

## Deteção molecular de *V. cholerae* O1 e O139 e caracterização genotípica dos fatores de virulência em estirpes clínicas de *V. cholerae* isoladas em Angola: resultados preliminares

Lurdes Monteiro <sup>1</sup>, Francisca Reis Van-Dúnem <sup>2</sup>,  
Anabela Vilares <sup>1</sup>, Joana Sami <sup>2</sup>, Erika Oliveira <sup>2</sup>,  
Filomena Gomes da Silva <sup>2</sup>  
m.lurdes.monteiro@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento.

Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Instituto Nacional de Saúde Pública, Luanda, Angola.

### Introdução

As pandemias de cólera, causadas por serogrupos específicos de *V. cholerae* que apenas são patogénicos para o homem, têm sido descritas desde 1817. Presume-se que as primeiras sete foram causadas pelo serogrupo O1, em que a sétima pandemia (1961) ainda se encontra activa e tem tido um impacto severo em três continentes. A sexta pandemia terminou em 1923, mas o clone persistiu até aos anos 90. Vários surtos de cólera foram descritos após o desaparecimento da sexta pandemia e antes do início da sétima pandemia, em que as estirpes isoladas foram caracterizadas como sendo do biótipo El Tor ao contrário das estirpes da quinta e sexta pandemia, pertencentes ao biótipo clássico. Os surtos com estirpes El Tor ocorreram na Indonésia e no Médio Oriente (1926-1960) e são referidas como estirpes pré-pandémicas devido ao facto de terem sido consideradas como precursores da sétima pandemia, que também é devida a estirpes do biótipo El Tor. Em Outubro de 1992, um novo serogrupo, definido como O139, causou um grave surto de cólera no sudoeste da Índia. Em 10 meses este serogrupo disseminou por toda a Índia e igualmente para 11 países vizinhos desalojando o serogrupo O1. Desde essa altura ambos os serogrupos coexistem e são responsáveis por grandes surtos. Estudos genómicos indicam que a estirpe epidémica O139 apareceu por aquisição horizontal de um único ADN. Tradicionalmente a classificação de *V. cholerae* é realizada serologicamente e requer cerca de 200 antígenos baseados no antígeno somático O. As estirpes de *V. cholerae* dividem-se em três subgrupos principais, O1, O139, e não O1/não O139, dos quais somente os serogrupos O1 e O139 se encontram associados a pandemias e epidemias de cólera. Os serogrupos não epidémicos (não O1 e não O139) podem ser patogénicos e são reconhecidos como agentes causais de surtos esporádicos e localizados.

Os vibrios ingeridos a partir de água e alimentos, contaminados, têm que passar através da barreira ácida do estômago antes de colonizarem a zona superior do intestino grosso. A colonização faz-se com o apoio de fímbrias, estruturas proteicas filamentosas denominadas pilis coreguladores de toxina (TCP) que são extensões da parede celular que aderem aos receptores da mucosa e através da mobilidade da bactéria que ajudam a penetrar na camada de muco. A adesão dos vibrios à mucosa permite que a enterotoxina (toxina colérica) produzida seja eficientemente enviada para as células da mucosa. Esta toxina interfere com o equilíbrio electrolítico dos intestinos, sendo responsável pela ativação da adenil ciclase que conduz a um aumento do AMP cíclico, seguido de um aumento da secreção de cloreto e inibição da natural absorção de cloreto de sódio nas vilosidades do intestino provocando uma massiva excreção de fluidos para o lúmen do intestino grosso. O volume excretado excede a capacidade normal de absorção do intestino e resulta numa diarreia aquosa contendo grandes quantidades de sódio, cloreto, bicarbonato, e potássio. As fezes de doentes com cólera contêm elevadas concentrações de vibrios ( $10^8$  bactérias por g de fezes) e são altamente infecciosas.

A análise genética do genoma de *V. cholerae* revelou a presença de dois importantes elementos genéticos que distinguem uma estirpe patogénica de *V. cholerae* de uma estirpe inócua. A patogenidade das estirpes de *V. cholerae* O1 e O139 depende de uma combinação de fatores, incluindo a enterotoxina (toxina colérica [CT], *ctxA*) e a sua capacidade de adesão, e colonização do intestino grosso (fator de colonização *tcpA*). Os principais factores de virulência encontram-se presentes em grupos. O primeiro é o genoma de um bacteriófago lisogénico designado CTXφ que comporta os genes que codificam para a toxina colérica e o segundo o ilhéu de patogenidade do vibrio (VPI) que comporta os genes do fator de colonização, pilis coreguladores de toxina (TCP). Outros fatores têm sido igualmente associados com a enteropatogenicidade e incluem uma hemolisina idêntica ao El Tor (*hlyA*), uma enterotoxina termo estável (*stn/sto*), hemaglutininas, neuraminidase (*nanH*), proteína de membrana externa (*ompU*), toxina Shiga like (*stx*), uma proteína reguladora ToxR e uma toxina zonula ocludente (*zot*). Os métodos de diagnóstico convencionais (fenotípicos) utilizados para a deteção e classificação de estirpes de *V. cholerae* isoladas de amostras clínicas e ambientais requerem vários dias e envolvem a cultura em água peptonada alcalina, meio TCBS (tiosulfato, citrato, bilis, sais de sucrose), aglutinação em lâmina com antígenos específicos e teste para a deteção de produção da toxina colérica. No entanto *V. cholerae* O1 e O139 podem ser detetados rapidamente por técnicas moleculares assim como a distinção entre estirpes toxigenicas e não toxigenicas.

