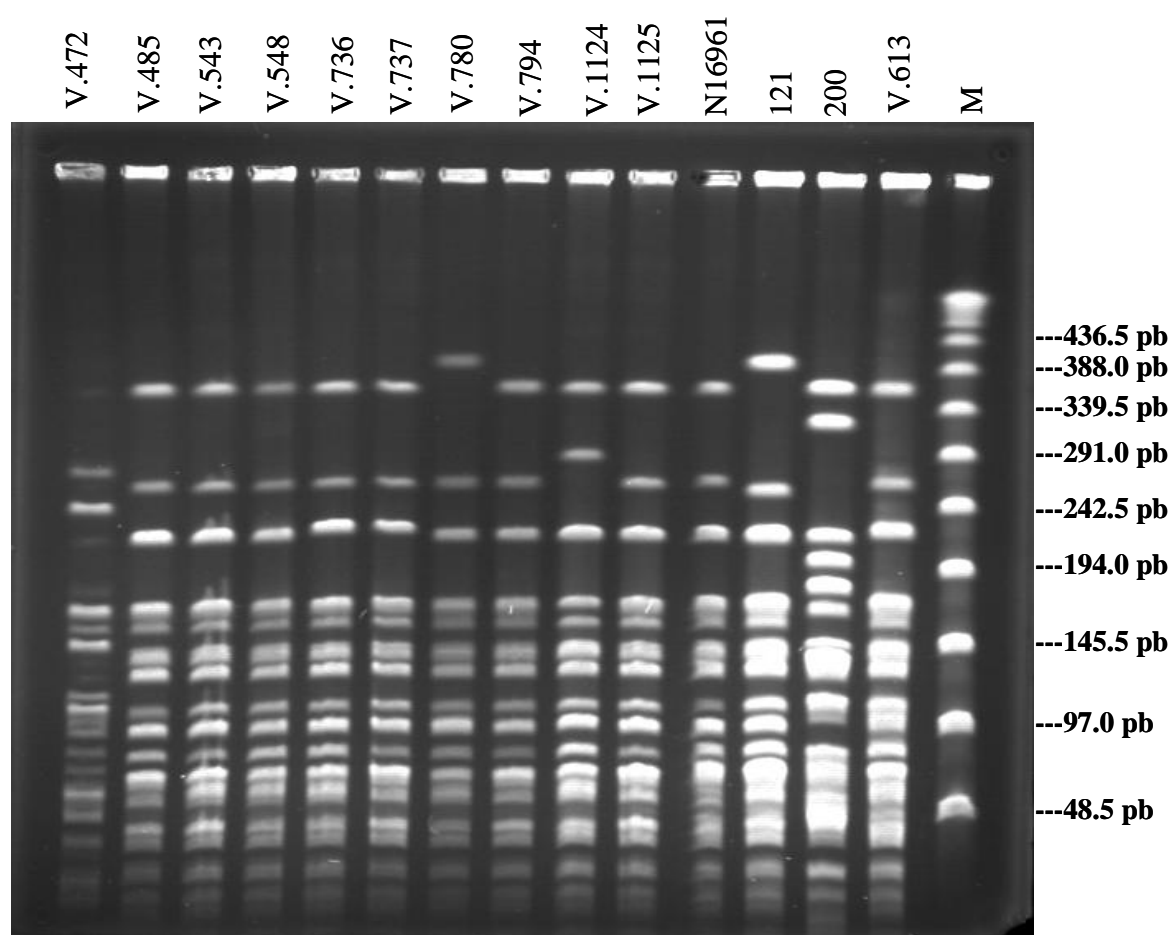


Figura 8: Exemplos dos perfis de macrorestrição do genoma de *V. cholerae* O1 e NAG ambientais resolvidos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) utilizando a enzima de restrição Not I. M=Marcador de peso molecular

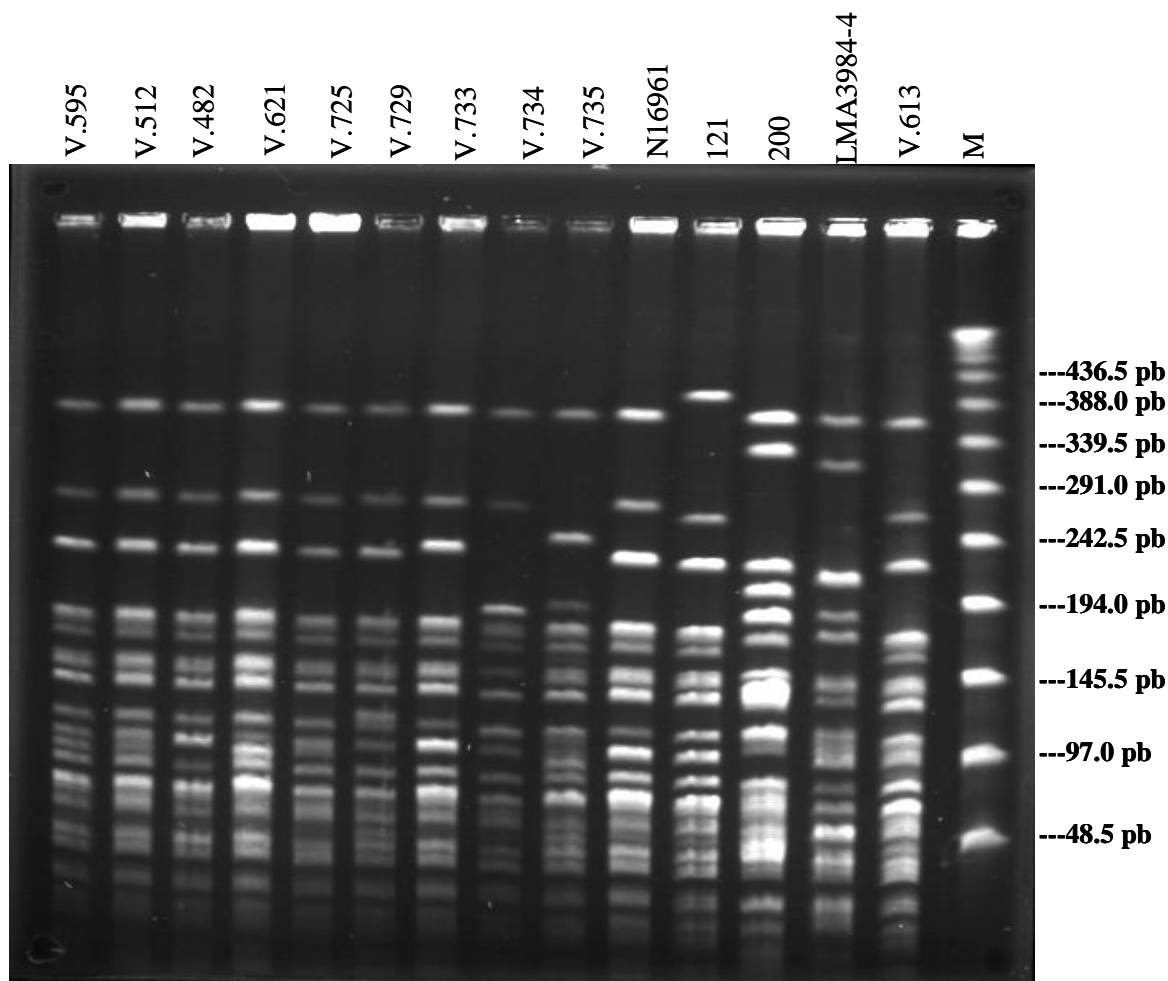


Figura 9: Exemplos de perfis de macrorestrição do genoma de *V.cholerae* O1 resolvidos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) utilizando a enzima de restrição Not I. M=Marcador de peso molecular

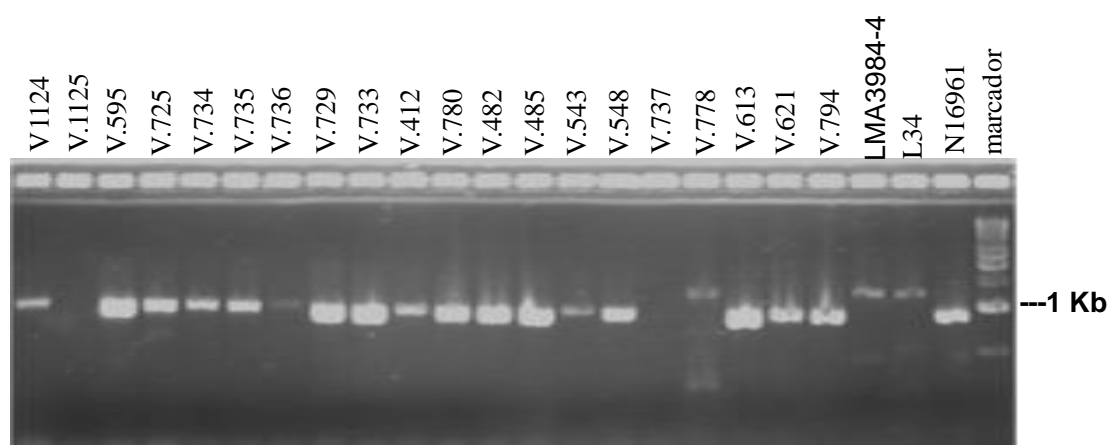


Figura 10: Exemplo dos resultados da amplificação por PCR do gene *tcpB-H* em *V.cholerae* O1 ambientais da Amazônia brasileira.

O gene da toxina colérica não foi detectado nos isolados ambientais de *V.cholerae* NAG, já nas amostras de *V.cholerae* O1 a prevalência foi de 85,71%, (Tabela 4) já que, as amostras (V.794, V.1125, V.735 e LMA3984-4) não mostraram resultado positivo na PCR (Figura 11 e 13). Outra região do bacteriófago CTX Φ , o gene *orfU*, mostrou-se presente em um NAG ambiental (V.1143) que também apresentou PCR positivo para o plasmídeo pTLC, o qual localiza-se a jusante do referido bacteriófago, nas amostras epidêmicas/pandêmicas de *V. cholerae* O1. Outros seis NAGs também carregavam este plasmídeo, sendo quatro delas oriundas de esgoto do município de Belém-Pa em épocas distintas (V503/1977, V.504/1977, LMA2688-9/2005 e LMA3598-1/2006), uma de água superficial também de Belém-Pa (LMA3501-4/2006) e outra de amostra de esgoto (V.1143) do município de Macapá-Ap (Figura 13). Entre os *V.cholerae* O1, a prevalência do plasmídeo pTCL foi de 81,71% (Tabela 4 e Figura 12). Os genes das toxinas Zot e Ace também foram detectados em 0,78% (1/127) e 3,14% (4/127) dos isolados de NAG ambientais, respectivamente. Vale ressaltar, que duas destas amostras de NAG, a V.1101 e V.1145 (ambas *ace*⁺), isoladas no início da epidemia do Brasil, em 1991 e 1992 em Macapá, são integrantes do *cluster* 1, do qual fazem parte todos os isolados ambientais epidêmicos de *V.cholerae* O1. Estas amostras formaram um subgrupo clonal (H), fortemente apoiado por correlação cofenética (Figura 7) e foram isoladas em datas e fontes ambientais distintas. Estes NAGs também foram PCR positiva para os genes *toxR*, *hlyA*, *rtxA* e *rtxC*.

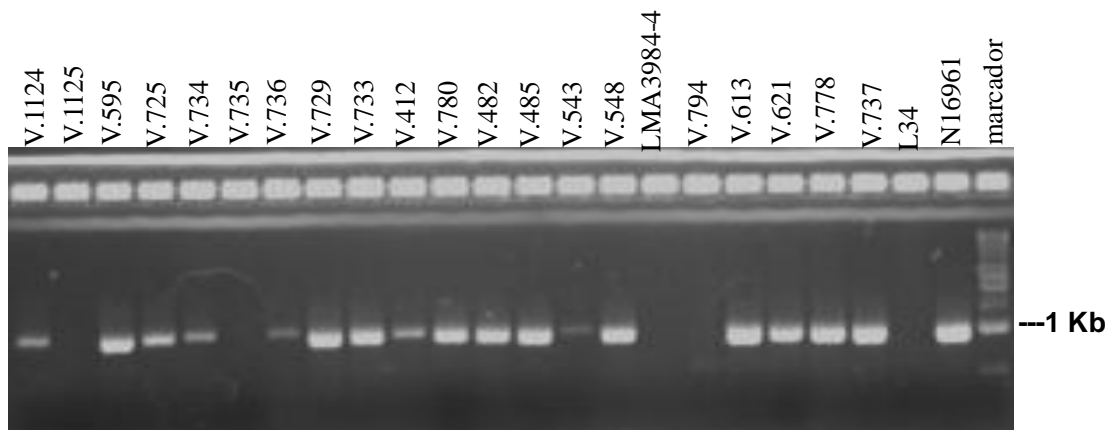


Figura 11: Exemplo dos resultados da amplificação por PCR do gene do gene *ctxAB* em *V.cholerae* O1 ambientais da Amazônia brasileira.

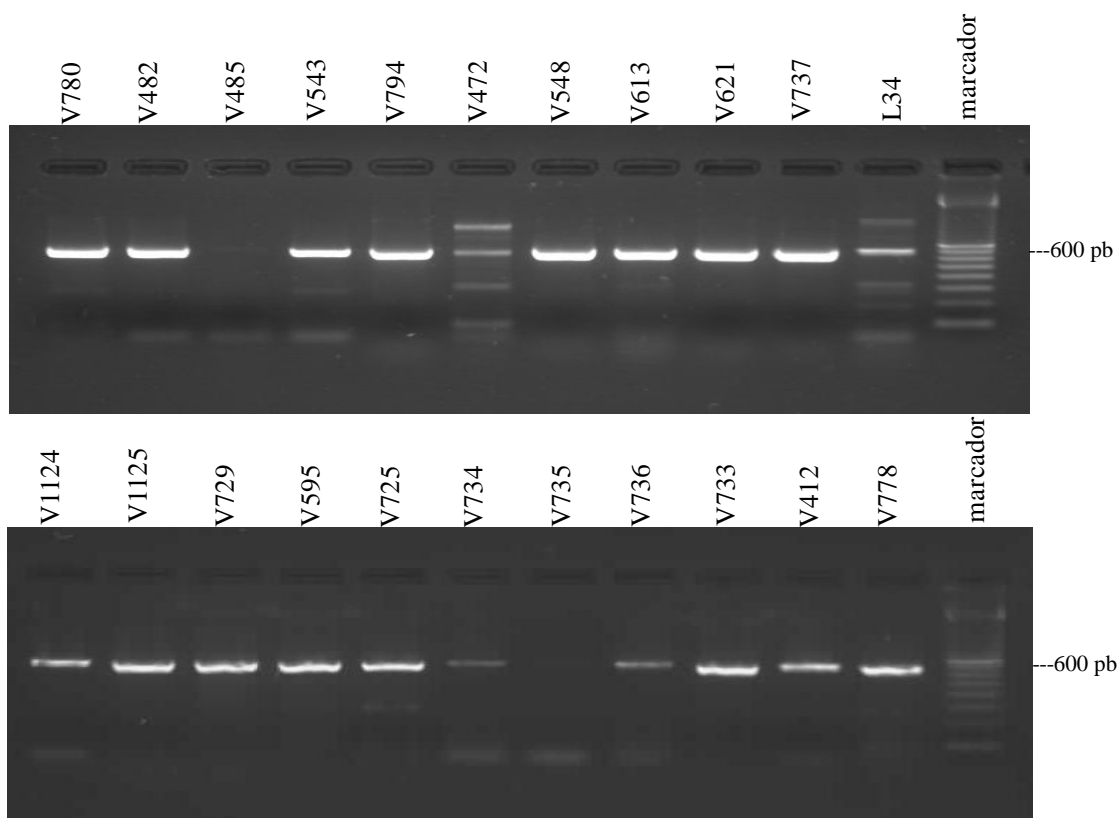


Figura 12: Exemplo dos resultados da amplificação por PCR do plamídeo TCL em *V.cholerae* O1 ambientais da Amazônia brasileira.

