

Estudo Molecular de *Vibrio cholerae* não-01 isolado de zooplâncton da Baía de São Marcos/São Luis – MA, Brasil

Molecular study of *Vibrio cholerae* non-01 isolated from zooplankton of São Marcos Bay/São Luis – MA, Brasil

Eloisa da Graça do Rosario Gonçalves¹, Nilma Cintra Leal² e Ernesto Hofer³

RESUMO

O estudo foi desenvolvido com o objetivo de analisar o perfil plasmidial, pesquisar genes de virulência e identificar os perfis genéticos de 31 cepas de *Vibrio cholerae* não 01 isoladas de zooplâncton dos estuários dos rios Anil e Bacanga em São Luis – MA. O estudo do DNA plasmidial revelou a presença de 2 a 3 plasmídeos em 10 cepas, com pesos moleculares variando de 5,5 a 40 kilobases. A ribotipagem revelou um perfil comum a todas as cepas. A amplificação do DNA genômico por PCR não revelou os genes *ctxA*, *ace* e *zot*, mostrando tratar-se de cepas não patogênicas, enquanto a RAPD-PCR identificou múltiplos perfis genéticos, achado compatível com o grande potencial de variabilidade desta espécie.

Palavras-chaves: *Vibrio cholerae* não 01. Baía de São Marcos. Ecologia. Estudo molecular.

ABSTRACT

The study was developed to analyze the plasmidial DNA, research virulence genes and identify genetic diversity of 31 strains of *Vibrio cholerae* non-01 isolated from zooplankton of the Bacanga and Anil rivers in São Luis-MA. The study of plasmidial DNA showed 2 or 3 plasmids from 10 strains between 5.5 and 40 kilobasis. There was only single ribotype pattern. PCR methods did not show the genes *ctxA*, *ace* and *zot*, while RAPD-PCR identified genetic diversity in the strains, showing the potential for variability in this species.

Key-words: *Vibrio cholerae* non-01. São Marcos bay. Ecology. Molecular study.

A espécie *Vibrio cholerae*, integrante natural da flora bacteriana de ambientes aquáticos⁹ está classificada em 140 sorogrupos, com base nas características do antígeno somático “O”²³. Conversões sorológicas foram demonstradas entre os sorogrupos em condições controladas no laboratório, com perda da aglutinabilidade de *V. cholerae* 01 e aquisição dessa característica por vibrios não-01^{3 6 20}.

Poucos estudos sobre a ecologia desta bactéria foram desenvolvidos em condições naturais. Inicialmente, a demonstração dos sorogrupos não-01 no meio ambiente não costumava despertar a atenção como um potencial problema de saúde pública com a identificação do sorogrupo 0139 na etiologia de doença diarréica idêntica à cólera clássica, em 1992,

nos países banhados pela Baía de Bengala, desfez-se a convicção de que só o sorogrupo 01 seria capaz de produzir cólera epidêmica¹. Estudos moleculares recentes têm demonstrado o grande potencial de variabilidade genética e a dinâmica de transferência horizontal de genes de virulência entre os diferentes sorogrupos, reforçando o potencial de patogenicidade desta espécie^{7 12}.

O município de São Luis está situado às margens da Baía de São Marcos, onde deságuam os rios Anil e Bacanga, cujas nascentes encontram-se no interior da Ilha de São Luis. As populações ribeirinhas dos dois estuários mantêm-se em estreito contacto com o ambiente aquático em atividades de pesca e de lazer, expostas ao risco de infecção. O presente estudo foi

1. Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA. 2. Centro de Pesquisa Ageu Magalhães da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Recife, PE. 3. Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Apoio financeiro: CAPES

Endereço para correspondência: Dra. Eloisa da Graça do Rosario Gonçalves. Depto de Patologia/UFMA. Praça Madre Deus 2, Térreo, Bairro Madre Deus, 65025-560 São Luis, MA

Telefone: 55 98 221-0270

e-mail: regionalsbmt@elo.com.br

Recebido para publicação em 16/10/2003

Aceito em 19/05/2004

desenvolvido com o objetivo de analisar o perfil genético, assim como pesquisar a existência de genes de virulência em cepas de *Vibrio cholerae* isoladas em amostras de zooplâncton coletadas no referido ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de zooplâncton foram coletadas de Outubro de 1997 a Outubro de 1998, em intervalos mensais, elegendo-se duas estações fixas de amostragem (1 e 2), nos estuários dos rios Anil e Bacanga, os quais deságuam na Baía de São Marcos, São Luis - MA. Foi empregada no processo, rede de plâncton, confeccionada em malha de 65mm de abertura, em arrastos horizontais, subsuperficiais, por 5 minutos, cobrindo raio de cinco metros. Amostras de 400ml de água, contendo zooplâncton, foram mantidas em frasco estéril e à temperatura ambiente, sendo submetidas em, no máximo duas horas, ao processo clássico de isolamento bacteriano⁸.