O primeiro caso conhecido de pandemia de cólera em Angola ocorreu em 1971. A epidemia durou 4 anos e causou 2453 casos notificados e 117 óbitos. Em 1987 uma outra epidemia iniciou-se no município do Soyo, na Província do Zaire e difundiu-se nas 18 Províncias de Angola.

artigos breves\_ n. 10

Esta epidemia de cólera sazonal recorrente resultou em aproximadamente 112.184 casos e mais de 7.120 mortos. De 1995 a 2006, apenas se registaram casos esporádicos. Entre 2006 e 2008 verificou-se uma nova epidemia sobretudo nas regiões costeiras com um total de cerca de 84.000 casos e cerca 3.150 mortos (1). A confirmação laboratorial de casos de cólera é efetuada no Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola (INSP) utilizando os métodos fenotípicos. A cólera continua a ser um grave problema de Saúde Pública em Angola. Mais, o serogrupo O1, biótipo El Tor, deslocou-se da Ásia tendo causado pandemia em África e na América do Sul durante os últimos 35 anos. O novo serogrupo, O139, apareceu no sul da Ásia em 1992, tornou-se endémico na região, e ameaça iniciar uma nova pandemia. Atualmente verifica-se um elevado afluxo de indivíduos provenientes das zonas endémicas de *V. cholerae*, nomeadamente Ásia, devido a acordos de cooperação para a vinda de operários, principalmente na área da construção civil. Estes indivíduos vivem habitualmente em comunidade fechada, e por vezes em condições precárias de saneamento o que favorece a existência e disseminação de *V. cholerae*. Olhando para a história das epidemias de *V. cholerae* e com o actual movimento de populações a probabilidade de ocorrência do serótipo O139 em Angola é real. Este trabalho tem como objetivo a implementação de metodologias moleculares para caracterização de *V. cholerae* no INSP, nomeadamente: confirmação molecular dos serogrupos O1, O139 e não O1/não O139; confirmação molecular dos biótipos El Tor e Clássico utilizando o gene *tcpA*; determinação da presença dos genes associados aos fatores de virulência: *ctxA*, *tox*, *ace*, *omp* e *zot*.

Métodos

De um universo de 534 estirpes caracterizadas fenotipicamente como *V. cholerae* pertencentes à coleção existente no INSP, serão caracterizadas, geneticamente, todas as estirpes que se encontrem viáveis. Estas estirpes são provenientes de doentes com suspeita de cólera e cujas amostras de fezes foram analisadas no INSP. As estirpes da coleção do INSP têm sido conservadas em meio de conservação sólido em tubo, por picada central e à temperatura ambiente. A sua recuperação consistiu, na sua sementeira em água peptonada durante 4 horas e em seguida passagem para meio de TCBS. Todas as repicagens que evidenciaram a presença de colónias amarelas características neste meio, foram em seguida conservadas por congelação em meio TSI com glicerol a - 80°C.

De igual modo a partir das culturas frescas de *V. cholerae* em TCBS foi efetuada uma suspensão de uma ansa de 10 µl de UFC em 500 µl de água estéril para extração de ADN pelo método de fervura. Este método consistiu em ferver durante 15 minutos a referida suspensão e em seguida centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm. As técnicas moleculares utilizadas foram aferidas no Departamento de Doenças Infecciosas do INSA de Lisboa e em seguida transmitidas para o Laboratório de Biologia Molecular do INSP (LBM). Assim, para a confirmação do serogrupo foram utilizados iniciadores específicos de *V. cholerae* O1e O139 segundo Hoshino *et al.* (2). Para a caracterização

dos diferentes genes de virulência e distinção do biótipo clássico e El Tor foram utilizados iniciadores descritos por Singh *et al.* (3). A aferição das diferentes reações de amplificação foi realizada utilizando ADN de 18 estirpes de *V. cholerae* da coleção de estirpes do INSA entre elas, 4 estirpes de controlo de qualidade (2 do serótipo O1 Ogawa, 1 do serótipo O1 Inaba e 1 do serótipo não O1). Para o serótipo O139, foi-nos gentilmente cedido, pelo Instituto Pasteur de Paris, ADN de uma estirpe de *V. cholerae* O139.