Nenhum dos *V.cholerae* O1 apresentou resultado positivo para o gene da toxina (ST), entretanto, 10 distintos isolados ambientais de *Vibrio cholerae* NAG, de diferentes subgrupos clonais do *cluster* 1, possuem este gene (Tabela 4 e Figura 7 e 13). O sequenciamento e análise destes fragmentos, em comparação com outras seqüência previamente depositadas no *GenBank* disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, mostram que o gene da toxina presente nestas amostras (NAG) é 98% similar à seqüência do gene da toxina termo-estável (ST) de NAG (*stm*), cujo número de acesso no GenBank é M85198.

Os demais genes de toxinas (*hlyA/hem*, *hlyB*, *hlyC*, *rtxA* e *rtxC*) foram detectados tanto em NAGs quanto nos vibrios do sorogrupo O1, com uma prevalência que variou de 66,66% a 95,23% (Tabela 4 e Figura 7 e 13).

Tabela 4: Prevalência dos genes associados à virulência em isolados ambientais de *V.cholerae* dos sorogrupos O1 e NAG.

GENES	ISOLADOS AMBIENTAIS	
	<i>V.cholerae</i> O1 ambiental n=21	<i>V.cholerae</i> NAG n=127
	Positivas PCR / %	
<i>ctxA/B</i>	18 / 85,71%	0 / 0,00%
<i>OrfU</i>	15 / 81,42%	1 / 0,78%
<i>Zot</i>	17 / 80,95%	1 / 0,78%
<i>Zce</i>	18 / 85,7%	4 / 3,14%
<i>Ptcl</i>	18 / 85,71%	5 / 3,93%
<i>tcpB/H</i>	17 / 80,95%	0 / 0,00%
<i>ToxR</i>	20 / 95,23%	75 / 59,05%
<i>hlyA/hem</i>	20 / 95,23%	106 / 83,46%
<i>sto/sto</i>	0 / 0%	10 / 7,87%
<i>RtxA</i>	14 / 66,66%	98 / 76,56%
<i>RtxC</i>	14 / 66,66%	87 / 68,50%
<i>HlyB</i>	18 / 85,71%	102 / 80,31%
<i>HlyC</i>	20 / 95,23%	108 / 85,03%

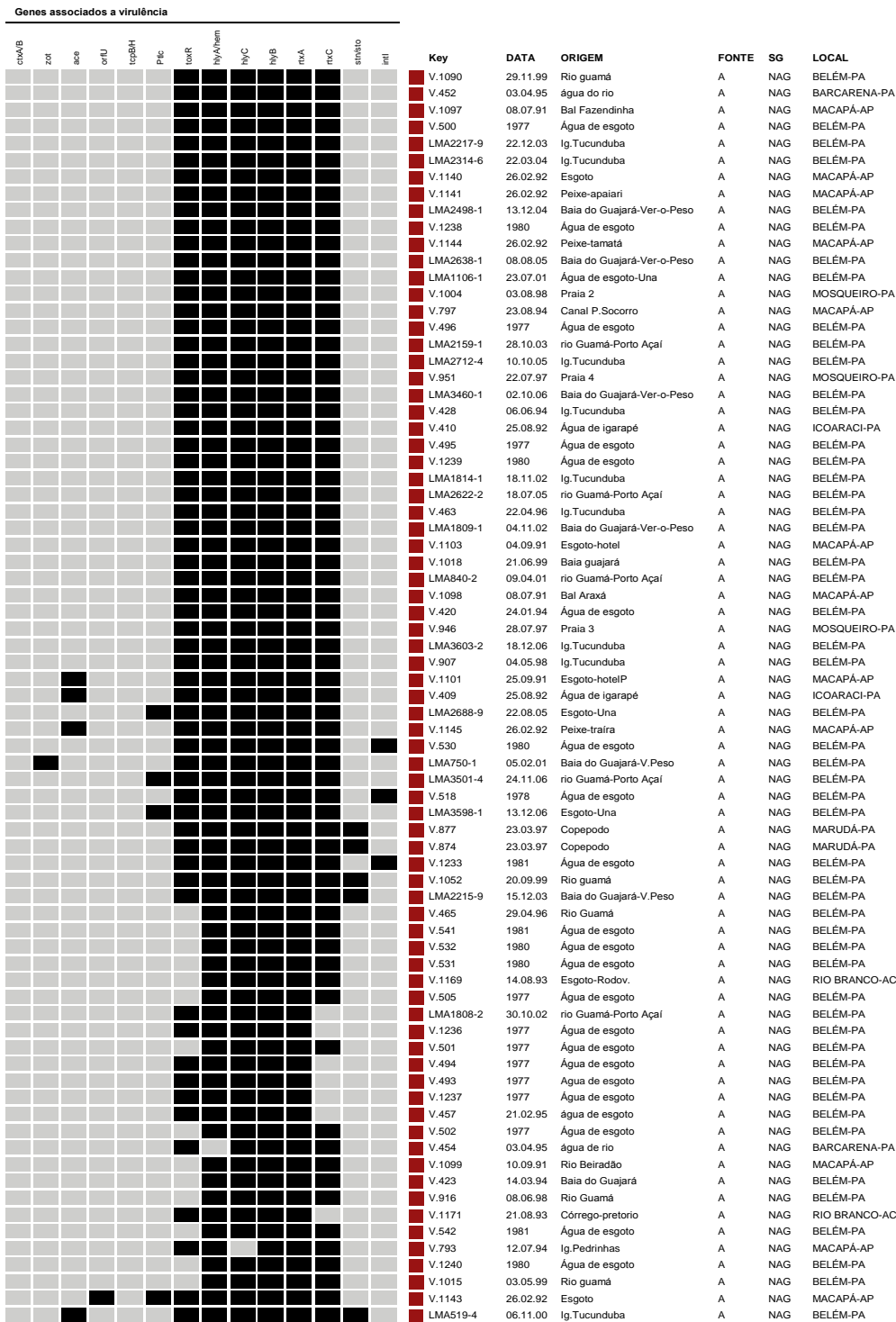


Figura 13: Distribuição de genes associados à virulência entre os 148 isolados de *V.cholerae* O1 e NAG de fontes ambientais. A matriz cinza/preta representa ausência/presença dos genes de virulência por PCR. Os quadrados coloridos

representam: verde=sorogrupo O1, vermelho=NAG. Reg=registro da amostra, SG=sorogrupo, A=ambiental, H=humano.

(Continuação)

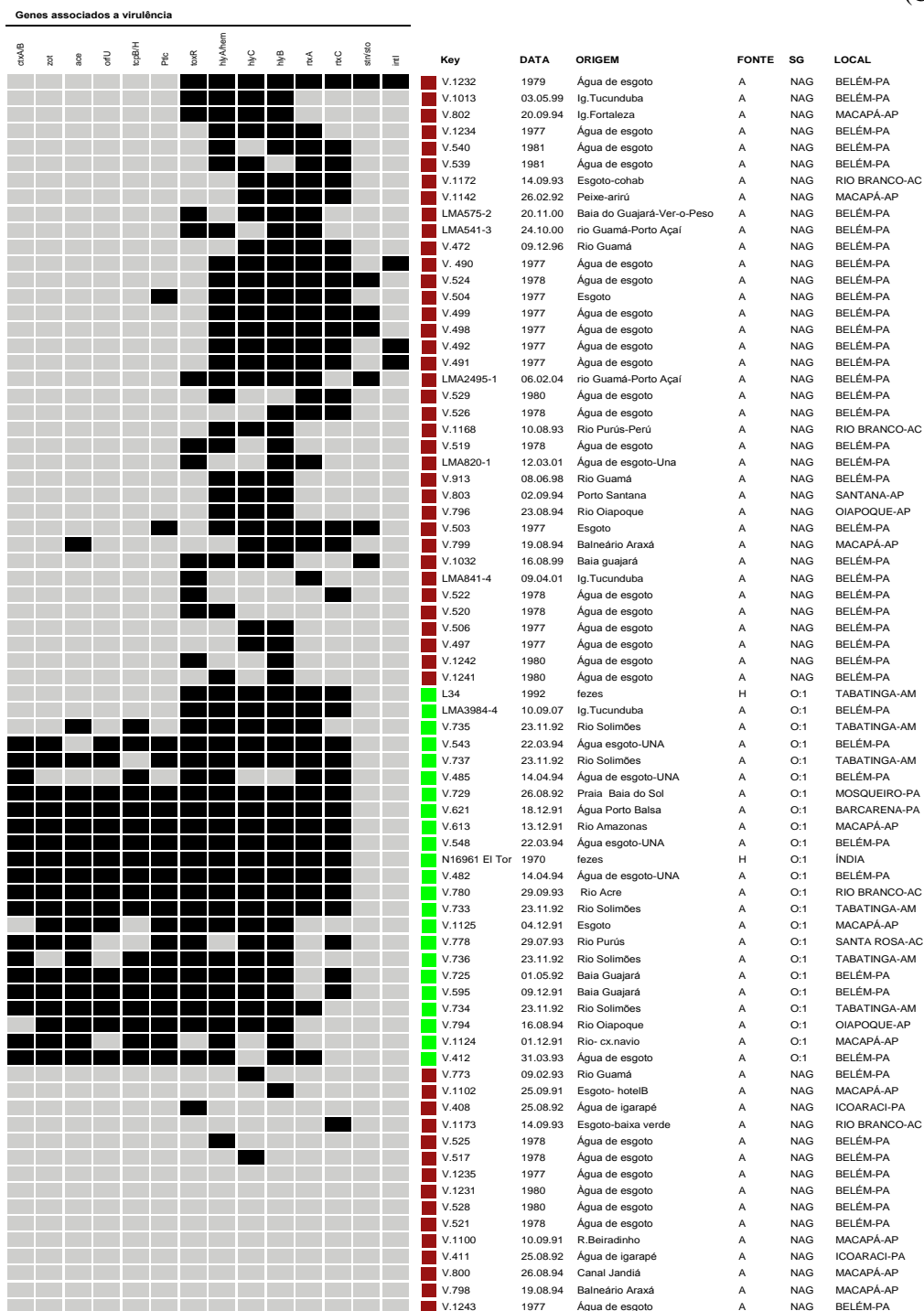


Figura 13: Distribuição de genes associados à virulência entre os 148 isolados de *V.cholerae* O1 e NAG de fontes ambientais. A matriz cinza/preta representa

ausência/presença dos genes de virulência por PCR. Os quadrados coloridos representam: verde=sorogrupo O1, vermelho=NAG. Reg=registro da amostra, SG=sorogrupo, A=ambiental, H=humano.

3.3. DETECÇÃO DE INTEGRONS

O gene da integrase de classe 1 (*intI1*) não foi encontrado nos isolados ambientais (n=21) de *V.cholerae* O1, entretanto, foi detectado em 7/127 dos *V.cholerae* NAG (V490, V491, V492, V518, V1232, V530 e V1233), isolados entre os anos de 1977 a 1981 (Figura 7). A pesquisa dos genes das integrases de classe 2 e 3 mostrou resultado negativo para todas as amostras testadas.

Os isolados contendo integrase de classe 1 tiveram as demais regiões características deste integron amplificadas, utilizando a estratégia representada na Figura 6. Nas sete amostras referidas confirmou-se, por sequenciamento, a ocorrência do gene que codifica a integrase do tipo I na extremidade 5'CS conservada e os genes *qacEAI* e *sull* na extremidade 3'CS conservada, os quais constituem os componentes básicos dos integrons de classe 1 (Figura 14). A análise das sequências dos segmentos variáveis dos isolados de 1977 (V.490, V.491, V.492), 1978 (V.518), 1979 (V.1232), 1980 (V.530) e 1981 (V.1233) revelou a presença de dois diferentes alelos de um único gene, o *aadA*, que codifica para uma aminoglicosídeo-adeniltransferase que confere resistência a estreptomicina e espectinomicina, que são antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos. Os alelos encontrados foram *aadA2*, nos isolados do ano de 1977 e *aadA7*, nos demais (número de acesso no GenBank DQ196321 e DQ196322) (Figura 15).

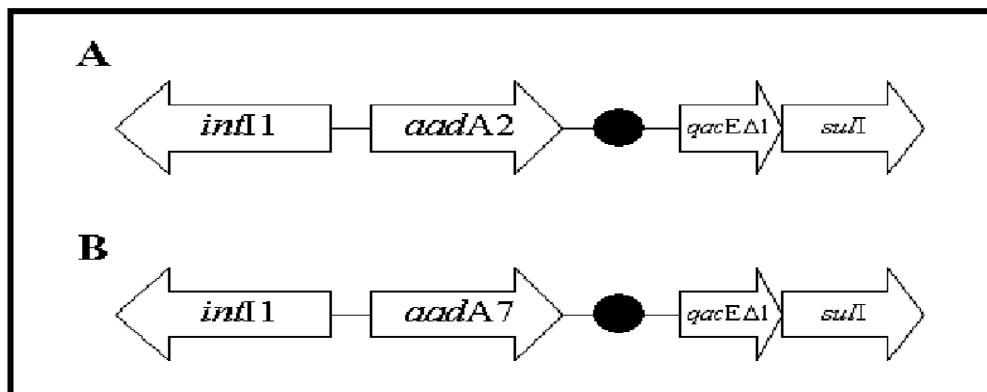


Figura 14: (A e B) Composição e organização dos integrons de classe 1 dos isolados ambientais de *V.cholerae* NAG da Amazônia brasileira.

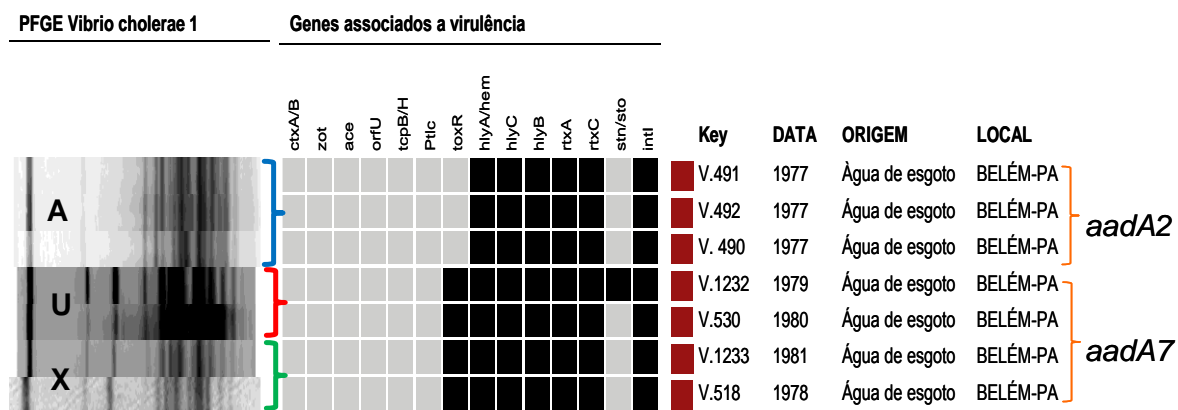


Figura 15: Perfis de macrorestrição e de genes associados a virulência nos isolados ambientais de *V.cholerae* NAG da Amazônia brasileira com integrons de classe 1. A matriz cinza/preta representa ausência/presença dos genes de virulência por PCR. Os quadrados coloridos em vermelho=NAG. Key=registro da amostra.

4. DISCUSSÃO

Populações bacterianas de um modo geral são constituídas de grupos abundantes e heterogêneos, e apenas um pequeno conjunto de células altamente relacionadas e diferenciadas (clones ou linhagens) são particularmente associadas com epidemias ou pandemias de determinadas doenças (Maiden *et al.*, 1998). O *V.cholerae*, por exemplo, é autóctone de diversos ambientes aquáticos em todo o mundo; possui atualmente 206 sorogrupos já identificados, e apenas algumas linhagens de O1 e O139 toxigênicas foram diretamente associadas à cólera epidêmica (O1 e O139) ou pandêmica (O1) (Raychoudhuri *et al.*, 2009). Estas linhagens de sorogrupos patogênicos de *V.cholerae* são carreadoras do cassete de virulência (CTXΦ), que inclui o gene que codifica para a toxina colérica (*ctxAB*), e da ilha de patogenicidade (VPI), que inclui os genes que codificam a síntese do TCP, *pilus* que além de ser o principal fator de colonização, é o receptor para o fago CTXΦ (Sack *et al.*, 2004; Raskin, *et al.*, 2004; Faruque *et al.*, 2005). Ambos determinantes de virulência são caracterizados por serem móveis ou mobilizáveis entre células de *V.cholerae* e entre esta espécie e o *Vibrio mimicus*.

