

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

BC/27299
IB/80203

VANESSA SPERANDIO

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA OmpU
DE *Vibrio cholerae* COMO UMA PROVÁVEL ADESINA, CLONAGEM E
SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE SEU GENE.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Vanessa Sperandio
e aprovada pela Comissão Julgadora. 04
07
95

Tese apresentada ao Departamento de
Genética e Evolução do Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências
Biológicas na área de Genética.



Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
Depto. Microbiologia e Imunologia
IB, UNICAMP

Orientador no Exterior: James B. Kaper, PhD
Center for Vaccine Development
University of Maryland, Baltimore, MD, USA

Campinas, 1995

IDADE

五、

CHAMADA :

17 May 1961

Ex.

150 BC/27299

OC. 667196

C		D	X
---	--	---	---

72 R\$ 11.00

10 20104198

CPD *CN 00086177.3*

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Sperandio, Vanessa

Sp36c Caracterizacao da proteina de membrana externa OmpU como uma
possivel adesina de Vibrio cholerae, clonagem e sequenciamento
parcial do seu gene / Vanessa Sperandio. -- Campinas, SP:
[s.n.], 1995.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Colera. 2. Proteinas da membrana. 3. Bacterias patoge-
nicas. I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

DEDICO

Ao Pazelo pelo carinho, compreensão,
força e amor. E aos meus pais Lesi
Corrêa e Nardir A. Sperandio por todo o
seu apoio.

AGRADECIMENTOS:

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira por sua orientação, por tudo o que ele me ensinou e todo o apoio que ele sempre me deu dentro e fora do laboratório.

Ao Prof. Dr. James B. Kaper por ter me recebido em seu laboratório, me orientado e me oferecido todas as condições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge A. Girón por sua orientação, ajuda e amizade no decorrer deste trabalho que foram essenciais para o desenvolvimento deste.

Ao Prof. Dr. Adilson Leite por sua participação nas pré-bancas e bancas desta tese e por sua ajuda inestimável com a triagem do banco genômico para obtenção do clone completo de OmpU.

Ao Prof. Dr. Luiz R. Trabulsi por sua participação na banca desta tese e por todo o apoio profissional que vem me oferecendo.

A Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato pela participação no exame de qualificação, pré-banca e banca desta tese, bem como pela amizade e apoio que sempre me deu.

A Profa. Dra. Lucila C. Ricci pela sua participação na pré-banca e banca desta tese.

A Profa. Dra. Marlene B. Serafim pela sua participação como suplente na banca desta tese.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pela sua participação como suplente no exame de qualificação e banca desta tese, bem como por sua amizade e facilidades concedidas em seu laboratório.

As Profas. Dras Maricilda e Laura por sua participação no exame de qualificação.

Aos Prfs. Dr. Holf e Ivanhoé pela sua participação como suplentes no exame de qualificação.

A todo o pessoal do laboratório: Fabiana, Alessandra, Sérgio e Paulo, por toda a sua amizade e ajuda.

A todo o pessoal do laboratório no CVD: Jorge, Jane, Tim, Karen, Tom, Tony, Cara, Shelly, Laurie, Oscar and Francesco por sua amizade e ajuda.

Ao André L. Vettore de Oliveira por toda a sua ajuda e paciência para a obtenção do clone de OmpU.

Ao Dr Fernando do laboratório de Genética Molecular do Departamento de Hematologia FCM, pelas facilidades concedidas em seu laboratório para a confirmação do clone de OmpU.

A Mônica, Silvana e Patrícia (Tita) do Departamento de hematologia por toda a sua amizade e ajuda com o sequenciamento para confirmação de OmpU.

A Tereza, secretária do Depto. de Genética e Evolução por toda a sua ajuda e boa vontade no preparo de toda a parte burocrática para a defesa desta tese.

A Cia pelo empréstimo de seu apartamento em Campinas e por toda a sua amizade.

A Eneida por ter me recebido em seu apartamento e por toda a sua amizade.

A Marie Anzengrouber por ter me recebido em sua casa em Baltimore e ter sido além de uma grande amiga uma segunda mãe para mim no exterior.

A Cleide e Alessandra por sua amizade e ajudas laboratoriais.

