

Fatores de virulência em *Vibrio cholerae* das regiões Norte e Nordeste do Brasil

Desde a reintrodução da cólera no Brasil, em 1991, após uma ausência de quase 100 anos, o *Vibrio cholerae* sorogrupo O1 biotipo El Tor vem se destacando entre os enteropatógenos bacterianos como causa de morbidade no país e mais raramente, os isolamentos de *V. cholerae* não-O1 de casos de diarreia e do meio ambiente. Os mecanismos de virulência do sorogrupo O1 ainda não estão completamente esclarecidos e dos não-O1 quase desconhecidos. Para conhecer o potencial patogênico das cepas de *V. cholerae* isoladas no Brasil, realizamos uma análise do conteúdo plasmidial e procuramos verificar a presença de genes que codificam fatores de virulência próprios do *V. cholerae* O1 e outros fatores de virulência presentes em outras enterobactérias. Foram analisadas 31 cepas de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, isoladas de processos entéricos humanos e do meio ambiente, das regiões Norte e Nordeste do Brasil e 45 cepas não-O1 isoladas de alimentos marinhos e de amostras ambientais do litoral do estado de Pernambuco. Entre as 31 cepas de *V. cholerae* O1, apenas duas possuíam plasmídeos (um plasmídeo em cada) de peso molecular de cerca de 150 e 31kb respectivamente. Entre as 45 amostras de não-O1, apenas seis evidenciaram um único plasmídeo com pesos moleculares variando de 25 a 150kb. Duas cepas possuíam dois plasmídeos cada, sendo que uma (Vc 349) possuía plasmídeos de 16kb e 45kb, e a outra (Vc 62) revelou plasmídeos de 16kb e 20kb. Foi observada perda de plasmídeo em uma cepa O1. A presença dos genes *ctxA*, *toxT*, *tcpA*_{EITor} e *tcpA*_{Clássico} foi detectada através de PCR com iniciadores específicos, em todas as cepas de *V. cholerae* O1, e surpreendentemente com amplificação em ambas as sequências dos biotipos. Entre as cepas de *V. cholerae* não-O1 analisadas houve amplificação do gene *toxT* em 03 cepas. Em contraposição a amostragem do sorogrupo O1, apenas uma cepa não-O1 (Vc 37) amplificou com os dois iniciadores. As outras 12, amplificaram com um dos dois iniciadores excludentemente: 9 cepas amplificaram só com

Virulence factors of *Vibrio cholerae* from the North and Northeast regions of Brazil

After an absence of about 100 years, cholera was reintroduced into Brazil in 1991. Since then, *Vibrio cholerae* serogroup O1, biotype El Tor has emerged as a morbidity agent among the enteropathogens. Although less frequently, non-O1 strains are also being isolated from patients with diarrhea and from the environment. The mechanisms of virulence of serogroup O1 *V. cholerae* are still not completely understood and those of the non-O1 serogroup are almost unknown. Therefore, we analyzed a collection of 31 clinical and environmental serogroup O1 strains from the North and Northeast regions of Brazil and 45 non-O1 sea-food and environmental strains from the State of Pernambuco, in order to assess their virulence potential. The strains were analyzed for their plasmid content and for the presence of genes encoding typical virulence factors of O1 *V. cholerae*. The strains were also screened for the presence of genes encoding virulence factors in other enterobacteria for the detection of homologous mechanisms. Only two O1 strains harbored one plasmid each of 150 and 31kb, respectively. Spontaneous plasmid curing was observed in one of these strains. Among the environmental non-O1 strains, 6 harbored one plasmid each of 150 to 25kb. In addition, 2 strains harbored two plasmids each, of 16 and 45kb in one strain and 16 and 20kb in the other. The presence of the genes *ctxA*, *toxT*, *tcpA*_{EITor} and *tcpA*_{Classic} was detected in all *V. cholerae* O1 strains with amplification of both sequences of the two biotypes. Among the non-O1 strains, *toxT* was amplified in 3 strains only. In contrast to O1 strains, only one non-O1 strain (Vc 37) amplified both *tcpA*_{EITor} and *tcpA*_{Classic} sequences. Among the other strains, 12 amplified one of each sequence: 9 strains with *tcpA*_{EITor} and 3 with *tcpA*_{Classic}. The iron-regulated gene, *irp2*, which is a pathogenicity marker in *Yersinia* was amplified in 6 non-O1 strain. However, the amplified DNA fragment was recognized by a specific probe in only one strain. Genes *ail*_{ent}, *inv*_{ent}, *inv*_{psib}, *senA*, and *aidA*, were not specifically

o iniciador *tcpA*_{EITor} e 3 com *tcpA*_{Clássico}. A presença do gene *irp2*, regulado pelo ferro e marcador de patogenicidade nas yersínias patogênicas, foi detectada por PCR em 06 amostras de *V. cholerae* não-O1. Entretanto, a sonda *lrp2*, dirigida para o gene *irp2*, reconheceu o fragmento amplificado em apenas 01 cepa. Nenhum dos fatores de virulência de outras enterobactérias, codificados pelos genes *ail*_{ent}, *inv*_{ent}, *inv*_{pstb}, *senA*, *aidA*, pesquisados através de reações de PCR específica, foram detectados nas condições analisadas.

amplified in any of the O1 and non-O1 strains under our experimental conditions.

Flávia Bezerra de Souza Melo

Tese apresentada ao Centro de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção do Título de Mestre.

Recife, Pernambuco, Brasil, 1998