V.cholerae não-O1 e não-O139 (NAGs) tem sido reconhecidos como agentes etiológicos de casos isolados e surtos de diarreia semelhante a cólera (Dakin *et al.*, 1974; Sharma *et al.*, 1998). O sorogrupo O37, por exemplo, foi o agente etiológico da epidemia de cólera no Sudão em 1968 e, em diferentes estudos, foi observada sua relação genética com *V.cholerae* O1 e O139, em especial com *V.cholerae* O1 biotipo clássico, linhagem responsável pela sexta pandemia de cólera (Bik *et al.*, 1996; Beltrán *et al.*, 1999; O'Shea *et al.*, 2004).

O monitoramento da emergência de patógenos deve ser eficiente, rápido e acurado na identificação de organismos que representem de fato um problema para a saúde pública. Para isto, a definição de marcadores robustos, que diferencie linhagens patogênicas de linhagens ambientais, considerando uma espécie de bactéria, é fundamental. Determinar a relação genética ou a clonalidade entre isolados é outro aspecto que deve ser abordado no monitoramento ou estudos de surtos e/ou epidemias. Diversos métodos baseados no DNA tem sido usados para genotipagem de *V. cholerae* com destaque para o PFGE que tem oferecido excelentes resultados, além de apresentar alto poder discriminatório e ser reprodutível (Islam *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Bakhshi *et al.*, 2008; Safa *et al.*, 2009).

Estudos acerca da diversidade genética de populações de *V. cholerae* são realizados, na sua maioria, com isolados de espécimes clínicos, dos sorogrupos O1 e O139, oriundos de áreas endêmicas para cólera. De um modo geral estes estudos identificaram clones relacionados a surtos e casos esporádicos de diversas partes do mundo, a relação genética dos sorogrupos O1 e O139, assim como, o surgimento de novas linhagens e híbridos (Jiang *et al.*, 2000a; Singh *et al.*, 2001; Zo *et al.*, 2002; Kan *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2005; Ansaruzzaman *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2007; Bakhshi *et al.*, 2009).

Estudos de genética de populações de *V. cholerae* de origem ambiental, com poucas exceções, consideram um limitado número de exemplares e quase sempre no contexto da sua relação com isolados clínicos. A natureza clonal, neste caso, fica também mais restrita aos sorogrupos O1 e O139 toxigênicos, obtidos em ambientes relacionados a casos de cólera, com o restante dos sorogrupos (NAGs) mantendo pouca

ou nenhuma relação genética (Karaolis *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000a; Singh *et al.*, 2001; Faruque *et al.*, 2004; O'Shea *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2007).

Neste estudo tivemos a oportunidade única de estudar uma coleção de *V. cholerae* ambientais, isolados nos últimos 30 anos, incluindo períodos de antes e depois da última epidemia de cólera no Brasil. A maioria dos exemplares do sorogrupo O1 foram isolados concomitantemente à epidemia de cólera na região Amazônica brasileira (1991-1996), enquanto que os NAGs são endêmicos. Uma grande diversidade genética foi caracterizada entre as amostras estudadas, incluindo isolados toxigênicos e não toxigênicos com diferentes perfis de virulência, sorogrupos e genótipos. De um modo geral, *V. cholerae* O1 e NAGs apresentaram perfis de PFGE distintos (Figura 7), corroborando, deste modo, os achados de Thompson *et al.* (2003); Farfán *et al.* (2000); Farfán *et al.* (2003) e O'Shea *et al.* (2004).

V. cholerae O1 toxigênicos apresentam clonalidade quando comparados aos heterogêneos NAGs ambientais (Karaolis *et al.*, 1995; O'Shea *et al.*, 2004). Este estudo apresentou relação semelhante, visto que a maioria das amostras do sorogrupo O1, constituíram três clones, com mais de 90% de similaridade entre eles no subgrupo B (Figura 7). Este subgrupo foi caracterizado por conter também amostras de origem clínica da sétima pandemia (Amazônia e Índia), o que permitiu estabelecer uma relação direta entre a presença de *V. cholerae* O1 toxigênico no ambiente e a existência de indivíduos com cólera na região. Esta observação apoia os estudos que inferiram que a cólera na América Latina foi causada pela expansão do clone da sétima pandemia asiática (Wachsmuth *et al.*, 1991; Faruque & Albert, 1992; Wachsmuth *et al.*, 1993) e a discussão de que a própria dinâmica desta bactéria de veiculação hídrica, nos países subdesenvolvidos, contribuiu para expansão do clone pandêmico, visto que, quando da

ocorrência de muitos casos clínicos, um grande número de células de *V.cholerae* toxigênicos podem atingir os mananciais superficiais que, por sua vez, podem ser utilizados para diferentes fins, incluindo o consumo humano (Merrell *et al.*, 2002). Além disso, nenhuma amostra deste subgrupo foi isolada no período pós-epidêmico, ou seja, aparentemente não houve a persistência desta linhagem no ambiente, independentemente da contribuição da epidemia. Esta não persistência pode ser devido a não adaptabilidade desta linhagem às condições físico-químicas e biológicas do ambiente amazônico e/ou sua fisiologia estar adaptada para a interação com o hospedeiro humano e a deflagração da cólera (Merrell *et al.*, 2002).

A presença de *V.cholerae* no ambiente pode estar diretamente relacionada a fatores ambientais, tais como, temperatura, salinidade e/ou interação com outros microrganismos (plâncton) na coluna d'água (Colwell & Spira, 1992; Colwell & Huq, 1994; Ravel *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000b.). Tem sido demonstrado que a temperatura influencia a frequência de isolamento do *V.cholerae* a partir de amostras de água devido sua forte correlação com a abundância desta bactéria no ambiente, além disso, a temperatura também pode promover modificações na estrutura populacional (diversidade) desta espécie por meio da sucessão de comunidades microbianas (Colwell & Huq, 1994). Outro aspecto está relacionado ao fenômeno de entrada do *V.cholerae* em estado viável e não cultivável (VBNC) que consiste em uma estratégia de sobrevivência às condições ambientais desfavoráveis (Colwell & Huq, 1994). A presença de *V.cholerae* no ambiente tem sido modulada também pela salinidade com valores entre 0,2 e 2 ppt (Colwell & Huq, 1994) e valores entre 4 e 14 ppt (Kaper *et al.*, 1979) variando de acordo com as características locais. Em estudo recente, envolvendo a correlação entre as condições ambientais encontradas e a ocorrência de epidemia de

cólera, os autores concluíram que fatores ambientais (concentração de clorofila A e precipitação pluviométrica) influenciaram diretamente a dinâmica das epidemias de cólera em duas localidades (Matlab e Kolkata) do continente indiano (Constantin de Magny *et al.*, 2008).

O fato do *V.cholerae* patogênico ser uma bactéria que se adapta tanto ao intestino dos hospedeiros quanto ao meio ambiente nos faz retomar a discussão que diz respeito a sua possível vantagem seletiva em relação as outras linhagens, quanto a sua manutenção e multiplicação no ambiente aquático (Merrell *et al.*, 2002). Considerando os dados epidemiológicos da cólera no Brasil, o não isolamento de cepas ambientais toxigênicas antes e depois da epidemia na região e a caracterização do único isolado O1, LMA3984-4 (este trabalho), pós epidemia de cólera na Amazônia, é possível concluir que as características do ecossistema aquático da Amazônia não foram favoráveis à manutenção da linhagem da sétima pandemia na região (Sá *et al.*, 2007).

Por outro lado, é demonstrada a adaptabilidade de linhagens patogênicas em outros ecossistemas o que favorece a manutenção da cólera em áreas endêmicas, inclusive de forma sazonal (Colwell, 1996; Lobitz *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 2006). Em estudo realizado na baía de Bengal, em Mathbaria, Bangladesh, Alam *et al.* (2006) determinaram que os *V.cholerae* O1 e O139 persistem neste ambiente aquático predominantemente como células viáveis e não cultiváveis e em biofilmes bacterianos, formados em substratos bióticos, tendo sido este último sugerido como mais um reservatório ambiental desta bactéria entre as epidemias sazonais de cólera em Bangladesh; entretanto, o modo como estas células viáveis e não cultiváveis retomam seu potencial epidêmico permanece pouco esclarecido. Alam *et al.* (2007), restabeleceram a cultivabilidade das células em teste *in vitro*, apenas após

enriquecimento intestinal. Outro estudo sugere que mudanças na temperatura da água promovem o restabelecimento do estado cultivável a partir de VBNC (Ravel *et al.*, 1995).

Mesmo sendo o *V.cholerae*, uma bactéria natural do ambiente marinho e água doce (Colwell & Spira, 1992; Islan *et al.*, 1993; Lobitz *et al.*, 2000), o sorogrupo O1 toxigênico é isolado, por métodos de cultivo, com pouca frequência de águas superficiais durante períodos epidêmicos (Islan *et al.*, 1994) e muito raramente na ausência da doença (Huq *et al.*, 1990). Observando o período de isolamento das amostras deste estudo, é possível notar que todos os isolados de *V.cholerae* O1, com apenas uma exceção (LMA3984-4), foram obtidos durante a epidemia na região Amazônica (1991-1996). A identidade do perfil genético, da maioria deles, com isolados clínicos da sétima pandemia nos leva a concluir que pelo menos durante a epidemia na região foi possível o isolamento, por cultivo, da linhagem responsável pela sétima pandemia, no ambiente aquático da Amazônia.

Os isolados ambientais de *V.cholerae* O1, V.1124 (*ctx*⁺), V.735 (*ctx*⁻) e LMA3984-4 (*ctx*⁻) e a referência L34 (linhagem Amazônia), não agruparam com o clone epidêmico (subgrupo B, Figura 7). *V.cholerae* V.1124 (*ctx*⁺) foi obtido de uma amostra de água do rio Cachoeira do Navio em dezembro de 1991 no município de Macapá-AP. Trata-se de um isolado ambiental toxigênico do período epidêmico na região, e que está relacionado geneticamente (91,67%) a NAGs isolados em 1997 e 1999 no Pará. A amostra V.735 (*ctx*⁻) foi isolada de uma amostra de água superficial do rio Solimões coletada na altura do município de Tabatinga em 1992 e que é relacionado geneticamente a um NAG isolado na Baía de Guajará/Belém em 2001. Em relação a amostra LMA3984-4 (*ctx*⁻)/2007, que é um *V.cholerae* O1, distinto da linhagem

epidêmica, curiosamente está relacionado geneticamente a um representante do biotipo clássico, que foi a linhagem determinante da sexta pandemia de cólera (Barua, 1992). Linhagens relacionadas a este biotipo, como o O37 e híbridos (Chun *et al.*, 2009) continuam sendo identificadas no mundo e, portanto, este isolado será motivo de novas caracterizações. A amostra L34, utilizada como referência, trata-se de um isolado clínico de 1992, do município de Tabatinga no Estado do Amazonas, obtido por ocasião de um surto cujos pacientes receberam diagnóstico clínico-epidemiológico de cólera. Esta amostra foi exaustivamente estudada (Coelho *et al.*, 1995a; 1995b; Baptista *et al.*, 1998; Pichel *et al.*, 2003) e mostrou tratar-se de uma linhagem distinta do clone da sétima pandemia (Asiática) que não possui os dois principais determinantes de virulência, CTXΦ e a VPI. Ela mantém uma certa relação genética (menor que 88%) com um NAG isolado em Belém/2005 (LMA2712-4).

Recentemente, Blokesch & Schoolnik (2007), demonstraram a possibilidade real da coverssão de sorogrupos entre isolados de *V.cholerae* no ambiente aquático por recombinação e/ou mutação. Esta transformação seria induzida pela quitina presente nos exoesqueletos dos copépodes, onde biofilmes desta bactéria se mantém naturalmente. Este mecanismo não só facilita a emergência de variantes de *V.cholerae* mais adaptadas para sobreviverem em nichos ambientais, mas também aumenta sua transmissibilidade e patogenicidade.

Essas observações vem consubstanciar a relatividade do sorogrupo O1 como marcador e determinante de *V. cholerae* com potencial patogêncio e/ou epidêmico. Recente trabalho sobre a evolução dos genomas das linhagens pandêmicas de *V.cholerae*, identifica os eventos de transferência lateral de genes, recombinações e mutações, envolvendo os determinantes de virulência e conclui que as linhagens

epidêmicas/pandêmicas não podem ser definidas em função do sorogrupo (Chun *et al.*, 2009), o que nos leva a retomar a discussão acerca da possibilidade de evolução independente de *V.cholerae* não toxigênico à toxigênico no ambiente (Waldor & Mekalanos, 1996; Faruque *et al.*, 1998a), sobretudo, durante as epidemias de cólera, por transferência lateral de genes.

Por outro lado e, contrastando com os achados para *V.cholerae* O1, foram caracterizados neste estudo vários subgrupos de NAGs, relacionados geneticamente, que persistiram no ambiente da região e que, portanto, estariam adaptados aos diferentes ecossistemas aquáticos da Amazônia. Este grupo mostrou-se bastante heterogêneo. Algumas amostras apresentaram relação genética com *V.cholerae* O1, mas de um modo geral, houve uma nítida segregação entre os isolados do sorogrupo O1 em relação aos demais, aqui representados pelos NAGs.

Outros estudos envolvendo NAGs não toxigênicos tem revelado uma diversidade genética bastante elevada, independente da região estudada ou da técnica empregada para a genotipagem (Karaolis *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2001; Faruque *et al.*, 2004; O'Shea *et al.*, 2004; Keymer *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2007). Neste estudo, dentre os 127 NAGs submetidos a genotipagem (PFGE), 105 apresentaram 100 perfis eletroforéticos distintos e que foram agrupados em 8 *clusters*. Considerando as 13 regiões envolvidas na virulência foram caracterizados 51 perfis .

A maioria dos integrons de classes 1, 2 e 3 tem sido detectados em bactérias isoladas de espécimes clínicos, embora seja presumido que estes elementos sejam originários de bactérias ambientais, visto que existem evidências acerca da transferência de cassetes gênicos entre bactérias patogênicas, comensais e ambientais abrigando distintas classes de integrons (Michael *et al.*, 2008; Gillings *et al.*, 2009). Neste

contexto, integrons de classe 1 mantem cassetes gênicos que lhes conferem vantagens adaptativas relevantes frente as condições ambientais; no caso dos ambientes hospitalares e/ou seus efluentes de esgotos, genes de resistência aos antibióticos ou ainda, ecossistemas onde organismos produtores de antibióticos estivessem presentes (Hardwick *et al.*, 2008).

Neste estudo, integrons de classe 1 foram detectados em 7/127 isolados ambientais de *V.cholerae* NAG, todos oriundos de amostras de esgoto, coletadas pelo menos 10 anos antes do início da última epidemia de cólera na região. A vigilância molecular de integrons em ambientes aquáticos do Tehran (Iran) encontrou uma prevalência de 5,4% (Bakhshi *et al.*, 2009) quase a mesma observada neste estudo (5,5%), porém, contrastando com os achados de Dalsgaard *et al.* (2000b) que não detectaram este elemento em nenhum dos 45 NAGs oriundos de amostras de água e sedimento, e em apenas um isolado de alimento que foi positivo para o gene da integrase de classe 1. Entre isolados clínicos de *V.cholerae*, a frequência é variada. Na Índia, por exemplo, este percentual vai de 14% (Shi *et al.*, 2006) a 23% (Thungapathra *et al.*, 2002). Na Tailândia, a frequência de detecção variou de 30% a 58%, em isolados clínicos de crianças e adultos, respectivamente (Dalsgaard *et al.*, 2000b). Em estudo realizado com isolados clínicos de *V.cholerae* O1 da epidemia na Amazônia brasileira, a frequência de integrons de classe 1 foi de 33% (Sá, L.L.C. dados não publicados), resultados que contrastam com os achados de Campos *et al.* (2004) que não obtiveram resultado positivo na análise de isolados de *V.cholerae* O1 da epidemia do Brasil. A maioria dos estudos com amostras clínicas de uma determinada espécie apresenta um significativo viés que é a análise de isolados de um mesmo clone.

Situação semelhante pode ocorrer com a análise de isolados do ambiente, resultando em uma superestimação da prevalência destes elementos.