Aos meus pais Lesi Corrêa e Nardir A Sperandio e ao tio Léo por todo apoio e carinho que sempre me deram.

Ao Pazelo por toda a sua compreensão, carinho, força e a inestimável ajuda com esse Microcomputador que não me obedece, agradeço com todo o meu amor.

ÍNDICE:

-1.Introdução	1
-2.Revisão Bibliográfica	3
2.2.Aspectos históricos da cólera	3
2.3.Isolamento e identificação	5
2.3.1.Subtipagem de <i>Vibrio cholerae</i>	7
2.3.1.1.Sorotipagem	7
2.3.1.2.Biotipagem	9
2.3.2.Isolamento, cultivo e identificação	10
2.4.Fatores de virulência	13
2.4.1.Toxinas	13
2.4.1.1.Toxina colérica	14
2.4.1.2.Outras toxinas produzidas por <i>V.cholerae</i>	23
2.4.2.Fatores de colonização	27
2.4.2.1. <i>Pilus</i> correulado com a toxina colérica (TCP)	28
2.4.2.2.Fator acessório de colonização (ACF)	30
2.4.2.3.Hemaglutinina resistente a manose e fucose	31
2.4.2.4.Hemaglutinina sensível a manose	31
2.4.2.5. <i>Pilus</i> codificado no "core"	32
2.4.2.6.Hemaglutinina/protease solível	32
2.4.2.7.Outros <i>pili</i>	33
2.4.2.8.Proteínas de membrana externa (OMPs)	34
2.4.2.9.Motilidade e flagelo	35
2.4.2.10. Lipopolissacarídeos (LPS)	35
2.4.2.11.Cápsula de lipopolissacarídeo	35
2.4.2.12.Outros fatores	36
2.5.Regulação de mecanismos de virulência	36
2.5.1.O regulon ToxR	37
2.5.2.Regulação de Ferro	39

2.5.3.Regulação <i>in vivo</i>	41
2.6.Vacinas	41
-3.Objetivos	45
-4.Material	46
4.1.Meios de cultura	48
4.1.1.LB	48
4.1.2.LA	48
4.1.3.CYE	48
4.1.4.SOC	49
4.1.5.Meio mínimo	49
4.1.5.1.Solução de sais 10X	49
4.1.5.2.Meio mínimo	49
4.1.6.Meio LBM	50
4.2.Soluções e Tampões	50
4.2.1.Tampão HMNS	50
4.2.2.Soluções para SDS-PAGE	50
4.2.2.1.Solução de acrilamida	50
4.2.2.2.Tampão do gel de resolução	50
4.2.2.3.Tampão do gel de empacotamento	51
4.2.2.4.Tampão Tris-Glicina	51
4.2.2.5.Tampão de ressuspensão das amostras	51
4.2.2.6.Gel de resolução	52
4.2.2.7.Gel de empacotamento	53
4.2.3.Soluções para coloração com Coomassie blue	54
4.2.3.1.Solução de Coomassie blue	54
4.2.3.2.Solução de descoloração de Coomassie blue	54
4.2.4.Padrões de pesos moleculares de proteínas	55
4.2.4.1.Padrões de alto peso molecular	55
4.2.4.2.Padrões de baixo peso molecular	56

4.2.5. Tampão de transferência	57
4.2.6. Tampão de transferência CAPS	57
4.2.7. Coloração com amido black	57
4.2.7.1. Solução de amido black	57
4.2.7.2. Solução de descoloração de amido black	57
4.2.8. Tampão PBS	58
4.2.9. Soluções para eletroeluição de proteínas	58
4.2.9.1. 0,2M Tris/Acetato (pH7,4), 1%SDS	58
4.2.9.2. Tampão de corrida	58
4.2.9.3. 0,2M Bicarbonato de sódio, 0,02%SDS	59
4.2.10. Tampão carbonato	59
4.2.11. Soluções para extração de plasmídio	59
4.2.11.1. Solução I	59
4.2.11.2. Solução II	59
4.2.11.3. Solução III	59
4.2.12. Tampão tris-borato	60
4.2.13. Stop mix (5X)	60
4.2.14. Tampão TE	60
4.2.15. Tampão TES	60
4.2.16. Solução de Denhardt's (10X)	60
4.2.17. SSC (1X)	61
4.2.18. Tampão de neutralização	61
4.2.19. Solução de denaturação para Southern-blot	61
4.2.20. Solução de hibridização para sondas marcadas por extensão por "primer" aleatório	61
4.2.21. Solução de lavagem para sondas marcadas por extensão por "primer" aleatório	62
4.2.22. Enzimas e tampões para biologia molecular	62
4.2.23. Soluções para extração de DNA genômico	62