Nas Figuras seguintes encontram-se alguns exemplos das diferentes reações de PCR aferidas.

Figura 1 : Exemplo de um gel com estirpes de *V. cholerae* O1.

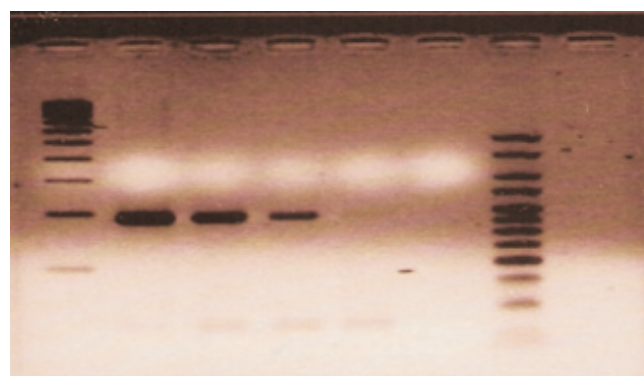
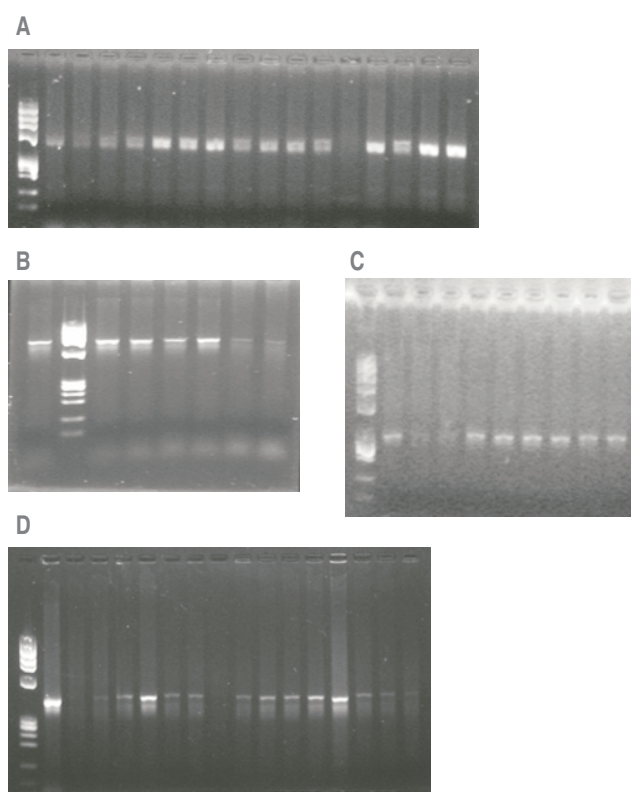


Figura 2 : A: gene *ctxA*; B: gene *tox*; C: gene *ace*; D: gene *tcpA*.



→ continua

artigos breves\_ n. 10

\_Atualmente no LBM do INSP, das cerca de 200 estirpes, até agora recuperadas, 115 estão a ser submetidas às diferentes reações de amplificação. Para tal, foram efetuadas diferentes diluições (1/1; 1/10; 1/100) de cada ADN extraído e em seguida amplificadas com as condições de reação descritas por *Hoshino et al.* (2) para a caracterização do serótipo e por *Singh et al.* (3) para os diferentes genes de virulência.

**\_Resultado e conclusões**

Até ao momento 75 estirpes confirmaram a presença do serótipo O1, 47 estirpes a presença do gene *ctxA* e 22 a presença do *gene tox*.

\_A metodologia apresentada permite a deteção rápida de *V. cholerae* dos serogrupos O1 e O139 assim como a distinção entre estirpes toxinogénicas e não toxinogénicas. Mais, com o conhecimento dos diferentes genes associados à virulência da estirpe é possível realizar o mapeamento dos diferentes fatores de virulência presente nas estirpes isoladas, quer clínicas, quer ambientais.

\_A implementação deste método molecular permitiu, igualmente, introduzir o conceito de vigilância epidemiológica molecular no INSP e iniciar a caracterizações das estirpes de *V. cholerae* circulantes em Angola.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Organização Mundial da Saúde. Epidemia de cólera em Angola. Boletim nº 67, 2008.
- (2) Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholera* O1 and O139. FEMS Immunol. Med. Microb. 1998;20:201-207.
- (3) Singh DV, Isac SR, Colwell RR. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholera*. J. Clin. Microbiol. 2002;40:4321-4324.