A análise molecular do segmento variável dos integrons de classe 1 encontrados entre os NAGs ambientais revelou a presença de dois alelos do gene *aadA*: *aadA2* e *aadA7* que conferem resistência aos aminoglicosídeos. O alelo *aadA2*, a exemplo do *aadA1*, tem sido relatado em integrons de classe 1 encontrados em isolados oriundos de Laos (Iwanaga *et al.*, 2004), Vietnam (Dalsgaard *et al.*, 1999; Ehara *et al.*, 2004), Tailândia (Dalsgaard *et al.*, 2000b), Inglaterra (Rosser & Young 1999) e Brasil (Sá, L.L.C. dados não publicados); entretanto, com exceção de um isolado de *V.cholerae* NAG oriundo de alimento (Dalsgaard *et al.*, 2000b), a detecção desses alelos ocorreu em isolados clínicos de *V.cholerae* O1 ou NAG.

Em um estudo de vigilância realizado na Inglaterra durante um período de dois meses, 3000 bactérias Gram-negativas isoladas de um ambiente estuarino foram analisadas quanto a presença de integrons de classe 1 e a incidência encontrada foi de 3,6% sendo o cassete gênico *aadA1* o mais prevalente (Rosser & Young 1999). Cada um dos alelos (*aadA2* e *aadA7*) encontrados neste estudo pertence a três clones distintos de NAGs ambientais (subgrupos A, U e X) (Figura 15). Todos os isolados do subgrupo A foram obtidos de água de esgoto em 1977 e carregam o gene *aadA2* já identificado em várias outras espécies bacterianas (Gestal *et al.*, 2005, Shi *et al.*, 2006) inclusive, *V. cholerae* O1 clínico da Amazônia brasileira (Fonseca *et al.*, 2008).

Já os subgrupos U e X, abrigam o gene *aadA7*, um alelo raro deste gene, e que persistiu no ambiente da Amazônia de 1978 a 1981. O *aadA7*, até o momento, só havia sido identificado em *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio fluvialis* (Mazel *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2004; Doublet *et al.*, 2004; Levings *et al.*, 2005).

Todos os isolados ambientais de *V.cholerae* O1 e NAGs foram caracterizados quanto a presença dos genes relacionados ao bacteriófago CTXΦ e ilha de patogenicidade VPI, que são os principais determinantes de virulência desta espécie. A maioria (18/21) dos isolados ambientais de *V.cholerae* O1 que, como evidenciado nas análises deste estudo, pertencem a linhagem epidêmica da América do Sul e a exemplo da amostra N16961 utilizada como referência, foram positivos para *ctxA* (88,88%), *zot* (80,95%), *ace* (85,7%), *tcpB-H* (80,95%) e *orfU* (81,42%). A maioria (15/21) carregava os genes *ctxA* e *tcpB-H* concomitantemente, indicando que os genes codificadores para a toxina colérica e o *pilus* para aderência e colonização intestinal estão mantidos nessas amostras.

A amostra LMA3984-4, isolada no ano de 2007, portanto, fora do período da epidemia na região, não possui as regiões relacionadas aos elementos CTXΦ e VPI e na análise por PFGE demonstrou estar mais relacionada geneticamente com a cepa referência 200 (clássico) do que com aquelas do biótipo El Tor. Este achado aponta para a importância da genotipagem na definição de isolados patogênicos (toxigênicos) e não patogênicos, visto que, só a determinação do sorogrupo não é absoluta nesta caracterização (Singh *et al.* 2001).

A exemplo dos resultados encontrados neste estudo, Singh *et al.* (2001) também identificaram isolados de *V.cholerae* O1 sem parte (*zot*) do cassete de virulência (CTXΦ), porém com *ctxA* e *ace* mantidos. Estes dados indicam que cepas toxigênicas no ambiente podem tornar-se menos virulentas. Duas hipóteses podem ser levantadas a este respeito: ou as amostras perdem sucessivamente genes que compõem o bacteriófago CTXΦ e/ou a ilha de patogenicidade VPI, ao entrar em contato com o meio ambiente ou parte dos genes destes operons, são perdidos em função dos seguidos

repiques realizados com estas amostras no laboratório, na ausência de pressão seletiva (Somerville *et al.*, 2002).

Apesar do caráter esporádico das doenças relacionadas com NAGs, sua importância clínica e epidemiológica vem sendo cada vez mais reconhecida (Ramamurthy *et al.*, 1993; Dalsgaard *et al.*, 1995a; 1995b; Mukhopadhyay *et al.*, 1996a; Sharma *et al.*, 1998; Dalsgaard *et al.*, 1999; Chakraborty *et al.*, 2000). Uma análise da literatura pertinente mostra que ambos os fatos tem sido observados: o isolamento de NAG a partir de casos clínicos sem qualquer dos marcadores de virulência conhecidos (Dalsgaard *et al.*, 1995a; Sharma *et al.*, 1998) e a ocorrência de NAG de origem clínica ou ambiental carreadoras de alguns deles tais como, a toxina termo-estável (*stn*), *tcpA*, *ctxAB* e *toxR* (Mukhopadhyay *et al.*, 1996a; Ghosh *et al.*, 1997, Novais *et al.*, 1999, Chakraborty *et al.*, 2000). Tem sido sugerido que os NAGs atuam como reservatórios ambientais de genes de virulência para linhagens potencialmente epidêmicas emergentes (Rivera *et al.*, 2001, Singh, *et al.*, 2001)

Neste estudo, a triagem dos genes que compõe o CTX Φ e a VPI, realizada com NAGs ambientais, revelou positividade para 5,5% deles e os seguintes genes foram encontrados: V.1143 (*orfU*), LMA750-1(*zot*), V.1101(*ace*), V1145(*ace*), V.409 (*ace*), LMA519-4 (*ace*) e V.799 (*ace*). Conforme apresentado, partes do cassete de virulência (CTX Φ) foram identificadas em 7/127 amostras, entretanto, em nenhuma identificamos TCP. Theophilo *et al.* (2006), analisando 40 isolados ambientais de NAG, quanto a presença destes marcadores (CTX Φ e VPI), encontraram 7,5% (3/40) das amostras positivas para três (*zot*, *ace* e *tcpA*) genes de ambos operons, sendo uma delas também positiva para *ctxA*. A detecção destes marcadores ou seus homólogos em isolados clínicos e ambientais de NAGs tem também sido realizada por outros grupos

(Mukhopadhyay *et al.*, 1996a; Ghosh *et al.*, 1997, Novais *et al.*, 1999, Chakraborty *et al.*, 2000; Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Faruque, *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2008). É possível que variações genéticas nas regiões de ancoramento dos iniciadores utilizados neste estudo tenham impedido sua amplificação.

A enterotoxina termo-estável (ST) tem sido identificada em pelo menos duas espécies do gênero *Vibrio* e em várias outras bactérias entéricas (Arita *et al.*, 1986; Yuan, *et al.*, 1994; Vicente *et al.*, 1997). *Vibrio mimicus* tem sido considerado como um reservatório do gene (*nag-st*) entre as espécies do gênero *Vibrio* (Yuan, *et al.*, 1994), chegando a 17% o percentual de detecção nesta espécie. Corroborando estes achados, a toxina termo-estável foi detectada em 17,8% (5/28) das cepas ambientais de *Vibrio mimicus* isoladas de água de praias no Pará (Sá *et al.*, 1999). No presente estudo, o gene desta toxina (ST), estava presente em 10 amostras ambientais de *Vibrio cholerae* NAG. O sequenciamento do gene presente nestes NAGs revelou diferenças em relação aquela encontrada nos *Vibrios mimicus* do Pará (Vicente A.C.P., dados não publicados) e uma maior identidade com a seqüência descrita para a toxina termo-estável (ST) de NAG (*stn*) (Arita *et al.*, 1986). Os NAGs *stn/sto* positivos foram isolados entre 1977 e 2004 de diferentes fontes e pertencentes a distintos *clusters*. Este padrão de dispersão seria indicativo da ligação deste gene a elementos genéticos móveis ou mobilizáveis. Mazel *et al.* (1998) sugeriu a associação do gene *stn* aos super integrons cromossomicos de *Vibrios*. Portanto este gene seria mobilizável como os cassetes gênicos dos integrons.

Historicamente, a capacidade de produzir hemólise em meio de cultura tem sido utilizada para distinguir entre os biotipos de *V.cholerae* O1 clássico e El Tor (Sakazaki, 1970, Kaper *et al.*, 1995, Sack *et al.*, 2004); entretanto, nem sempre esta característica correlaciona com o biótipo El Tor como já relatado (Barrette & Blake,

1981). Neste estudo, todos os isolados de *V.cholerae* O1 El Tor, exceto a amostra V.778 (Santa Rosa/AC-1993), foram positivos para o gene *hlyA*. A maioria dos NAGs, também foi positiva em uma alta taxa de 82,81%. A hemolisina (*hlyA*) produzida por NAGs é idêntica àquela produzida pelo biótipo El Tor (Yamamoto *et al.*, 1984) e sua participação como fator de virulência associado à diarreia, tem sido objeto de discussão entre vários grupos, sendo alguns a favor (Ichinose *et al.*, 1987; Alm *et al.*, 1991) e outros contra (Tikoo *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2001).

A distribuição dos principais fatores de virulência (CTXΦ e VPI) entre os sorogrupos de *V.cholerae* O1 e NAGs mostra uma clara relação com isolados do subgrupo B (Figura 7) onde se encontra a linhagem da sétima pandemia. A prevalência dos genes associados à virulência (*hlyA*, *hlyB*, *hlyC*, *rtxA*, *rtxC*) foi similar entre os sorogrupos (Tabela 4). Esta prevalência de genes acessórios de virulência em *V.cholerae* ambientais seria mais uma evidência do papel destes genes na adaptabilidade da espécie ao ambiente (Chiavelli *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2008).

Em relação aos isolados ambientais de *V.cholerae* O1 relacionados à linhagem da sétima pandemia (subgrupo B, Figura 7), observa-se uma expressiva perda de genes associados a virulência. Esta instabilidade pode indicar que a presença do CTXΦ e VPI diminuem a adaptabilidade desta linhagem a este ambiente, o que poderia explicar a não persistência da linhagem no ambiente, fora do período da epidemia de cólera, e não termos cólera endêmica na Amazônia brasileira.

5. CONCLUSÕES

- *V.cholerae* O1 e NAGs apresentam diversidade genética considerando tanto perfis genômicos quanto perfis de genes associados a virulência;
- Os NAGs apresentam maior diversidade genética do que os *V.cholerae* O1;
- A maioria dos isolados ambientais de *V.cholerae* O1 toxigênicos da Amazônia está relacionada a linhagem da sétima pandemia;
- É reduzida a adaptabilidade da linhagem da sétima pandemia aos ecossistemas aquáticos da Amazônia brasileira, já que isolados desta linhagem só foram obtidos no período da última epidemia de cólera na região e devido a constatação de que sofreram uma expressiva perda de genes;
- É alta a prevalência em *V.cholerae* ambiental dos genes *hlyA*, *hlyB*, *hlyC*, *rtxA*, *rtxC*, o que evidenciaria seu duplo papel: virulência e adaptabilidade;
- NAGs ambientais carreando genes de virulência reforça a hipótese de seu papel como reservatório e sua relevância na saúde pública;
- *Vibrio cholerae* é endêmico em ecossistemas aquáticos da Amazônia brasileira;
- Integrons de Classe 1, carreando distintos alelos do gene *aadA*, circulam entre NAGs na Amazônia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.M., KAWAGUCHI, F., SHIMAMOTO, T. Class 2 integrons in *Vibrio cholerae*. **Journal Medical Microbiology**, **55**:643-644, 2006.
- AHMED, A.M., NAKAGAWA, T., ARAKAWA, E., RAMAMURTHY, T., SHINODA, S., SHIMAMOTO, T. New aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Id*, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **53**:947–951. 2004.
- ALAM, M, SULTANA, M., NAIR, G.B., SACK, R.B., SACK, D.A., SIDDIQUE, A.K., ALI, A., HUQ, A., COLWELL, R.R. Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. **Applied and Environmental Microbiology**, **72**:2849-2855, 2006.
- 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., SIDDIQUE, A.K, ISLAM, M.S., FARUQUE, A.S., ANSARUZZAMAN, M., FARUQUE, S.M., SACK, R.B. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. **Lancet**, **341**:704, 1993.
- ALM, R.A., MANNING, P.A. Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup O1. **Journal of Clinical Microbiology**, **28**:823-824, 1990.

- ALM, R.A., MAYERHOFER, G., KOTLARSKI, I., MANNING, P.A. Aminoterminal domain of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 is expressed in classical strain and is cytotoxic. **Vaccine** **9**:588–594, 1991.
- ANSARUZZAMAN, M., BHUIYAN, N.A., NAIR, G.B., SACK, D.A., LUCAS, M., DEEN, J.L., AMPUERO, J., CHAIGNAT, C.L. The Mozambique Cholera Vaccine Demonstration Project Coordination Group. 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.
- 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.
- ARAKAWA, Y., MURAKAMI, M., SUZUKI, K., ITO, H., WACHAROTAYANKUN, R., OHSUKA, S., KATO, N., OHTA, M. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **39**:1612-1615, 1995.
- ARITA, M., TAKEDA, T.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Purification and characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable enterotoxin. **Infection and Immunity**, **52**:45-49, 1986.

- BAFFONE, W., TARSI, R., PANE, L., CAMPANA, R., REPETTO, B., MARIOTTINI, G.L., PRUZZO, C. Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. **Environmental Microbiology**, **8**:1299-1305, 2006.
- BAG, P.K., BHOWMIK, P., HAJRA T.K., RAMAMURTHY, T., SARKAR, P., MAJUMDER, M., CHOWDHURY, G., DAS, S.C. Putative Virulence Traits and Pathogenicity of *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 Isolates from Surface Waters in Kolkata, India. **Applied and Environmental Microbiology**, **74**: 5635–5644, 2008.
- BAGCHI, K., ECHEVERRIA, P., ARTHUR, J.D., SETHABUTR, O., SERICHANTALERGS, O., HOGE, C.W. Epidemic diarrhoea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 that produced heat-stable toxin among Khmers in a camp in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, **31**:1315–1317, 1993.
- BAKHSI, B, BARZELIGHI, H.M., ADABI, M., LARI, A.R., POURSHAFIE, M.R. A molecular survey on virulence associated genotypes of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* in aquatic environment of Tehran, Iran. **Water Research**, **43**:1441-1447, 2009.
- BAKHSI, B., BARZELIGHI, H.M, ADABI, M., LARI, A.R., POURSHAFIE, M.R. A molecular survey on virulence associated genotypes of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* in aquatic environment of Tehran, Iran. **Water Research**, **43**:1441-1447 2009.
- BAKHSI, B., POURSHAFIE, M.R. Assessing clonality of *Vibrio cholerae* strains isolated during four consecutive years (2004 - 2007) in Iran. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, **41**:256-62, 2009.

- BALODA, S.B., KROVACEK, K., ERICSSON, L., LINNE, T., MANSSON, I.
Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, **18**:17-26, 1995.
- BAPTISTA, M.A.S., ANDRADE, J.R.C., VICENTE, A.C.P., SALLES, C.A., COELHO, A. The Amazonia variant of *Vibrio cholerae*: Molecular identification and study of virulence genes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **93**:601-607, 1998.
- BARKER, A., CLARK, C.A., MANNING, P.A. Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. **Journal of Bacteriology**, **176**:5450-8, 1994.
- BARKER, A., MANNING, P.A. VlpA of *Vibrio cholerae* O1: the first bacterial member of the alpha 2-microglobulin lipocalin superfamily. **Microbiology**, **143**:1805-1813, 1997
- BARRETTE, T.J., BLAKE, P.A. Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seventh pandemic. **Journal of Clinical Microbiology**, **13**:126–129, 1981.
- BARUA, D. History of Cholera. In: **Cholera**. Barua, D. & Greenough III, W.B. (eds). New York , Plenum Medical, 1992. p.1-36.
- 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. 1, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, p. 518-538.