4.2.23.1. Tampão de lise	62
4.2.24. Tampões de transformação	62
4.2.24.1 Tampão TfbI	62
4.2.24.2 Tampão TfbII	63
4.2.25. Soluções para sequenciamento de DNA	63
4.2.25.1. Solução de denaturação	63
4.2.25.2. Solução de neutralização	63
4.2.25.3. Gel de sequenciamento 7,2%	63
4.2.15.4. Kit de sequenciamento	63
4.2.26. Tampão de adesão para purificação de fragmentos F(ab) ₂	64
4.2.27. Tampão de eluição para purificação de fragmentos F(ab) ₂	64
4.2.28. Tampão de digestão para purificação de fragmentos F(ab) ₂	64
4.2.29. Solução SM	64
-5. Métodos	65
5.1. Extração de proteínas de membrana externa	65
5.2. Extração de proteínas totais	65
5.3. Eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE	66
5.4. Coloração de Coomassie blue	66
5.5. Purificação de proteínas para sequenciamento amino-terminal	66
5.6. Sequenciamento amino-terminal	67
5.7. Western-blotting	67
5.8. Purificação de proteínas para obtenção de antissoro policlonal	68
5.9. Purificação de proteínas por eletroeluição	68
5.10. ELISA	69
5.11. Testes de adesão de OmpU à fibronectina, colágeno, laminina e ao tripeptídeo Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD)	69
5.12. Testes de inibição de adesão de OmpU a fibronectina e RGD	70
5.13. Cultura de células HeLa, Int-407 e HEp-2	71

5.14. Teste de adesão das amostras de <i>V.cholerae</i> às células HeLa, Int-407 e HEp-2	71
5.15. Inibição da adesão das amostras de <i>V.cholerae</i> às células HeLa, Int-407 e HEp-2 com os antissoros anti-OmpU e anti-TcpA	72
5.16. Preparo de fragmentos F(ab) ₂ do antissoro anti-OmpU	72
5.17. Inibição da adesão de amostras de <i>V.cholerae</i> às células HEp-2 com fragmentos F(ab) ₂ do antissoro anti-OmpU	74
5.18. Inibição da adesão de amostras de <i>V.cholerae</i> às células HEp-2 com fibronectina e RGD	74
5.19. Porcentagem de aderência de diferentes linhagens de <i>V.cholerae</i> às células HEp-2	75
5.20. Teste de proteção passiva em camundongos recém-nascidos contra <i>V.cholerae</i> com o antissoro anti-OmpU e os fragmentos F(ab) ₂ de anti- OmpU	76
5.21. Teste de inibição de colonização intestinal de camundongos recém- nascidos por <i>V.cholerae</i> com o antissoro anti-OmpU	76
5.22. Extração de DNA genômico	77
5.23. Extração de DNA genômico por colunas QUIAGEN	77
5.24. Extração de plasmídios em larga escala	78
5.25. Purificação plasmidial por gradiente de cloreto de cério	78
5.26. Extração de plasmídios em pequena escala	79
5.27. Extração de plasmídios por colunas QUIAGEN	79
5.28. Obtenção de peptídeos internos de OmpU	80
5.29. Reação de PCR	80
5.30. Purificação de fragmentos de PCR por coluna ultra free MC	80
5.31. Purificação de fragmentos de PCR por colunas Wizard	80
5.32. Reparo de 3' "overhang" do produto de PCR para gerar extremidades "blunt"	81
5.33. Southern-blot	81