Para o estudo do DNA plasmidial das cepas isoladas foi empregada a técnica de extração do DNA por lise alcalina, sem adição de lisozima⁴. O material obtido foi submetido à eletroforese em Gel de Agarose 0,6% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,098M; EDTA 0,002M). A migração deu-se em temperatura ambiente, empregando-se corrente constante de 20mA e 100V, por duas horas. O DNA foi corado com brometo de etídio (15mg/ml) e observado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). O peso molecular dos plasmídeos foi estimado pela comparação com plasmídeos previamente conhecidos, presentes na cepa controle, *Escherichia coli* 39R861.

Para a detecção dos genes de virulência – *ctxA* (enterotoxina da cólera), *ace* (enterotoxina acessória da cólera) e *zot* (toxina da zona ocludens) - o DNA total foi extraído pela técnica descrita por Maniatis e col¹⁵, sendo empregada PCR em sua amplificação, com os seguintes iniciadores:

Para o gene *ctxA*: 5' CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG 3' e 5' TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG 3', descritos por Keasler e Hall¹³.

Para o gene *ace*: 5' AGA GCG CTG CAT TTA TCC TTA TTG 3' e 5' AAC TCG GTC TCG GCC TCT CGT ATC 3'.

Para o gene *zot*: 5' GCT ATC GAT ATG CTG TCT CCT CAA 3' e 5' AAA GCC GAC CAA TAC AAA AAC CAA 3'.

Os dois últimos pares de iniciadores foram construídos a partir de seqüências disponíveis no GenBank, cuja senha de acesso é AF 175708, utilizando-se o programa DNASTar. As reações foram preparadas em volume final de 25ml por tubo, contendo 20ng de DNA molde; Tris-HCL 10mM; KCL 50mM; MgCl₂ 1,5 mM; 2 ml de dNTP 200mM de cada nucleotídeo (Pharmacia); 20pmol de cada "primer" e 1 U de Taq DNA polimerase (Pharmacia). Em cada partida de amplificação foi incluído um controle positivo (DNA da cepa de referência *V. cholerae* O1 569B, Clássico/Inaba) e um controle negativo (todos os componentes da mistura de reação, exceto o DNA). As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer,

programado para 30 ciclos de 1 minuto a 92°C para a desnaturação do DNA, 1 minuto a 55°C para anelamento dos iniciadores e 2 minutos a 72°C, para o alongamento ou síntese de DNA, terminando por uma etapa de 7 minutos a 72°C para alongamento final das fitas.

Dez microlitros dos produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, no tampão TBE, a 100V e 200mA. O gel foi corado com Brometo de etídio, sendo o DNA visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado em Polaróide.

O perfil genético das cepas foi estudado através de RAPD-PCR, empregando-se os iniciadores **784** (5'GCG GAA ATA G 3') e **791** (5' GAG GAC AAA G 3'). As reações foram desenvolvidas em volume final de 25ml por tubo, contendo 20ng de DNA molde; 2,5ml do tampão de reação 10x concentrado (tris-HCL 100mM; KCl 500mM; MgCl₂ 3,0mM; 2,5ml de dNTP 200mM (Pharmacia). Foi utilizado termociclador (Perkin Elmer) programado para 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C e 2 minutos a 72°C. Finalmente, 10 microlitros dos produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, nas condições anteriormente descritas.

A técnica de ribotipagem por PCR, descrita por Kostman e cols¹⁴, foi empregada, utilizando-se os iniciadores 1 (5' TTT CTG CAG YGG NTG GAT CAC CTC CTT 3') e 2 (5' ACG AAT TCT GAC TGC CMR GGC ATC CA 3'), desenhados por Chun e col⁵.