- BELTRAN, P., DELGADO, G., NAVARRO, A., TRUJILLO, F., SELANDER, R.K., CRAVIOTO, A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**:581–590. 1999.
- BELTRÃO, J.F. **Cólera, o Flagelo da Belém do Grão Pará**. Tese (Doutorado em História) – Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 246 p.
- BHATTACHARYA, S.K., BHATTACHARYA, M.K., RAMAMURTHY, T., PAL, A., BAG, P.K., TAKEDA, T., CHAKRABORTI, S., DUTTA, P., DEBNATH, A., PAL, S.C., NAIR, G.B. Acute secretory diarrhoea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 which does not produce cholera like and heat stable enterotoxins. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, **10**:161–163, 1992.
- BIK, E.M., BUNSCHOTEN, A.E., GOUW, R.D., MOOI, F.R. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. **The EMBO Journal**, **14**:209-216, 1995.
- BIK, E.M., GOUW, R.D., MOOI, F.R. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. **Journal of Clinical Microbiology**, **34**:1453–1461. 1996
- BLAKE, P. Historical Perspectives on Pandemic Cholera. In: ***Vibrio cholerae and Cholerae: Molecular to Global Perspectives***. Wachsmuth, I.K., Blake, P.A., Olsvik, Ø. (eds). Washington, D.C, American Society for Microbiology, 1994. p. 293-296.
- BLOKESCH, M., SCHOOLNIK, G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. **PLoS Pathogens**, **3**:81, 2007.
- BOYD, E.F., MOYER, K.E., SHI, L., WALDOR, M.K. Infectious CTXPhi and the vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent

- horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. **Infection and Immunity**, **68**: 1507-1513, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Cólera. In: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 6ª. ed. p.187-208.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica da Cólera**. Brasília-DF, 2008, 1ª. ed. 167p.
- BROCK, T.D., KOCH, R. **A life in Medicine and Bacteriology**. Washington, D.C., ASM Press., 1999. 349p.
- BROWN, R.C., TAYLOR, R.K. Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. **Molecular Microbiology**,**16**:425-439. 1995.
- BROZA, M., GANCZ, H., HALPERN, M., KASHI, Y. Adult non-biting midges: possible windborne carriers of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139. **Environmental Microbiology**, **7**:576-585, 2005.
- CAMERON, D.N., KHAMBATY, F.M., WACHSMUTH, I.K., 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., ZAHNER, V., AVELAR, K.E., ALVES, R.M., PEREIRA, D.S., VITAL, B.J., FREITAS, F.S., SALLES, C.A., KARAOLIS, D.K. Genetic diversity and antibiotic resistance of clinical and environmental *Vibrio cholerae* suggests that many serogroups are reservoirs of resistance. **Epidemiology and Infection**, **132**: 985-992. 2004.

- CASANOVA, T.B., PETERSON, K.M. The *Vibrio cholerae hlyC* gene encodes a protein that is related to lipases of *Pseudomonas* species. **DNA Sequence**, **5**:181–184, 1995.
- CHAKRABORTY, S., MUKHOPADHYAY, A.K., BHADRA, R.K., GHOSH, A.N., MITRA, R., SHIMADA, T., YAMASAKI, S., FARUQUE, S.M., TAKEDA, Y., COLWELL, R.R., NAIR, G.B. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**:4022-4028, 2000.
- 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.
- CHIAVELLI, D.A., MARSH, J.W., TAYLOR, R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, **67**:3220-3225, 2001.
- CHOKESAJJAWATEE, N., ZO, Y.G., COLWELL, R.R. Determination of clonality and relatedness of *Vibrio cholerae* isolates by genomic fingerprinting, using long-range repetitive element sequence-based PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, **74**:5392-5401, 2008.
- Cholera Working Group. International Center for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh. Large Epidemic of Cholera-Like Disease in Bangladesh Caused by *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **Lancet**, **342**:387-390, 1993.
- 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.
- CLARK, C.A., PURINS, L., KAEWRAGON, P., FOCARETA, T., MANNING, P.A. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. **Microbiology**, **146** :2605-2612, 2000.
- COELHO A., ANDRADE, J.R.C., VICENTE, A.C.P., SALLES, C.A. New variant of *Vibrio cholerae* O1 from clinical isolates in Amazonia. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**:114-118, 1995a.
- COELHO, A., ANDRADE, J., VICENTE, A., DIRITA, C.V. Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. **Infection and Immunity**, **68**:1700–1705, 2000.
- COELHO, A., VICENTE, A.C.P., BAPTISTA, M.A.S., MOMEN, H., SANTOS, F.A.R.W., SALLES, C.A. The distinction of pathogenic *Vibrio cholerae* groups using arbitrarily primed PCR fingerprints. **Research in Microbiology**, **146**:671-683, 1995b.
- COLLIS, C.M., GRAMMATICOPOULOS, G., BRITON, J., STOKES, H.W., HALL, R.M. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. **Molecular Microbiology**, **9**:41-52, 1993.

- COLLIS, C.M., KIM, M.J., PARTRIDGE, S.R., STOKES, H.W., HALL, R.M.
Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. **The Journal of Bacteriology**, **184**:3017-3026, 2002b.
- COLLIS, C.M., KIM, M.J., STOKES, H.W., HALL, R.M. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-bp site. **Molecular Microbiology**, **46**: 1415-1427, 2002a.
- COLLIS, C.M., RECCHIA, G.D., KIM, M.J., STOKES, H.W., HALL, R.M. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. **The Journal of Bacteriology**, **183**: 2535-2542, 2001.
- COLWELL, R.R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. **Science**, **274**:2025–2031, 1996.
- COLWELL, R.R., HUQ, A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In: ***Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives** Wachsmuth, I.K., Blake, P.A., Olsvik, Ø. (eds). Washington, D.C, American Society for Microbiology, 1994. p. 117–133.
- 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.
- COLWELL, R.R., SPIRA, W.M. The ecology of *Vibrio cholerae* In: **Cholera**. Barua, D. & Greenough III, W.B. (eds). New York, Plenum Medical, 1992. p.107-127.
- CONSTANTIN DE MAGNY, G., MURTUGUDDE, R., SAPIANO, M.R., NIZAM, A., BROWN, C.W., BUSALACCHI, A.J., YUNUS, M., NAIR, G.B., GIL, A.I., LANATA, C.F., CALKINS, J., MANNA, B., RAJENDRAN, K., BHATTACHARYA, M.K., HUQ, A., SACK, R.B., COLWELL, R.R.

- Environmental signatures associated with cholera epidemics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **105**:17676-17681, 2008.
- CORREIA, M., BOAVIDA, F., GROSSO, F., SALGADO, M.J., LITO, L.M., CRISTINO, J.M., MENDO, S., DUARTE, A. Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **47**:2838-2843, 2003.
- CROWLEY, D., CRYAN, B., LUCEY, B. First detection of a class 2 integron among clinical isolates of *Serratia marcescens*. **British Journal of Biomedical Science**, **65**:86-89, 2008.
- DAKIN, W.P., HOWELL, D.J., SUTTON, R.G., O'KEEFE, M.F., THOMAS, P. Gastroenteritis due to non-agglutinable (non-cholera) vibrios. **The Medical Journal of Australia**, **2**:487-490, 1974.
- DALSGAARD, A., ALBERT, M.J., TAYLOR, D.N., SHIMADA, T., MEZA, R., SERICHANTALERGS, O., ECHEVERRIA, 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., PETERSEN, A. Class 1 integron-borne, 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, 2000a.
- DALSGAARD, A., FORSLUND, A., SANDVANG, D., ARNTZEN, L., KEDDY, K. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *adaA2* gene located on

class 1 integrons. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **48**:827-838, 2001.

DALSGAARD, A., FORSLUND, A., SERICHANTALERGS, O., SANDVANG, D. Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **44**:1315-1321, 2000b.

DALSGAARD, A., FORSLUND, A., TAM, N.V., VINH, D.X., CAM, P.D. Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**: 734-741, 1999.

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.

DALSGAARD, A.; SERICHANTALERGS, O; PITARANGSI, C.; ECHEVERRIA, P. Molecular characterization and antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* non-O1. **Epidemiology and Infection**, **114**:51-63, 1995a.

DANIN-POLEG, Y., COHEN, L.A., GANCZ, H., BROZA, Y.Y., 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.

DATTA-ROY, K., BANERJEE, K., DE, S.P., GHOSE, A.C. Comparative study of expression of hemagglutinins, hemolysins, and enterotoxins by clinical and environmental isolates of non-O1 *Vibrio cholerae* in relation to their

- enteropathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, **52**:875-879, 1986.
- DAVIS, B.M., WALDOR, M.K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. **Current Opinion in Microbiology**, **6**: 35-42, 2003.
- DE LA CRUZ, F., DAVIES, J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. **Trends in Microbiology**, **8**:128-133, 2000.
- DOUBLET, B., WEILL, F.X., FABRE, L., CHASLUS-DANCLA, E., CLOECKAERT, A. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48**:3806-3812. 2004.
- EHARA, M., NGUYEN, B.M., NGUYEN, D.T., TOMA, C., HIGA, N., IWANAGA, M. Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam. **Epidemiology and Infection**, **132**: 595-600, 2004.
- EUZÉBY, J.P.M. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Disponível em:<<http://www.bacterio.cict.fr/classification.html>>. Acesso em: 27/08/2009.
- FALBO, V., CARATTOLI, A., TOSINI, F., PEZZELLA, 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.
- FARFÁN, M., MIÑANA, D., FUSTÉ, M.C., LORÉN, J.G. Genetic relationships between clinical and environmental *Vibrio cholerae* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis. **Microbiology**, **146**:2613-2626, 2000.

- FARFÁN, M., MIÑANA-GALBIS, D., FUSTÉ, M.C., LORÉN, J.G. Allelic diversity and population structure in *Vibrio cholerae* O139 Bengal based on nucleotide sequence analysis. **Journal of Bacteriology**, **184**(5):1304-1313, 2002.
- 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., ASADULGHANI, ALIM, A.R., ALBERT, M.J., ISLAM, K.M., MEKALANOS, J.J. Induction of the Lysogenic Phage Encoding Cholera Toxin in Naturally Occurring Strains of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Infection and Immunity**, **66**: 3752-3757, 1998.
- FARUQUE, S.M., CHOWDHURY, N., KAMRUZZAMAN, M., DZIEJMAN, M., RAHMAN, M.H., SACK, D.A., NAIR, G.B., MEKALANOS, J.J. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101**:2123-2128, 2004.
- FARUQUE, S.M., NASER, I.B., ISLAM, M.J., FARUQUE, A.S., GHOSH, A.N., NAIR, G.B., SACK, D.A., MEKALANOS, J.J. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **102**:1702-1707, 2005.
- FARUQUE, S.M., TAM, V.C., CHOWDHURY, N., DIRAPHAT, P., DZIEJMAN, M., HEIDELBERG, J.F., CLEMENS, J.D., MEKALANOS, J.J., NAIR, G.B. Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **104**:5151-6, 2007.

- 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, 1998a.
- FARUQUE, S.M., MEKALANOS, J.J. Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. **Trends in Microbiology**, **11**:505-510, 2003
- FASANO, A., BAUDRY, B., PUMPLIN, D.W., 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 Sciences of the United States 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., QIAN, W., LI, D., WANG, L. A recalibrated molecular clock and independent origins for the cholera pandemic clones. **PLoS One**, **3**:e4053. 2008.
- FIGUEROA-ARREDONDO, P., HEUSER, J.E., AKOPYANTS, N.S., MORISAKI, J.H., GIONO-CEREZO, S., ENRÍQUEZ-RINCÓN, F., BERG, D.E. Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. **Infection and Immunity**, **69**:1613-1624, 2001.
- FINKELSTEIN, R.A. Cholera Enterotoxin (Choleragen): A historical perspective. In: **Cholera**. Barua, D. & Greenough III, W.B. (eds). New York, Plenum Medical, 1992. p.155-187.
- FINKELSTEIN, R.A., BURKS, F., ZUPAN, A., DALLAS, W.S., JACOB, C.O., LUDWIG, D.S. Epitopes of the cholera family of enterotoxins. **Reviews of Infectious Disease**, **9**:544-561, 1987.

- FIGLIORE, A.E., MICHALSKI, J.M., RUSSELL, R.G., SEARS, C.L., KAPER, J.B. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **65**:3112-3117, 1997.
- FLUIT, A.C., SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, **10**:272-288, 2004.
- FONSECA, E.L., FREITAS, F.S., VIEIRA, V.V., VICENTE, A.C. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. **Emerging Infectious Disease**, **14**:1129-1131, 2008.
- FONSECA, E.L., VIEIRA, V.V., CIPRIANO, R., VICENTE, A.C. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **44**: 303-309, 2005.
- FRANZON, V.L., BARKER, A., MANNING, P.A. Nucleotide sequence encoding the mannose-fucose-resistant hemagglutinin of *Vibrio cholerae* O1 and construction of a mutant. **Infection and Immunity**, **61**:3032-3037, 1993.
- FREITAS, F.S., MOMEN, H., SALLES, C.A. The zimovar of *Vibrio cholerae*: multilocus enzyme electroforesis of *Vibrio cholerae*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**:511-516, 2002.
- FULLNER, K.J., MEKALANOS, J.J. In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. **The EMBO Journal**, **19**:5315-5323, 2000.
- GELBART, S.M., PRABHUDESAI, M.M. *Vibrio cholerae* non-O1 cellulitis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, **110**:1182-1183, 1986.
- GESTAL, A.M., STOKES, H.W., PARTRIDGE, S.R., HALL, R.M. Recombination between the *dfrA12-orfF-aadA2* Cassette Array and an *aadA1* Gene Cassette

- Creates a Hybrid Cassette, *aadA8b*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49**:4771–4774, 2005.
- GHOSH, C.; NANDY, R.K., DASGUPTA, S.K., NAIR, G.B., HALL, R.H., GHOSE, A.C. A search for cholera toxin (CT), toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element ToxR and other virulence factors in non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. **Microbial Pathogenesis**, **22**:199-208, 1997.
- GILLINGS, M.R., HOLLEY, M.P., STOKES, H.W. Evidence for dynamic exchange of *qac* gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, **296**:282-288, 2009.
- GIRLICH, D., POIREL, L., LEELAPORN, A., KARIM, A., TRIBUDDHARAT, C., FENNEWALD, M., NORDMANN, P. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, **39**:175-182, 2001.
- GOLDBERG, S.L., MURPHY, J.R. Molecular cloning of the hemolysin determinant from *Vibrio cholerae* El Tor. **The Journal of Bacteriology**, **160**:239-244, 1984.
- GONZALEZ, G., SOSSA, K., BELLO, H., DOMINGUEZ, M., MELLA, S., ZEMELMAN, R. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, **161**:125-128, 1998.
- 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. **FEMS Microbiology Letters**, **179**:401-407, 1999.

- GYOBU, Y., KODAMA, H., SATO, S. Studies on the enteropathogenic mechanism of non-O1 *Vibrio cholerae*. IV. Role of hemolysin. **Kansenshogaku Zasshi**, **65**:897-904, 1991a.
- GYOBU, Y., KODAMA, H., SATO, S. Studies on the enteropathogenic mechanism of non-O1 *Vibrio cholerae*. III. Production of enteroreactive toxins. **Kansenshogaku Zasshi**, **65**:781-787, 1991b.
- HAAL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, **41**:95-98, 1999.
- HALL, R.H., KHAMBATY, F.M., KOTHARY, M., KEASLER, S.P. Non-O:1 *Vibrio cholerae*. **Lancet**, **342**:430, 1993.
- HALL, R.M. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. **Ciba Foundation Symposium**, **207**:192-202; discussion 202-205. 1997.
- HALL, R.M., COLLIS, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Molecular Microbiology**, **15**:593-600, 1995.
- HALL, R.M., STOKES, H.W. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. **Genetica**, **90**:115-32, 1993.
- HANNE, L.F., FINKELSTEIN, R.A. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **36**:209-14, 1982.
- HANSSON, K., SUNDSTROM, L., PELLETIER, A., ROY, P.H. IntI2 integron integrase in Tn7. **The Journal of Bacteriology**, **184**: 1712-1721, 2002.