5.34.Marcação radioativa de fragmento de DNA por extensão através de "primer" aleatório	81
5.35.Hibridização com sondas moleculares marcadas por extensão através de "primer" aleatório	82
5.36.Sequenciamento de DNA	82
5.37.Transformação	83
5.38.Mutagênese por inserção	84
5.39.Mutagênese através de inserção do transposon <i>TnphoA</i>	85
5.40.Triagem de banco genômico em λ ZAP	86
5.41.Extração de DNA de fagos em larga escala	87
-6.Resultados	89
6.1.Perfil eletroforético das proteínas de membrana externa (OMPs) de diferentes amostras de <i>V.cholerae</i> e <i>E.coli</i>	89
6.2.Especificidade do antissoro anti-OmpU	90
6.3.Reconhecimento das proteínas de membrana externa das amostras CVD101 e 395 ToxR ⁻ de <i>V.cholerae</i> por soros de voluntários humanos infectados com as amostras 395 e E7946 de <i>V.cholerae</i>	96
6.4.Análise amino-terminal da proteína de membrana externa OmpU	101
6.5.Western-blot das OMPs das amostras de <i>V.cholerae</i> CVD101, DH5 α de <i>E.coli</i> e E2348 de <i>E.coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC) contra o antissoro monoclonal anti-filamento hemaglutinina de <i>Bordetella</i> <i>pertussis</i>	101
6.6.Adesão de OmpU à fibronectina, colágeno, laminina e RGD	104
6.7.Experimentos de adesão e inibição de adesão de amostras de <i>V.cholerae</i> a cultura de células epiteliais	109
6.8.Experimentos de proteção passiva em camundongos recém-nascidos a <i>V.cholerae</i> com antissoro anti-OmpU r fragmentos F(ab) ₂ de anti- OmpU	113

6.9.Experimentos de inibição de aderência intestinal em camundongos recém-nascidos de <i>V.cholerae</i> com antissoro anti-OmpU	115
6.10.Obtenção de peptídeos internos de OmpU	117
6.11.Reação de PCR para a obtenção de uma sonda molecular para <i>ompU</i>	117
6.12.Clonagem do fragmento de PCR de 686pb em pBluescript e seu sequenciamento	118
6.13.Utilização do fragmento de <i>ompU</i> como sonda molecular	118
6.14.Triagem do banco genômico de <i>V.cholerae</i> 395 em λ ZAPII com a sonda de <i>ompU</i>	124
6.15.Mutagênese com o transposon <i>TnphoA</i>	124
6.16.Mutação de <i>ompU</i> por inserção	125
-7.Discussão	127
-8.Resumo	137
-9.Summary	139
-10.Referências bibliográficas	140

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS:

-Tabela 1. Amostras utilizadas	46
-Tabela 2. Plasmídios utilizados	47
-Tabela 3. Adesão e inibição de adesão de diferentes amostras de <i>V.cholerae</i> e <i>E.coli</i> às células HEp-2	111
-Tabela 4. Porcentagem de aderência do inóculo total de <i>V.cholerae</i> às células HEp-2 após incubação por 30 minutos a 37°C	112
-Tabela 5. Teste de proteção contra <i>V.cholerae</i> em camundongos recém-nascidos com antissoro anti-OmpU e fragmentos F(ab) ₂ de anti-OmpU.	114
-Tabela 6. Inibição da colonização intestinal em camundongos recém-nascidos por <i>V.cholerae</i> com antissoro anti-OmpU.	116
-Figura 1. A) Perfil eletroforético das proteínas de membrana externa de amostras de <i>V.cholerae</i> e <i>E.coli</i> em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie blue. B) Western-blot de proteínas de membrana externa de <i>V.cholerae</i> e <i>E.coli</i> contra o antissoro anti-OmpU.	92
-Figura 2. Eletroforese das proteínas de membrana externa de <i>V.cholerae</i> KB207 crescido a 15°C e 37°C por 18 horas em meio CYE, em gel SDS-PAGE 2,5% corado com Coomassie blue.	93
-Figura 3. Provas de ELISA com placas sensibilizadas com as proteínas de membrana externa das amostras de <i>V.cholerae</i> CVD101 e 395 ToxR ⁻ contra o antissoro anti-OmpU.	94
-Figura 4. Western-blot das proteínas de membrana externa das amostras 395 de <i>V.cholerae</i> e DH5α de <i>E.coli</i> , aquecidas em diferentes temperaturas por 5 minutos contra o antissoro anti-OmpU.	95