RESULTADOS

Foram obtidos 55 isolados de *V. cholerae* não O1, 48 (87,3%) provenientes do Rio Bacanga e 7 (12,7%), do Rio Anil, dos quais 31 foram submetidos ao estudo molecular. Estes isolados são provenientes das amostras coletadas entre os meses de dezembro de 1997 e abril de 1998, estando a distribuição temporal e espacial representada na Tabela 1. Um isolado de *V. alginolyticus*, três de *V. parahaemolyticus* e 1 de *Vibrio* sp foram incluídos no estudo a título experimental e para confronto com o perfil de *V. cholerae*.

Dos 31 isolados, 10 (32,2%) exibiram de 2 a 3 plasmídeos, com pesos moleculares variando entre 5,5 e 40 kilobases (Figura 1).

Tabela 1 - Distribuição tempo-espacial de 31 isolados de *Vibrio cholerae* não O1, não O139 submetidos a estudo molecular – São Luis/MA (outubro de 1997 a outubro de 1998).

Ano/ mês	Isolados bacterianos			
	Rio Bacanga		Rio Anil	
	Estação 1	Estação 2	Estação 1	Estação 2
1997				
dez	-	-	-	1; 2a; 2b*; 3; 4**
1998				
jan	5; 6; 7; 8; 9	-	-	-
fev	10; 13; 14	11; 12	-	-
mar	17	15; 16	21**	18; 19; 20**, 22
abr	23; 24; 29; 30; 31***; 32	25; 26; 27; 28; 33; 34; 35	-	-

* *Vibrio alginolyticus*, ** *V. parahaemolyticus*, *** *Vibrio* sp

Não foram detectados os genes de toxigenidade *ctxA*, *zot* ou *ace* em nenhum dos 31 isolados, pela técnica de PCR.

Nas Figuras 2 e 3 estão representados os produtos da RAPD-PCR. Com o emprego do iniciador 791 foram identificados 13 perfis genéticos diferentes, com amplificação de 2 a 9 bandas entre 600 e 2000 pares de bases, enquanto 7 grupos genotípicos

foram demonstrados com o iniciador 784, havendo amplificação de 2 a 4 bandas, variando entre 150 a mais de 2000 pares de bases.

A ribotipagem por PCR mostrou padrão de amplificação idêntico nos 31 isolados não O1, conforme gel representativo mostrado na Figura 4.

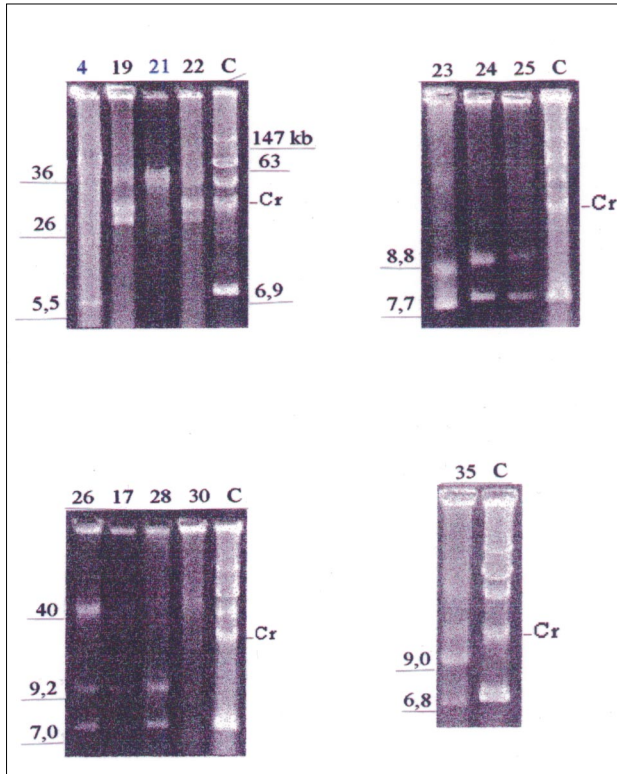


Figura 1 - Produtos de extração do DNA plasmidial de cepas de *Vibrio cholerae* não O1. Cr= DNA cromossômico. Linhas C= controle (*E. coli* 39R861). Linhas 4 e 21= *V. parahaemolyticus*. Linhas 19, 22-28, 30, 35= *Vibrio cholerae* não O1.