- HARDWICK, S.A., STOKES, H.W., FINDLAY, S., TAYLOR, M., GILLINGS, M.R. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. **FEMS Microbiology Letters**, **278**:207-212, 2008.
- HEIDELBERG, J.F., EISEN, J.A., NELSON, W.C., CLAYTON, R.A., GWINN, M.L., DODSON, R.J., HAFT, D.H., HICKEY, E.K., PETERSON, J.D., UMATHEVAN, L., GILL, S.R., NELSON, K.E., READ, T.D., TETTELIN, H., RICHARDSON, D., ERMOLAEVA, M.D., VAMATHEVAN, J., BASS, S., QIN, H., DRAGOI, I., SELLERS, P., MCDONALD, L., UTTERBACK, T., FLEISHMANN, R.D., NIERMAN, W.C., WHITE, O., SALZBERG, S.L., SMITH, H.O., COLWELL, R.R., MEKALANOS, J.J., VENTER, J.C., FRASER, C.M. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, **406**:477-483, 2000.
- HOCHHUT, B., WALDOR, M.K. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into prfC. **Molecular Microbiology**, **32**:99-110. 1999.
- HOFER, E.; FERNANDEZ, D. Incidência de *Vibrio cholerae* não O₁ em efluentes de estações de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Revista de Microbiologia**, **21**: 119-114, 1990.
- HOGUE, C.W., SETHABUTR, O., BODHIDATTA, L., ECHEVERRIA, P., ROBERTSON, D.C., MORRIS, J.G. Use of a synthetic oligonucleotide probe to detect strains of non-serovar O1 *Vibrio cholerae* carrying the gene for heat-stable enterotoxin (NAG-ST). **Journal of Clinical Microbiology**, **28**:1473-1476, 1990.
- HONDA, S., SHIMOIRISA, K., ADACHI, A., SAITO, K., ASANO, N., TANIGUCHI, T., HONDA, T., MIWATANI, T. Clinical isolates of *Vibrio cholerae* O1 not producing cholera toxin. **Lancet**, **2**:1486, 1988.

- HONDA, T., ARITA, M., TAKEDA, T., YOH, M., MIWATANI, T. Non-O1 *Vibrio cholerae* produces two newly identified toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Lancet**, **2**:163-164, 1985.
- HONDA, T., FINKELSTEIN, R. A. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. **Infection and Immunity**, **26**:1020-1027, 1979.
- HUGHES, J.M., HOLLIS, D.G., GANGAROSA, E.J., WEAVER, R.E. Non-cholera vibrio infections in the United States. Clinical, epidemiologic, and laboratory features. **Annals of Internal Medicine**, **88**:602-606, 1978.
- HUQ, A., COLWELL, R.R., RAHMAN, R., ALI, A., CHOWDHURY, M.A., PARVEEN, S., SACK, D.A., RUSSEK-COHEN, E. Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**:2370-2373, 1990.
- ICHINOSE, Y., YAMAMOTO, K.N., NAKASONE, M.J., TANABE, T. TAKEDA, T., MIWATANI, IWANAGA, M. Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **55**:1090-1093, 1987.
- IREDELL, J.R., MANNING, P.A. Biotype-specific tcpA genes in *Vibrio cholerae*. **FEMS Microbiology Letters**, **121**:47-54, 1994.
- ISLAM, M.S., DRASAR, B.S., SACK, R.B. The aquatic environment as a reservoir of *Vibrio cholerae*: a review. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, **11**:197-206. 1993.
- ISLAM, M.S., HASAN, M.K., MIAH, M.A., YUNUS, M., ZAMAN, K., ALBERT, M.J. Isolation of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal from the aquatic

- environment in Bangladesh: implications for disease transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**:1684-1686, 1994.
- ISLAM, M.S., TALUKDER, K.A., KHAN, N.H., MAHMUD, Z.H., RAHMAN, M.Z., NAIR, G.B, SIDDIQUE, A.K., YUNUS, M., SACK, D.A., SACK, R.B., HUQ, A., COLWELL, R.R. Variation of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Bangladesh and its correlation with the clinical strains. **Microbiology and Immunology**, **48**:773-777, 2004.
- ISSARTEL, J.P., KORONAKIS, V., HUGHES, C. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. **Nature**, **351**:759-761, 1991.
- IWANAGA, M., TOMA, C., MIYAZATO, T., INSISIENGMAY, S., NAKASONE, N., EHARA, M. Antibiotic resistance conferred by a class 1 integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48**: 2364–2369, 2004.
- JAIN, R., RIVERA, M.C., MOORE, J.E., LAKE, J.A. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. **Theoretical Population Biological**, **61**:489-495, 2002.
- JENSEN, M.A., FARUQUE, S.M., MEKALANOS, J.J., LEVIN, B.R. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103**:4652-4657, 2006.
- JIANG, S.C., LOUIS, V., CHOOPUN, N., SHARMA, A., HUQ, A., COLWELL, R.R. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay determined by amplified

- fragment length polymorphism fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**:140-147, 2000b.
- 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, 2000a.
- JOHNSON, G., HOMGREN, J., SVENERHOLM, A.M. Analysis of expression of toxin coregulated pili in classical and El Tor *Vibrio cholerae* O1 in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, **60**: 4278-4284, 1992.
- 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.
- KANG, J.H., LEE, J.H., PARK, J.H., HUH, S.H., KONG, I.S. Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1394**:85-89, 1998.
- KAPER, J., LOCKMAN, H., COLWELL, R.R., JOSEPH, S.W. Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. **Applied and Environmental Microbiology**, **37**:91-103. 1979
- KAPER, J.B., MOBLEY, H.L.T., MICHALSKI, J.M., HERRINGTON, D.A., LEVINE, M.M.. Recent advances in developing a safe and effective live oral attenuated *Vibrio cholerae* vaccine. In: **Advances in research on cholera and related diarrhoeas**. Ohtomo, N., Sack, R. B. (ed.). Tokio, KTK Scientific Publishers, 1989. p.161-167.

- KAPER, J.B., MORRIS, J.G., LEVINE, M.M. Cholera. **Clinical Microbiology Reviews**, **8**:48-86, 1995.
- KAPER, J.B., MOSELEY, S.L., FALKOW, S. Molecular characterization of environmental and nontoxigenic strains of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **32**:661-667, 1981.
- KARAOLIS, D.K., 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. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **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*. **The Journal of Bacteriology**, **177**:3191-3198, 1995.
- KARAOLIS, D.K.R., SOMARA, S., MANEVAL, D.R., JOHNSON, J.A., KAPER, J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. **Nature**, **399**:1-4, 1999.
- KAUFMAN, R.M., TAYLOR, R.K. The toxin co-regulated pilus: biogenesis and function. In: ***Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives** Wachsmuth, I.K., Blake, P.A., Olsvik, Ø. (eds). Washington, D.C, American Society for Microbiology, 1994p. 187-202.
- KEASLER, S.P., HALL, R.H. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. **Lancet**, **34**:1661, 1993.
- KEEN, M.F., BUJALSKI, L. The diagnosis and treatment of cholera. **The Nurse Practitioners**, **17**:53-56, 1992.

- KEYMER, D.P., MILLER, M.C., SCHOOLNIK, G.K., BOEHM, A.B. Genomic and phenotypic diversity of coastal *Vibrio cholerae* strains is linked to environmental factors. **Applied and Environmental Microbiology**, **73**:3705-3714, 2007.
- KIRN, T.J., JUDE, B.A., TAYLOR, R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. **Nature**, **438**:836-863, 2005.
- KIRN, T.J., LAFFERTY, M.J., SANDOE, C.M.P., TAYLOR, R.K. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, **35**:896-910, 2000.
- KONDO, S., KONGMUANG, U., KALNAUWAKUL, S., MATSUMOTO, C., CHEN, C.H, NISHIBUCHI, M. Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolated during the 1997-8 cholera epidemic in southern Thailand. **Epidemiology and Infection**, **127**:7-16, 2001.
- KOTETISHVILI, M., STINE, O.C., CHEN, Y., KREGER, A., SULAKVELIDZE, A., SOZHAMANNAN, S., MORRIS, J.G. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. **The Journal of Clinical Microbiology**, **41**:2191-2196, 2003.
- 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.
- LAINSON, Z.C.L., ABDON, N. P., PARDAUIL, C.R.B., PAES, A.L.V., QUEIROZ, B.H.S. Cólera. In: **Doenças infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico** Leão, R.N.Q., Bichara, C.N.C., Miranda, E.C.B.M., Carneiro, I.C.R.S, Oliveira, M.

- R. F., Abdon, N. P., Vasconcelos, P.F.C., Silva, B.M., Paes, A.L.V., Marsola, L.R.(orgs). Belém, Cejup, 1997. p. 449-468.
- LALLY, E.T., HILL, R.B., KIEBA, I.R., KOROSTOFF, J. The interaction between RTX toxins and target cells. **Trends Microbiology** **7**:356-361, 1999.
- LEAL, N.C., SOBREIRA, M., LEAL-BALBINO, T.C., ALMEIDA, A.M, SILVA, M.J., MELLO, D.M., SEKI, L.M., HOFER, E. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, **96**:447-454, 2004.
- LEVINE, M.M., BLACK, R.E., CLEMENTS, M.L., CISNEROS, L., SAAH, A., NALIN, D.R., GILL, D.M., CRAIG, J.P., YOUNG, C.R., RISTAINO, P. The pathogenicity of nonenterotoxigenic *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotype El Tor isolated from sewage water in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, **145**:296-299, 1982.
- LEVINE, M.M., KAPER, J.B., HERRINGTON, D., LOSONSKY, G., MORRIS, J.G., CLEMENTS, M.L., BLACK, R.E., TALL, B., HALL, R. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. **Infection and Immunity**, **56**:161-167, 1988.
- LEVINGS, R.S., PARTRIDGE, S.R., LIGHTFOOT, D., HALL, R.M., DJORDJEVIC, S.P. New Integron-Associated Gene Cassette Encoding a 3-*N*-Aminoglycoside Acetyltransferase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49**:1238-1241, 2005
- LI, M., SHIMADA, T., MORRIS JR, J.G., SULAKVELIDZE, A., SOZHAMANNAN, S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains

- with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. **Infection and Immunity**, **70**:2441-2453, 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. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**:1071-1076, 1999.
- LIPP, E.K., HUQ, A., COLWELL, R.R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. **Clinical Microbiology Reviews**, **15**:757-770, 2002.
- LIZÁRRAGA-PARTIDA, M.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**:1364-71, 2009.
- LOBITZ, B., BECK, L., HUQ, A., WOOD, B., FUCHS, G., FARUQUE, A.S., COLWELL, R.R. Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **97**:1438-1443, 2000.
- LOUREIRO, E.C.B., LINS, Z.C. Enteroinfecções bacterianas. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 Anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém, v. 2, 1986. p.765-775.
- 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.

- MAIDEN, M.C., BYGRAVES, J. A., FEIL, E., MORELLI, G., RUSSELL, J.E., URWIN, R., ZHANG, Q., ZHOU, J., ZURTH, K., CAUGANT, D. A., FEAVERS, I. M., ACHTMAN, M., SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **95**:3140–3145, 1998.
- MANNING, P.A. Surface-associated and soluble components of *Vibrio cholerae* involved in bacteria-host interactions. **Currents Topics of Microbiology and Immunology**, **192**:265-281, 1994.
- MANNING, P.A. The *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae*. **Gene**. **192**:63-70, 1997.
- MANNING, P.A., BROWN, M.H., HEUZENROEDER, M.W. Cloning of the structural gene (*hly*) for the haemolysin of *Vibrio cholerae* El Tor strain 017. **Gene**, **31**:231-255, 1984.
- MARTINS, M.T. Ecologia de *Vibrio cholerae* no ecossistema aquático. Tese (Livro docência) – São Paulo , Universidade de São Paulo,1988. 222 p.
- MARTINS, M.T., PESSOA, G.V.A., SANCHEZ, P.S., SATO, M.I.Z., COIMBRAO, C.A., MONTEIRO, C.K., MARQUES, E.K. Occurrence of *V. cholerae* 0:1 non toxigenic in wastewaters from São Paulo. **Water Science and Technology**, **24**: 363-366, 1991.
- MATSON, J.S., WITHEY, J.H., DIRITA, V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. **Infection and Immunity**, **75**:5542-5549, 2007.
- MAZEL, D., DAVIS, J. Antibiotic resistance in microbes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **56**:742–754, 1999.

- MAZEL, D., DYCHINCO, B., WEBB, V.A., DAVIES, J. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel *aad* Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **44**:1568–1574, 2000.
- MAZEL, D., DYCHINCO, B., WEBB, V.A., DAVIS, J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. **Science**, **280**: 605–608, 1998.
- MCCARDELL, B.A., MADDEN, J.M., SHAH, D.B. Isolation and characterization of a cytotoxin produced by *Vibrio cholerae* serogroup non-O1. **Canadian Journal of Microbiology**, **31**:711-720, 1985.
- MCIVER, C.J., WHITE, P.A., JONES, L.A., KARAGIANNIS, T., HARKNESS, J., MARRIOTT, D., RAWLINSON, W.D. Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:1538-1540. 2002.
- MEIBOM, K.L., BLOKESCH, M., DOLGANOV, N.A., WU, C.Y., SCHOOLNIK, G.K. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae* **Science**, **310**:1824-1827, 2005.
- MEKALANOS, J.J., SWARTZ, D.J., PEARSON, G.D.N., HARFORD, N., GROVNE, F., WILDE, M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. **Nature**, **306**: 551-557, 1983.
- 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.
- MICHAEL, G.B., CARDOSO, M., SCHWARZ, S. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **32**:120-129, 2008.

- MITRA, R, SAHA, P.K., BASU, I., VENKATARAMAN, A., RAMAKRISHNA, B.S., ALBERT, M.J., TAKEDA, Y., NAIR, G.B. Characterization of non-membrane-damaging cytotoxin of non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and its relevance to disease. **FEMS Microbiology Letters**, **169**:331-339, 1998.
- MONTECUCCO, C., RAPPUOLI, R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, **2**:457-466, 2001.
- MOOI, F.R., BIK, E.M. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. **Trends Microbiology**, **5**:161-165, 1997.
- MORRIS, J.G, BLACK, R.E. Cholera and other vibrioses in the United States. **The New England Journal of Medicine**, **312**:343-350, 1985.
- MORRIS, J.G, TAKEDA, T., TALL, B.D., LOSONSKY, G.A, BHATTACHARYA, S.K., FORREST, B.D., KAY, B.A., NISHIBUCHI, M. Experimental non-O1 group *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans. **The Journal of Clinical Investigation**, **85**:697-705, 1990.
- MOYENUDDIN, M., WACHSMUTH, K., RICHARDSON, S.H., COOK, W.L. Enteropathogenicity of non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 for adult mice. **Microbial Pathogenesis**, **12**:451-458, 1992.
- MUKHOPADHYAY, A.K., SAHA, P.K., GARG, S., BHATTACHARYA, S.K., SHIMADA, T., TAKEDA, T., TAKEDA, Y., NAIR, G.B. Distribution and virulence of *Vibrio cholerae* belonging to serogroups other than O1 and O139: a nation wide survey. **Epidemiology and Infection**, **114**: 65-70, 1995.
- MUKHOPADHYAY, A.K., CHAKRABORTY, S., TAKEDA, Y., NAIR, G. B., BERG, D.E. Characterization of VPI Pathogenicity Island and CTXf Prophage in

Environmental Strains of *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, **183**:4737–4746, 2001.

MUKHOPADHYAY, A.K.; GARG, S., MITRA, R., BASU, A., RAJENDRAN, K., DUTTA, D., BHATTACHARYA, S.K., SHIMADA, T., TAKEDA, T., TAKEDA, Y., NAIR, G.B. Temporal shifts in traits of *Vibrio cholerae* strains isolated from hospitalized patients in Calcuta: a 3-year (1993 to 1995) analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, **34**:2537-2543, 1996a.

MUKHOPADHYAY, S., GHOSH, C., GHOSE, A.C. Phenotypic expression of a mannose-sensitive hemagglutinin by a *Vibrio cholerae* O1 El Tor strain and evaluation of its role in intestinal adherence and colonization. **FEMS Microbiology Letters**, **138**:227-232, 1996b.

NAIR GB, QADRI F, HOLMGREN J, SVENNERHOLM AM, SAFA A, BHUIYAN NA, AHMAD, Q.S., FARUQUE, S.M., FARUQUE A. S. G., TAKEDA, Y., SACK, D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**:4211-4213, 2006.

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.

NAIR, G.B., RAMAMURTHY, T., BHATTACHARYA, S.K., MUKHOPADHYAY, A.K., GARG, S., BHATTACHARYA, M.K., TAKEDA, T., SHIMADA, T., TAKEDA, Y., DEB, B.C. Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. **The Journal of Infectious Disease**, **169**:1029–1034, 1994.