- Figura 5. Prova de ELISA das placas sensibilizadas com as proteínas de membrana externa da amostra de *V.cholerae* CVD101 em diferentes diluições contra os soros de voluntários humanos imunizados contra as linhagens de *V.cholerae* 395 e E7946, pré e pós imunização. 98
- Figura 6. Prova de ELISA das placas sensibilizadas com as proteínas de membrana externa das amostras de *V.cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻, contra os soros de um voluntário humano imunizado contra a linhagem de *V.cholerae* 395, pré e pós imunização. 99
- Figura 7. Western-blot das proteínas de membrana externa (OMPs) da amostra de *V.cholerae* CVD101 contra os soros de voluntários humanos imunizados com as linhagens de *V.cholerae* 395 e E7946, pré e pós imunização. 100
- Figura 8. Western-blot das proteínas de membrana externa das amostras de *V.cholerae* CVD101 e *E.coli* DH5 α e das proteínas totais da amostra E2348/69 de EPEC contra o antissoro monoclonal X3C anti-filamento-hemaglutinina de *Bordetella pertussis*. 103
- Figura 9. Provas de ELISA com placas sensibilizadas com fibronectina da adesão de OmpU das amostras de *V.cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻ à fibronectina. 105
- Figura 10. Provas de ELISA com placas sensibilizadas com RGD da adesão de OmpU das amostras de *V.cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻ a RGD. 106
- Figura 11. Adesão de OmpU da amostra de *V.cholerae* CVD101 a fibronectina, RGD, laminina e colágeno. 107
- Figura 12. Modelo proposto de adesão de OmpU à fibronectina e RGD. 108
- Figura 13. A) Adesão de *V.cholerae* 395 a células HEp-2.
B) Inibição da adesão de *V.cholerae* 395 a células HEp-2 pelo antissoro anti-OmpU. 110
- Figura 14. Reação de PCR para obtenção da sonda *ompU* e a clonagem do fragmento amplificado em pBluescript. 119

- Figura 15. Produto da reação de PCR do DNA genômico de *V.cholerae* 395
utilizando como primers os oligonucleotídeos da região N-terminal e Pep4
de *ompU*. 120
- Figura 16. A) Gel de agarose 0,7% da ligação do produto de PCR com o plasmídeo
pBluescript.
B) Gel de agarose 0,7%
C) Southern blot hibridizado com o produto de PCR 121
- Figura 17. Sequência de DNA de parte do gene *ompU* pela reação de PCR (item
5.29) e clonado em pBluescript. Os resíduos de aminoácidos em cor de
rosa são derivados das sequências N-terminais de peptídeos internos de
OmpU. 122
- Figura 18. A) Gel de agarose do DNA genômico de *V.cholerae* 395 digerido com
diferentes enzimas de restrição.
B) Southern-blot do DNA genômico de *V.cholerae* 395 digerido com
diferentes enzimas de restrição hibridizado com a sonda de PCR (N-
terminal e pep4 de *ompU*). 123
- Figura 19. Southern-blot de pVS12 digerido com diferentes enzimas de restrição
hibridizado com a sonda *ompU*. 126

LISTA DE ABREVIACÕES:

- OMP= "Outer membrane protein"; Proteína de membrana externa
- CT= "Cholera toxin"; Toxina colérica
- ZOT= "*Zonula occludens* toxin"; Toxina de *Zonula occludens*
- ACE= "Accessory cholera enterotoxin"; Toxina colérica acessória
- ST= "Thermostable enterotoxin"; Toxina termoestável
- LT= "Thermolabile enterotoxin"; Toxina termolábil
- NCT= "New cholera toxin"; Nova toxina colérica
- ETEC= *E.coli* enterotoxigênica
- EPEC= *E.coli* enteropatogênica
- TCP= "Toxin coregulated pilus"; *Pilus* coregulado com a toxina colérica
- ACF= "Accessory colonization factor"; Fator acessório de colonização
- MFRHA= "Mannose-Fucose-resistant hemagglutinin"; Hemaglutinina resistente a manose e fucose.
- MSHA= "Mannose-sensitive hemagglutinin"; Hemaglutinina sensível a manose
- CEP= "Core encoded pilus"; *Pilus* codificado no "core"
- HA= Hemaglutinina
- FHA= "Filamentous hemagglutinin"; Filamento hemaglutinina
- CF= "Cystic fibrosis"; Fibrose cística
- PGE= Prostaglandina
- ENS= Sistema nervoso entérico
- VIP= Peptídeo intestinal vasoativo
- 5-HT= 5-hidroxitriptamina
- IL= interleucina
- PD= Potencial elétrico diferencial
- ZO= *Zonula occludens*