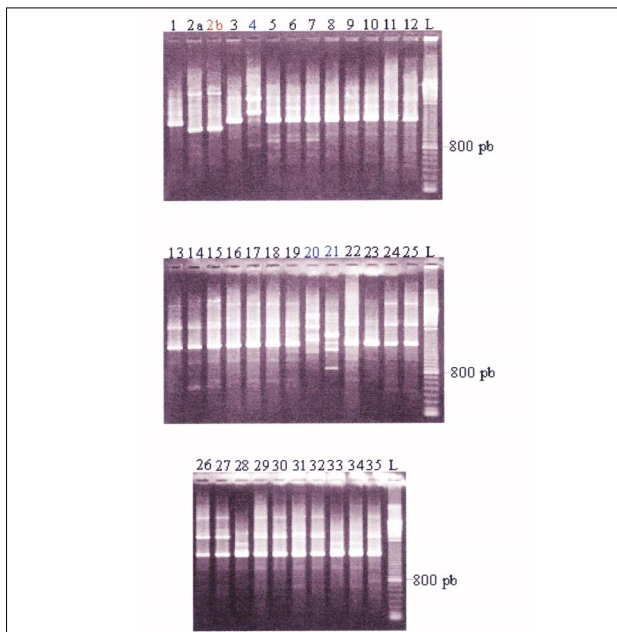


Figura 2 - RAPD-PCR: Produtos de amplificação do DNA de cepas de *Vibrio cholerae* não O1 com primer 784 - São Luís/MA (1997-1998). L= ladder; pb= par de bases. Linhas 1, 2a, 3, 5-19, 22-30, 32-35= *V. cholerae* não O1. Linha 2b= *V. alginolyticus*; Linha 31= *Vibrio* sp, linhas 4, 20, 21= *V. parahaemolyticus*.

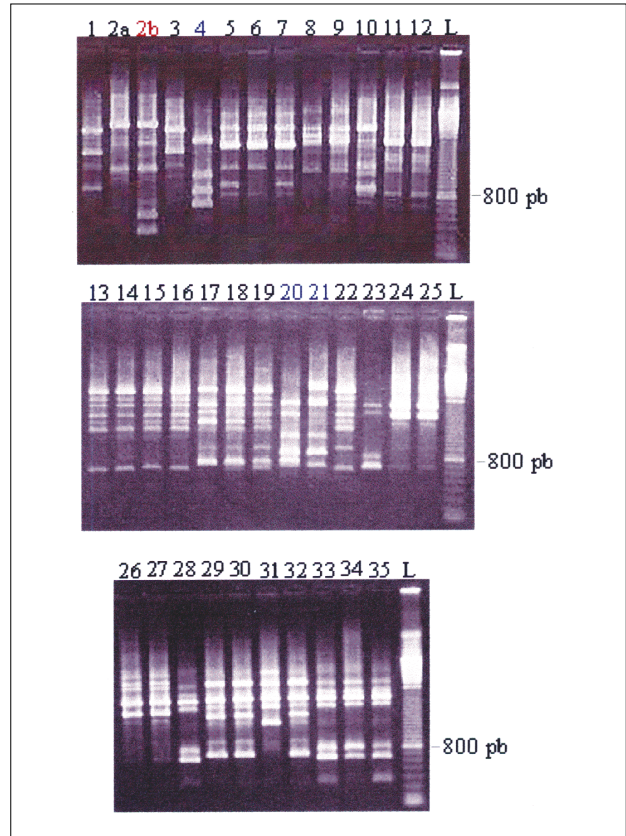


Figura 3 - RAPD-PCR: Produtos de amplificação do DNA de cepas de *Vibrio cholerae* não O1 com primer 791 - São Luís/MA (1997-1998). L= ladder; pb= par de bases. Linhas 1, 2a, 3, 5-19, 22-30, 32-35= *V. cholerae* não O1. Linha 2b= *V. alginolyticus*; Linha 31= *Vibrio* sp, linhas 4, 20, 21= *V. parahaemolyticus*.