- NANDI, B., NANDY, R.K., VICENTE, A.C., GHOSE, A.C. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic non-O1/Non-O139 strain of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **68**:948-952, 2000.
- NANDY, R.K., SENGUPTA, T.K., MUKHOPADHYAY, S., GHOSE, A.C. A comparative study of the properties of *Vibrio cholerae* O139, O1 and other non-O1 strains. **Journal Medical Microbiology**, **42**:251-257, 1995.
- NITRINI, D.R., PEDROSA, F.A., PESSOA, M.C., VERONESI, R. Cólera. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R. & Focaccia, R. (eds). São Paulo, Editora Atheneu, 2002. p.607-624.
- NOVAIS, R.C., COELHO, A., SALLES, C.A., VICENTE, A.C.P. Toxin-co-regulated pilus cluster in non-O1, non-toxigenic *Vibrio cholerae*: evidence of a third allele of pilin gene. **FEMS Microbiology Letters**, **171**:49-55, 1999.
- O'SHEA, Y. A., REEN, F.J., QUIRKE, A.M., BOYD, E.F. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**:4657-4671. 2004
- O'BRIEN, A.D., CHEN, M.E., HOLMES, R.K., KAPER, J., LEVINE, M.M. Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. **Lancet**, **1**:77-78, 1984.
- OCHMAN, H., LAWRENCE, J.G., GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, **405**:299-304, 2000.
- OGAWA, A., KATO, J., WATANABE, .H, NAIR, B.G., TAKEDA, T. Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1

isolated from a patient with traveler's diarrhea. **Infection and Immunity**, **58**:3325-3329, 1990.

OGIERMAN, M.A., FALLARINO, A., RIESS, T., WILLIAMS, S.G., ATTRIDGE, S.R., MANNING, P.A. Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon lipAB and a protease gene downstream of the hly region. **The Journal of Bacteriology**, **179**:7072-7080, 1997.

OGIERMAN, M.A., ZABIHI, S., MOURTZIOS, L., MANNING, P.A. Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the tcp gene cluster of *Vibrio cholerae*. **Gene**, **126**:51-60, 1993.

OLSVIK, O., WAHLBERG, J., PETTERSON, B., UHLÉN, M., POPOVIC, T., WACHSMUTH, I.K., FIELDS, P.I. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, **31**: 22-5, 1993.

OPINTAN, J.A., NEWMAN, M.J., NSIAH-POODOH, O.A., OKEKE, I.N. *Vibrio cholerae* O1 from Accra, Ghana carrying a class 2 integron and the SXT element. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **62**:929-933, 2008.

ORMAN, B.E., PIÑEIRO, S.A., ARDUINO, S., GALAS, M., MELANO, R., CAFFER, M.I., SORDELLI, D.O., CENTRÓN, D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46**:3963-3970, 2002.

PAHO-Pan American Health Organization, Cholera, Situation in the Americas: an update. **Epidemiology Bulletin**, **12**:11, 1991.

- PAL, A., RAMAMURTHY, T., BHADRA, R.K., TAKEDA, T., SHIMADA, T., TAKEDA, Y., NAIR, G.B., PAL, S.C., CHAKRABARTI, S. Reassessment of the prevalence of heat-stable enterotoxin (NAG-ST) among environmental *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from Calcutta, India, by using a NAG-ST DNA probe. **Applied and Environmental Microbiology**, **58**:2485-2489, 1992.
- PAL, A., SAHA, P.K., NAIR, G.B., YAMASAKI, S., TAKEDA, T., TAKEDA, Y., BHATTACHARYA, S.K., RAMAMURTHY, T. Clonal analysis of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 associated with an outbreak of cholera. **Indian Journal of Medical Research**, **109**:208–211, 1999.
- 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. **The Journal of Bacteriology**, **189**:4837-4849, 2007.
- PARSOT, C., TAXMAN, E., MEKALANOS, J.J. ToxR regulates the production of lipoproteins and the expression of serum resistance in *Vibrio cholerae*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **88**:1641-1645, 1991.
- PEARSON, G.D., WOODS, A., CHIANG, S.L., MEKALANOS, J.J. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90**:3750-3754, 1993.
- PETERSON, J.W., OCHOA, L.G. Role of prostaglandins and CAMP in the secretory effects of cholera toxin. **Science**, **245**:857-859, 1989.

- 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.
- POPOVIC, T., FIELDS, P.I., OLSVIK, O., WELLS, J.G., EVINS, G.M., CAMERON, D.N, FARMER, J.J., BOPP, C.A., WACHSMUTH, K., SACK, R.B., ALBERT, M. J., NAIR, G.B., SHIMADA, T., FEELEY, J.C. Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. **The Journal of Infectious Diseases**, **171**:122-127, 1995.
- PRUZZO, C., GALLO, G., CANESI, L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. **Environmental Microbiology**, **7**:761-772, 2005b.
- PRUZZO, C., HUQ, A., COLWELL, R.R, DONELLI, G. Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment. In: **Ocean and Health Pathogens in the Marine Environment**. Belkin S., Colwell, R.R. S.I. (eds), Springer Verlag, 2005a. p.217-252.
- PRUZZO, C., VEZZULLI, L., COLWELL, R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. **Environmental Microbiology**, **10**:1400-1410, 2008.
- RADER, A.E., MURPHY, J.R. Nucleotide sequences and comparison of the hemolysin determinants of *Vibrio cholerae* El Tor RV79(Hly+) and RV79(Hly-) and classical 569B(Hly-). **Infection and Immunity**, **56**:1414-9, 1988.
- RADSTRÖM, P., SKÖLD, O., SWEDBERG, G., FLENSBURG, J., ROY, P.H., SUNDSTRÖM, L. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. **The Journal of Bacteriology**, **176**:3257-3268, 1994.

- RAHMAN, M.H., BISWAS, K., HOSSAIN, M.A., SACK, R.B., MEKALANOS, J.J., FARUQUE, S.M. Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholera* population in a cholera endemic area: tracking the evolution of pathogenic strains. **Dna and Cell Biology**, **27**:347-355, 2008.
- RAMAMURTHY, T., BAG, P.K., PAL, A., BHATTACHARYA, S.K., BHATTACHARYA, M.K., SEN, D., SHIMADA, T., TAKEDA, T., NAIR, G.B. Virulence patterns of *V. cholerae* Non-O1 isolated from hospitalized patients with acute diarrhea in Calcutta, India. **Journal Medical Microbiology**, **39**:310-317, 1993.
- RAMOS, F.L.P., LAINSON, Z.C.L., SILVA, E.L., PROIETE JÚNIOR, A.A., MARECO, M.L., LAMARÃO, M.L.N. Cholera in Noerth Brasil: on the Occurrence of strains of *Vibrio cholerae* O1 wich fail to Ferment Sucrose During Routine Plating on Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar (TCBS). A New Problem in Diagnosis and Control? **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, **39**:141-144, 1997.
- RASKIN, D., BINA, J., MEKALANOS, J. Genomic and genetic analysis of *Vibrio cholerae*. **ASM News**, **70**:57-62, 2004.
- RAVEL, J., KNIGHT, I.T., MONAHAN, C.E., HILL, R.T., COLWELL, R.R.. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? **Microbiology**, **141**:377-383, 1995.
- RAWLINGS, T.K., RUIZ, G.M., COLWELL, R.R. Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the Copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **73**:7926-7933, 2007.

- RAYCHOUDHURI, A., MUKHOPADHYAY, A.K., RAMAMURTHY, T., NANDY, R.K., TAKEDA, Y., OSHIFUMI, NAIR, G.B. Biotyping of *Vibrio cholerae* O1: Time to redefine the scheme. **The Indian Journal of Medical Research**, **128**:695-698, 2008.
- RAYCHOUDHURI, A., TAPAS, P., KAUSIK, G., THANDAVARAYAN, R., NANDY, R.K., TAKEDA, Y., NAIR, G. B., MUKHOPADHYAY, A.K. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, Índia. **Emerging Infectious Diseases**, **15**:131-132, 2009.
- RECCHIA, G.D., HALL, R.M. Gene cassettes: a new class of mobile element. **Microbiology**, **141**:3015–3027, 1995b.
- RECCHIA, G.D., HALL, R.M. Oringins of the mobile gene cassettes found in integrons. **Trends in Microbiology**, **5**:389-394, 1997.
- RECCHIA, G.D., HALL, R.M. Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the *incQ* plasmid RSF1010. **Molecular Microbiology**, **15**:179-187, 1995a.
- RECCHIA, G.D., STOKES, H.W., HALL, R.M. Characterization of specific and secondary recombination sites recognized by the integron DNA integrase. **Nucleic Acids Research**, **22**:2071-2078, 1994.
- REGUERA, G., KOLTER, R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. **Journal of Bacteriology**, **187**:3551-3555, 2005.

- RIVERA, I.N., CHUN, J., HUQ, A., SACK, R.B., COLWELL, R.R. Genotypes associated virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, **67**:2419-2421, 2001.
- RIVERA, I.N., LIPP, E.K., CHOOPUN, N., GIL, A., HUQ, A., COLWELL, R.R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environmental Microbiology**, **5**:599-606, 2003.
- RODRIGUE, D.C., POPOVIC, T., WACHSMUTH, K.I. Non toxigenic *Vibrio cholerae* O1 infections in the United States. In: ***Vibrio cholerae* and Cholerae: Molecular to Global Perspectives**. Wachsmuth, I.K., Blake, P.A., Olsvik, Ø. (eds). Washington, D.C, American Society for Microbiology, 1994. p. 69–76.
- ROSSER, S.J., YOUNG, H.K. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **44**:11-188, 1999.
- ROWE-MAGNUS, D.A., GUEROUT, A.M., MAZEL, D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. **Molecular Microbiology**, **43**: 1657-1669, 2002.
- ROWE-MAGNUS, D.A., GUEROUT, A.M., PLONCARD, P., DYCHINCO, B., DAVIES, J., MAZEL, D. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrons. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **98**:652–657, 2001.
- ROWE-MAGNUS, D.A., MAZEL, D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. **Current Opinion in Microbiology**, **4**:565-569, 2001.

- ROWE-MAGNUS, D.A., MAZEL, D. Resistance gene capture. **Current Opinion in Microbiology**, **2**:483-488, 1999.
- 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.
- RUBIN, E.J., LIN, W., MEKALANOS, J.J., WALDOR, M.K. Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. **Molecular Microbiology**, **28**:1247-1254. 1998.
- RUSSEL, R.G., TALL, B.D., MORRIS, J.G. Non-O1 *Vibrio cholerae* intestinal pathology and invasion in removable intestinal tie adult rabbit diarrhea model. **Infection and Immunity**, **60**:435-442, 1992.
- SÁ, L.L.C.; VALE, E.R.; LOUEIRO, E.C.B.; TEIXEIRA, L.F.M.; VICENTE, A.C.P. Ocorrência de *Vibrio mimicus* carreadores da toxina termo-estável (ST) em águas de praias, Belém-Pará. **IXX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Livro de Resumos**, p.205. MB-131, Salvador, 1999.
- SÁ, L.L.C.; VALE, E.R.; SANTOS, E.C.O., 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 a 2006. **Cadernos de Saúde Coletiva**, **15** (4): 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., BHUIYAN, N.A., MURPHY, D., BATES, J., NUSRIN, S., KONG, R.Y., CHONGSANGUAN, M., CHAICUMPA, W., NAIR, G.B. Multilocus genetic analysis reveals that the Australian strains of *Vibrio cholerae* O1 are similar to the pre-seventh pandemic strains of the El Tor biotype. **Journal Medical Microbiology**, **58**:105-111, 2009.
- SAFRIN, S., MORRIS, J.G, ADAMS, M., PONS, V., JACOBS, R., CONTE, J.E., Non O:1 *Vibrio cholerae* bacteremia: case report and review. **Reviews of Infectious Diseases**, **10**:1012-1017, 1988.
- 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.
- SAKAZAKI, R. Classification and characteristics of vibrios. **Public Health Papers**, **40**:33-37, 1970.
- SALLES, C.A., MOMEN, H., COELHO, A.M., OLIVEIRA, E.F., VICENTE, A.C., NAIR, G.B. Bengal: El Tor cholera vibrio in a new robe. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, **89**:115-116, 1994.
- SENDA, K., ARAKAWA, Y., ICHIYAMA, S., NAKASHIMA, K., ITO, H., OHSUKA, S., SHIMOKATA, K., KATO, N., OHTA, M. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. **Journal of Clinical Microbiology**, **34**:2909-2913, 1996.

- SHARMA, C., THUNGAPATHRA, M., GHOSH, A., MUKHOPADHYAY, A., BASU, A., MITRA, R., BASU, I., BHATTACHARYA, S.T., RAMAMURTHY, T., TAKEDA, T., YAMASAKI, S., TAKEDA, Y., NAIR, B. 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.
- SHEARS, P. Cholera. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 88:109-122, 1994.
- SHI, L., FUJIHARA, K., SATO, T., ITO, H., GARG, P., CHAKRABARTY, .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 Medical Microbiology**, **55**:575-583, 2006.
- SHI, L., MIYOSHI, S., HIURA, M., TOMOCHIKA, K., SHIMADA, T., SHINODA, S. Detection of genes encoding cholera toxin (CT), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE) and heat-stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains. **Microbiology and Immunology**, **42**:823-828, 1998.
- SHIBATA, N., DOI, Y., YAMANE, K., YAGI, T., KUROKAWA, H., SHIBAYAMA, K., KATO, H., KAI, K., ARAKAWA, Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**:5407-5413, 2003.
- SHINODA, S. Protein toxins produced by pathogenic vibrios. **Journal of Natural Toxins**, **8**:259-269, 1999.

- SINGH, D.V., MATTE, M.H., MATTE, G.R., JIANG, S., SABEENA, F., SHUKLA, B.N., SANYAL, S.C., HUQ, A., 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.
- SINGH, D.V., SHUKLA, B.N., SANYAL, S.C. Haemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 is not enterotoxic. **Journal Medical Microbiology**, **45**:35-39, 1996.
- SNOW, J. **Sobre a Maneira de Transmissão do Cólera**. 2.ed. brasileira. São Paulo: Hucitec, Rio de Janeiro: Abrasco, 1999. 250p.
- SOMERVILLE, G.A., BERES, S.B., FITZGERALD, J.R., DELEO, F.R., COLE, R.L., HOFF, J.S., MUSSER, J.M. In Vitro Serial Passage of *Staphylococcus aureus*: Changes in Physiology, Virulence Factor Production, and *agr* Nucleotide Sequence. **Journal of Bacteriology**, **184**:1430–1437, 2002.
- SPIRA, W.M., FEDORKA-CRAY, P.J. Production of cholera toxin-like toxin by *Vibrio mimicus* and non-o1 *Vibrio cholerae*: batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypervirulent lincomycin-resistant mutants. **Infection and Immunity**, **42**:501-509, 1983.
- STANLEY, P., PACKMAN, L.C., KORONAKIS, V., HUGHES, C. Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. **Science**, **266**:1992-1996, 1994.
- STOKES, H.W., HALL, R.M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, **3**:1669-1683, 1989.

- TAPCHAISRI, P., NA-UBOL, M., TIYASUTTIPAN, W., CHAIYAROJ, S.C., YAMASAKI, S., WONGSAROJ, T., HAYASHI, H., NAIR, G.B., CHONGSANGUAN, M., KURAZONO, H., CHAICUMPA, W. Molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Health and Population Nutrition**, **26**:79-87, 2008.
- TAUXE, R., SEMINARIO, L., TAPIA, R., LIBEL, M. The Latin American cholera epidemic. In: *Vibrio cholerae and Cholerae: Molecular to Global Perspectives*. Wachsmuth, I.K., Blake, P.A., Olsvik, Ø. (eds). Washington, D.C, American Society for Microbiology, 1994. p.321-344.
- 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.
- THOMPSON, F.L., IIDA, T., SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **68**:403-431, 2004.
- THOMPSON, F.L., THOMPSON, C.C., VICENTE, A.C.P., THEOPHILO, G.N.D., HOFER, E., SWINGS, J. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 1946-1950, 2003.
- THUNGAPATHRA, M., AMITA, SINHA, K.K., CHAUDHURI, S.R., GARG, P., RAMAMURTHY, T., NAIR, G.B., GHOSH, A. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac(69)-Ib, dfrA5, dfrA12, and ereA2 in class I integrons in non-O1,

- non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46**:2948-2955, 2002.
- TIKOO, A., SINGH, D.V., SANYAL, S.C. Influence of animal passage on haemolysin and enterotoxin production in *Vibrio cholerae* O1 biotype E1 Tor strains. **Journal of Medical Microbiology**, **40**:246–251, 1994.
- TOLEDO, L.M. O Cólera nas Américas e sua Produção no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, **2**:7-35, 1993.
- TRUCKSIS, M., GALEN, J.E., MICHALSKI, J., FASANO, A., KAPER, J.B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90**:5267-5571, 1993.
- VEZZULLI, L., GUZMÁN, C.A., COLWELL, R.R., PRUZZO, C. Dual role colonization factors connecting *Vibrio cholerae*'s lifestyles in human and aquatic environments open new perspectives for combating infectious diseases. **Current Opinion in Biotechnology**, **19**: 254-259, 2008.
- VIANA, A. **O Cólera-Morbus**. Belém: Editora Universitária da UFPA, 1992. 71 p.
- VICENTE, A.C.P., COELHO, A.M., SALLES, C.A. *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

- epidemiology of cholera in Latin America. **The Journal of Infectious Disease**, **167**:621-626, 1993.
- WALDOR, M.K., COLWELL, R.R., MEKALANOS, J.J. The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **91**:11388-11392, 1994.
- WALDOR, M.K., MEKALANOS, J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**:1910–1914, 1996
- WALDOR, M.K., MEKALANOS, J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**:1910-1914, 1996.
- WALDOR, M.K., RUBIN, E.J., PEARSON, G.D., KIMSEY, H., MEKALANOS, J.J. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXphi are encoded by region RS2. **Molecular Microbiology**, **24**:917-926, 1997.
- WELCH, R.A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. **Current Topics Microbiology and Immunology**, **257**:85-111, 2001.
- WILLIAMS, S.G., ATTRIDGE, S.R., MANNING, P. The transcriptional activator HlyU of *Vibrio cholerae*: nucleotide sequence and role in virulence gene expression. **Molecular Microbiology**, **9**:751–760, 1993.
- WILSON, B.A., SALYERS, A.A. Is the evolution of bacterial pathogens an out-of-body experience? **Trends Microbiology**, **11**:347-350, 2003.
- WINN JR, W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. Bacilos Gram-negativos curvos e fermentadores oxidase-positivos: *Campylobacteraceae* e *Vibrionaceae*, parte II: As

- famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae*. In: **Koneman, Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro, 2008. p.403-422.
- WORDEN, A.Z., SEIDEL, M., SMRIGA, S., WICK, A., MALFATTI, F., BARTLETT, D., AZAM, F. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. **Environmental Microbiology**, **8**:21-29, 2006.
- XIE, Z.Y., HU, C.Q., CHEN, C., ZHANG, L.P., REN, C.H. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. **Letters in Applied Microbiology**, **41**:202-207, 2005.
- YAMAICHI, Y., IIDA, T., PARK, K.S., YAMAMOTO, K., HONDA, T. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. **Molecular Microbiology**, **31**:1513-1521, 1999.
- YAMAMOTO, K., AL-OMANI, M., HONDA, T., TAKEDA, Y., MIWATANI, T. Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. **Infection and Immunity**, **45**:192-196, 1984.
- YAMAMOTO, K., ICHINOSE, Y., NAKASONE, N., TANABE, M., NAGAHAMA, M., SAKURAI, J., IWANAGA, M. Identity of hemolysins produced by *Vibrio cholerae* non-O1 and *V. cholerae* O1 biotype El Tor. **Infection and Immunity**, **51**:927-931, 1986.
- YAMAMOTO, K., TAKEDA, Y., MIWATANI, T., CRAIG, J.P. Evidence that a non-O1 *Vibrio cholerae* produces enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. **Infection and Immunity**, **41**:896-901, 1983.

- YILDIZ, F.H., SCHOOLNIK, G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**:4028-4033, 1999.
- YUAN, P., OGAWA, A., RAMAMURTYH, T. *Vibrio mimicus* are the reservoirs of the heat-stable enterotoxin gene (*nag-st*) among species of the genus *Vibrio*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, **10**:59-63, 1994.
- ZAMPINI, M., PRUZZO, C., BONDRE, V.P., TARSI, R., COSMO, M., BACCIAGLIA, A., CHHABRA, A., SRIVASTAVA, R., SRIVASTAVA, B.S. *Vibrio cholerae* persistence in aquatic environments and colonization of intestinal cells: involvement of a common adhesion mechanism. **FEMS Microbiology Letters**, **244**:267-273, 2005.
- ZHOU, H.J., DIAO, B.W., CUI, Z.G., PANG, B., ZHANG, L.J., KAN, B. Comparison of automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subtyping of *Vibrio cholerae*. **Letters in Applied Microbiology**, **48**:726-731, 2009.
- ZINNAKA, Y., CARPENTER, C.C. An enterotoxin produced by noncholera vibrios. **Johns Hopkins Medical Journal**, **131**:403-411, 1972.
- ZITZER, A., WASSENAAR, T., WALEV, I., BHAKDI, S. Potent membrane permeabilizing and cytotoxic action of *V. cholerae* cytolysin on human intestinal cells. **Infection and Immunity**, **65**:1293–1298, 1997.
- ZITZER, A.O, NAKISBEKOV, N.O., LI, A.V., SEMIOTROCHEV, V.L., KISELIOV, Y.U.L., MURATKHODJAEV, J.N., KRASILNIKOV, O.V., EZEPCHUK, Y.U.V. Entero-cytolysin (EC) from *Vibrio cholerae* non-O1 (some properties and pore-

forming activity). **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, **279**:494-504, 1993.

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 1

N	REG.	LOCAL	DATA	ORIGEM	<i>V.cholerae</i>
1	V.408	ICOARACI-PA	25.08.92	Água de Igarapé	NAG
2	V.409	ICOARACI-PA	25.08.92	Água de Igarapé	NAG
3	V.410	ICOARACI-PA	25.08.92	Água de Igarapé	NAG
4	V.411	ICOARACI-PA	25.08.92	Água de Igarapé	NAG
5	V.412	BELÉM-PA	31.03.93	Água de Esgoto	O:1
6	V.420	BELÉM-PA	24.01.94	Água de Esgoto	NAG
7	V.423	BELÉM-PA	14.03.94	Baia do Guajará	NAG
8	V.428	BELÉM-PA	06.06.94	Igarapé Tucunduba	NAG
9	V.452	BARCARENA-PA	03.04.95	Água de Rio	NAG
10	V.454	BARCARENA-PA	03.04.95	Água de Rio	NAG
11	V.457	BELÉM-PA	21.02.95	Água de Esgoto	NAG
12	V.463	BELÉM-PA	22.04.96	Igarapé Tucunduba	NAG
13	V.465	BELÉM-PA	29.04.96	Rio Guamá	NAG
14	V.472	BELÉM-PA	09.12.96	Rio Guamá	NAG
15	V.482	BELÉM-PA	14.04.94	Água de Esgoto	O:1
16	V.485	BELÉM-PA	14.04.94	Água de Esgoto	O:1
17	V. 490	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
18	V.491	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
19	V.492	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
20	V.493	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
21	V.494	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
22	V.495	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
23	V.496	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
24	V.497	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
25	V.498	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
26	V.499	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
27	V.500	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
28	V.501	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
29	V.502	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
30	V.503	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
31	V.504	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
32	V.505	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
33	V.506	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
34	V.517	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
35	V.518	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
36	V.519	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
37	V.520	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
38	V.521	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
39	V.522	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
40	V.524	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
41	V.525	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
42	V.526	BELÉM-PA	1978	Água de Esgoto	NAG
43	V.528	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
44	V.529	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
45	V.530	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
46	V.531	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
47	V.532	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
48	V.539	BELÉM-PA	1981	Água de Esgoto	NAG
49	V.540	BELÉM-PA	1981	Água de Esgoto	NAG
50	V.541	BELÉM-PA	1981	Água de Esgoto	NAG

51	V.542	BELÉM-PA	1981	Água de Esgoto	NAG
52	V.543	BELÉM-PA	22.03.94	Água de Esgoto	O:1
53	V.548	BELÉM-PA	22.03.94	Água de Esgoto	O:1
54	V.595	BELÉM-PA	09.12.91	Baia do Guajará	O:1
55	V.613	MACAPÁ-AP	13.12.91	Rio Amazonas	O:1
56	V.621	BARCARENA-PA	18.12.91	Água Porto Balsa	O:1
57	V.725	BELÉM-PA	01.05.92	Baia do Guajará	O:1
58	V.729	MOSQUEIRO-PA	26.08.92	Praia Baia do Sol	O:1
59	V.733	TABATINGA-AM	23.11.92	Rio Solimões	O:1
60	V.734	TABATINGA-AM	23.11.92	Rio Solimões	O:1
61	V.735	TABATINGA-AM	23.11.92	Rio Solimões	O:1
62	V.736	TABATINGA-AM	23.11.92	Rio Solimões	O:1
63	V.737	TABATINGA-AM	23.11.92	Rio Solimões	O:1
64	V.773	BELÉM-PA	09.02.93	Rio Guamá	NAG
65	V.778	STA ROSA-AC	29.07.93	Rio Purús	O:1
66	V.780	RIO BRANCO-AC	29.09.93	Rio Acre	O:1
67	V.793	MACAPÁ-AP	12.07.94	Igarapé Pedrinhas	NAG
68	V.794	OIAPOQUE-AP	16.08.94	Rio Oiapoque	O:1
69	V.796	OIAPOQUE-AP	23.08.94	Rio Oiapoque	NAG
70	V.797	MACAPÁ-AP	23.08.94	Canal P.Socorro	NAG
71	V.798	MACAPÁ-AP	19.08.94	Balneário Araxá	NAG
72	V.799	MACAPÁ-AP	19.08.94	Balneário Araxá	NAG
73	V.800	MACAPÁ-AP	26.08.94	Canal Jandiá	NAG
74	V.802	MACAPÁ-AP	20.09.94	Igarapé Fortaleza	NAG
75	V.803	SANTANA-AP	02.09.94	Porto Santana	NAG
76	V.874	MARUDÁ-PA	23.03.97	Copepodo	NAG
77	V.877	MARUDÁ-PA	23.03.97	Copepodo	NAG
78	V.907	BELÉM-PA	04.05.98	Igarapé Tucunduba	NAG
79	V.913	BELÉM-PA	08.06.98	Rio Guamá	NAG
80	V.916	BELÉM-PA	08.06.98	Rio Guamá	NAG
81	V.946	MOSQUEIRO-PA	28.07.97	Praia 3	NAG
82	V.951	MOSQUEIRO-PA	22.07.97	Praia 4	NAG
83	V.1004	MOSQUEIRO-PA	03.08.98	Praia 2	NAG
84	V.1013	BELÉM-PA	03.05.99	Igarapé Tucunduba	NAG
85	V.1015	BELÉM-PA	03.05.99	Rio Guamá	NAG
86	V.1018	BELÉM-PA	21.06.99	Baia do Guajará	NAG
87	V.1032	BELÉM-PA	16.08.99	Baia do Guajará	NAG
88	V.1052	BELÉM-PA	20.09.99	Rio Guamá	NAG
89	V.1090	BELÉM-PA	29.11.99	Rio Guamá	NAG
90	V.1097	MACAPÁ-AP	08.07.91	Bal Fazendinha	NAG
91	V.1098	MACAPÁ-AP	08.07.91	Bal Araxá	NAG
92	V.1099	MACAPÁ-AP	10.09.91	Rio Beiradão	NAG
93	V.1100	MACAPÁ-AP	10.09.91	Rio Beiradinho	NAG
94	V.1101	MACAPÁ-AP	25.09.91	Àgua de Esgoto	NAG
95	V.1102	MACAPÁ-AP	25.09.91	Àgua de Esgoto	NAG
96	V.1103	MACAPÁ-AP	04.09.91	Àgua de Esgoto	NAG
97	V.1124	MACAPÁ-AP	01.12.91	Rio- cx.navio	O:1
98	V.1125	MACAPÁ-AP	04.12.91	Àgua de Esgoto	O:1
99	V.1140	MACAPÁ-AP	26.02.92	Àgua de Esgoto	NAG
100	V.1141	MACAPÁ-AP	26.02.92	Peixe-apaiari	NAG
101	V.1142	MACAPÁ-AP	26.02.92	Peixe-arirú	NAG
102	V.1143	MACAPÁ-AP	26.02.92	Àgua de Esgoto	NAG
103	V.1144	MACAPÁ-AP	26.02.92	Peixe-tamatá	NAG

104	V.1145	MACAPÁ-AP	26.02.92	Peixe-traíra	NAG
105	V.1168	RIO BRANCO-AC	10.08.93	Rio Purús-Perú	NAG
106	V.1169	RIO BRANCO-AC	14.08.93	Água de Esgoto	NAG
107	V.1171	RIO BRANCO-AC	21.08.93	Córrego-pretório	NAG
108	V.1172	RIO BRANCO-AC	14.09.93	Água de Esgoto	NAG
109	V.1173	RIO BRANCO-AC	14.09.93	Água de Esgoto	NAG
110	V.1231	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
111	V.1232	BELÉM-PA	1979	Água de Esgoto	NAG
112	V.1233	BELÉM-PA	1981	Água de Esgoto	NAG
113	V.1234	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
114	V.1235	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
115	V.1236	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
116	V.1237	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
117	V.1238	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
118	V.1239	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
119	V.1240	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
120	V.1241	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
121	V.1242	BELÉM-PA	1980	Água de Esgoto	NAG
122	V.1243	BELÉM-PA	1977	Água de Esgoto	NAG
123	LMA519-4	BELÉM-PA	06.11.00	Igarapé Tucunduba	NAG
124	LMA541-3	BELÉM-PA	24.10.00	Rio Guamá	NAG
125	LMA575-2	BELÉM-PA	20.11.00	Baía do Guajará	NAG
126	LMA750-1	BELÉM-PA	05.02.01	Baía do Guajará	NAG
127	LMA820-1	BELÉM-PA	12.03.01	Água de Esgoto	NAG
128	LMA840-2	BELÉM-PA	09.04.01	Rio Guamá	NAG
129	LMA841-4	BELÉM-PA	09.04.01	Igarapé Tucunduba	NAG
130	LMA1106	BELÉM-PA	23.07.01	Água de Esgoto	NAG
131	LMA1808-2	BELÉM-PA	30.10.02	Rio Guamá	NAG
132	LMA1809-1	BELÉM-PA	04.11.02	Baía do Guajará	NAG
133	LMA1814-1	BELÉM-PA	18.11.02	Igarapé Tucunduba	NAG
134	LMA2159-1	BELÉM-PA	28.10.03	Rio Guamá	NAG
135	LMA2215-9	BELÉM-PA	15.12.03	Baía do Guajará	NAG
136	LMA2217-9	BELÉM-PA	22.12.03	Igarapé Tucunduba	NAG
137	LMA2314-6	BELÉM-PA	22.03.04	Igarapé Tucunduba	NAG
138	LMA2495-1	BELÉM-PA	06.02.04	Rio Guamá	NAG
139	LMA2498	BELÉM-PA	13.12.04	Baía do Guajará	NAG
140	LMA2622	BELÉM-PA	18.07.05	Rio Guamá	NAG
141	LMA2638-1	BELÉM-PA	08.08.05	Baía do Guajará	NAG
142	LMA2688-9	BELÉM-PA	22.08.05	Água de Esgoto	NAG
143	LMA2712-4	BELÉM-PA	10.10.05	Igarapé Tucunduba	NAG
144	LMA3460-1	BELÉM-PA	02.10.06	Baía do Guajará	NAG
145	LMA3501-4	BELÉM-PA	24.11.06	Rio Guamá	NAG
146	LMA3598-1	BELÉM-PA	13.12.06	Água de Esgoto	NAG
147	LMA3603-2	BELÉM-PA	18.12.06	Igarapé Tucunduba	NAG
148	LMA3984-4	BELÉM-PA	09.07	Igarapé Tucunduba	O:1