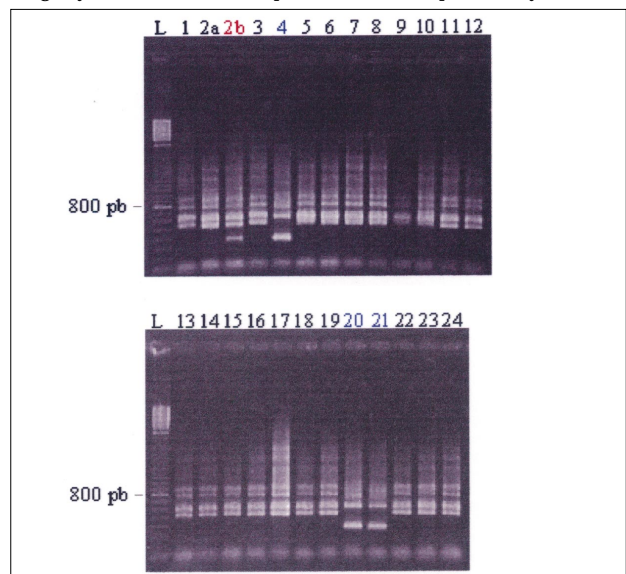


Figura 4 - Ribotipagem - gel representativo dos produtos da amplificação por PCR de cepas não O1 de *Vibrio cholerae* - São Luís/MA (1997-1998). L= ladder; pb= par de bases. Linhas 1, 2a, 3, 5-19, 22-30, 32-35= *V. cholerae* não O1. Linha 2b= *V. alginolyticus*; Linhas 4, 20, 21= *V. parahaemolyticus*.

DISCUSSÃO

O emprego de técnicas moleculares no estudo da espécie *Vibrio cholerae*, tem tornado possível um melhor entendimento do potencial de variabilidade genética, de virulência e da dinâmica de transferência horizontal de genes entre diferentes sorogrupos. A presença do cassete VCR, envolvido na expressão do gen *sto* (toxina termo-estável) foi demonstrada em sorogrupos diversos de *V. cholerae*, assim como em outras espécies de *Vibrio*¹⁶. Mais recentemente, foi identificada por Karaolis et al¹² a Ilha de Patogenicidade do *V. cholerae* (VPI), onde se situa o operon que codifica o pili co-regulado com a toxina, em cepas toxigênicas de *V. cholerae* não O1¹². Em estudo de 41 isolados de *V. cholerae* não O1, provenientes das regiões Norte e Nordeste do Brasil, foram detectadas seqüências compatíveis com os genes *toxT* e *tcpA* em uma proporção das cepas¹⁷. Estes dados, aliados à emergência do sorogrupo O139 como patógeno capaz de produzir doença diarreica semelhante à cólera clássica, reforçam a importância que a espécie *Vibrio cholerae* assume no campo da patologia humana.

A presença de plasmídeos em 10 cepas é comparável ao achado de outros pesquisadores que os demonstraram em sorogrupos não O1 de *Vibrio cholerae*^{17,18}. A função exercida por estas estruturas não está bem definida em *V. cholerae*, sendo considerados crípticos, uma vez que a retirada deles por passagens sucessivas *in vitro* não alterou as características de virulência das cepas bacterianas¹⁸. Padrão similar de atividade hemaglutinante, citotóxica e enterotóxica foi constatado entre cepas de *V. cholerae*, portadoras ou não de plasmídeos numa evidência de que essas características nem sempre são mediadas por eles². Contudo, em algumas cepas foram detectados plasmídeos que abrigavam genes de resistência a múltiplos antibióticos, transferíveis a outros grupos bacterianos.

A ausência dos genes *ctxA*, *ace* e *zot* pela técnica de PCR são comparáveis aos resultados encontrados em estudo de cepas ambientais de *V. cholerae* O1 e não O1 isoladas antes e durante epidemia de cólera no Estado de São Paulo, o qual demonstrou que os isolados de *V. cholerae* O1 relacionados à epidemia continham os genes *ctxA* e *zot*, enquanto os pré-epidêmicos e todos os não O1 eram negativos²¹. No entanto, apesar de não ser comum o encontro de cepas produtoras da toxina termolábil, característica da cólera, em cepas ambientais de *V. cholerae* não O1, a produção de citotoxinas e enterotoxinas semelhantes à toxina colérica foi demonstrada em ensaios laboratoriais, demonstrando o potencial de patogenicidade contido nessas cepas^{11,19,22,25}.

A ribotipagem revelou apenas um perfil, evidenciando a circulação de um único ribotipo no ambiente estudado. No entanto, a identificação de múltiplos perfis genéticos entre os 31 isolados submetidos à RAPD-PCR corrobora as observações de outros autores quanto ao grande potencial de variabilidade apresentada pela espécie *V. cholerae*^{10,12,24}. Levando-se em conta a distribuição dos isolados nas 4 estações de amostragem, constata-se que as cepas são, em geral, provenientes do mesmo estuário, ainda que de estações diferentes. No entanto, com o grupo formado com os isolados 17, 18, 19 e 22, os quais apresentam o mesmo perfil com o iniciador 791 a procedência foi diversificada, tendo sido o isolado 17 obtido de amostra

coletada na estação 1 do rio Bacanga, enquanto os outros 3 são provenientes da estação 2 do rio Anil. Com o iniciador 784, com o qual foram definidos 7 perfis distintos, os agrupamentos são formados por maior número de isolados, observando-se que, em relação à distribuição espacial, repete-se o padrão descrito com o iniciador 791. Observou-se, ainda, em relação aos meses de coleta que alguns isolados com perfil idêntico foram obtidos a partir de amostras coletadas em meses diferentes, como no caso dos isolados 13, 14 (fevereiro/98), 15 e 16 (março/98). Estas observações sugerem um comportamento dinâmico da espécie, condicionado, provavelmente, pelas variações das condições ambientais, as quais poderiam selecionar a predominância de determinado genótipo em épocas e locais diferentes.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Departamento de Microbiologia, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE, pelo apoio técnico no processamento das amostras

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert MJ. Personal reflections on discovery of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal: a tribute to team work and international collaboration. *Journal of Diarrhoeal Disease Research* 11: 207-210, 1993.
2. Barja JL, Santos I, Huq I, Colweel, RR, Toranzo AE. Plasmids and factors associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology* 33: 107-114, 1990.
3. Bhattacharji LM, Bose B. Field and laboratory studies on transformation of the *V. cholerae* in the maintenance of cholera endemicity: a preliminary report. *Indian Journal of Medical Research* 52: 777-790, 1964.
4. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523, 1979.
5. Chun J, Huq A, Colwell RR. Analysis of 16S-23S r RNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2202-2208, 1999.
6. Colweel RR, Huq A, Chowdhury MAR, Brayton PR, Xu B. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 946-950, 1995.
7. Heidelberg JF, Elsen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragol I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishman RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406: 477-482, 2000.
8. Hofer E. Métodos utilizados para o isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. *Informe de Patologia Clínica* 1: 5-18, 1975.
9. Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R, Colweel RR. Ecological relationship between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 275-283, 1983.
10. Jiang SC, Louis V, Choopun N, Sharma A, Huq A, Colwell RR. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 140-147, 2000.
11. Kaper JB, Lockman H, Colwell RR, Joseph SW. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 37: 91-103, 1979.

12. Karaolis DKR, Somara S, Maneval DR, Johnson JA, Kaper JB. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and phage receptor in cholera bacteria. *Nature* 399: 375-379, 1999.
13. Keasler SP, Hall RH. Detecting and biotyping *V. cholerae* O1 with multiplex Polymerase Chain Reaction. *Lancet* 341: 1661, 1993.
14. Kostman JR, Edlind TD, Lipuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by Polymerase Chain Reaction Ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2084-2987, 1992.
15. Maniatis T, Fritsch EE, Sambroock J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York. 368-369, 1982.
16. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280: 605-608, 1998.
17. Melo FBS. Fatores de virulência em *Vibrio cholerae* das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Tese de Mestrado. Recife, PE, 1998.
18. Nandy RK, Sengupta TK, Mukhopadhyay S, Ghose AC. A comparative study of properties of *Vibrio cholerae* O139, O1 and other non-O1 strains. *Journal of Medical Microbiology* 42: 251-257, 1995.
19. Ohashi M, Shimada T, Fulcumi H. "In vitro" production of enterotoxin and hemorrhagic principle by *V. cholerae* NAG. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 25: 179-194, 1972.
20. Pollitzer R. *Cholera*: Monograph 43. World Health Organization Geneva. Switzerland, 1959.
21. Rivera IG, Chowdhury MAR, Sanchez PS, Sato MI, Huq A, Colweel RR, Martins MT. Detection of cholerae toxin (*ctx*) and zonula ocludens (*zot*) genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 572-577, 1995.
22. Saha PK, Koley H, Nair GB. 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.
23. Shimada T, Arakawa E, Itoh HK, Okitsu T, Matsushima A, Asai Y, Yamai S, Nakazato T, Nair G B, Albert M J, Takeda Y. Extended serotyping scheme for *V. cholerae*. *Current Microbiology* 28: 175-178, 1994.
24. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 277: 1910-1914, 1996.
25. Zinnaka Y, Carpenter CCJ. An enterotoxin produced by noncholera vibrios. *Johns Hopkins Medical Journal* 131: 403-410, 1972.