1.INTRODUÇÃO:

A bactéria Gram-negativa *Vibrio cholerae* causa a cólera através da colonização intestinal e da produção de uma potente toxina, a toxina colérica (CT). Embora a toxina responsável pela forte diarreia característica da cólera, CT, esteja bem caracterizada, as adesinas responsáveis pela colonização intestinal ainda não estão completamente estudadas. Vários fatores potenciais de aderência foram descritos em *V. cholerae*, e, entre eles, estão proteínas de superfície, hemaglutininas e diversos tipos de *pili* (Ehara *et al.*, 1987; Hall *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1987; Tweedy *et al.*, 1988; Nakasone and Iwanaga, 1993). Foi demonstrado que o pilus corregulado com a toxina colérica (TCP) é essencial para a colonização intestinal da linhagem de *V.cholerae* 395 do biotipo clássico em camundongos e no homem (Taylor *et. al.*, 1987; Herrington *et. al.*, 1988) e a hemaglutinina resistente a manose (MRH) é essencial para a função de colonização no biotipo El Tor (Jonson *et. al.*, 1991). A colonização intestinal por *V.cholerae* parece ser um processo complexo que envolve a expressão temporal de vários fatores.

A produção de toxina em *V.cholerae* é parte de uma resposta regulada na qual vários outros fatores de virulência em adição à toxina colérica são expressos sob o controle de um regulador central, ToxR (Di Rita, 1992). Foram descritos cerca de dezessete genes ativados por ToxR (Peterson and Mekalanos, 1988). Neste regulon encontram-se os genes *ctx* que codificam a toxina colérica (Miller and Mekalanos, 1984), os genes que codificam o fator de colonização TCP (Taylor *et al.*, 1987), um fator de colonização acessório (ACF) (Peterson and Mekalanos, 1988), e as proteínas de membrana externa OmpU e OmpT (Miller and Mekalanos, 1988). A expressão de CT, TCP, OmpT e OmpU é afetada por mudanças na osmolaridade e na concentração de aminoácidos no meio de cultura, ao passo que outros fatores ambientais como modificações na temperatura e pH possuem um efeito mais pronunciado na expressão de CT e TCP do que nas proteínas de membrana externa OmpU e OmpT (Miller and Mekalanos, 1988). As subunidades protéicas de OmpU (38 kDa) e OmpT (40 kDa) são reguladas diferentemente,

sendo a expressão de OmpU regulada positivamente e de OmpT negativamente por ToxR (Miller and Mekalanos, 1988).

Enquanto alguns genes pertencentes ao regulon de ToxR como *ctx* e *tcpa* foram clonados e extensivamente caracterizados, os genes que codificam outras proteínas como OmpU não foram previamente caracterizados, sendo que as funções destas proteínas permanecem desconhecidas. Neste trabalho foi realizada a caracterização de OmpU como uma provável adesina de *V.cholerae* importante nos dois biotipos (clássico e El Tor), além de clonagem e sequenciamento parcial do gene *ompU*.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

A cólera é uma doença causada pela bactéria *Vibrio cholerae*, usualmente do sorogrupo O1. Em sua forma severa, denominada cólera *gravis*, a doença é clinicamente caracterizada pela perda de grande volume de água através de intensa diarreia que leva à desidratação. Se o tratamento não for iniciado imediatamente ao aparecimento dos primeiros sintomas pode ocorrer choque hipovolêmico, acidose e mesmo morte dos doentes, sejam estes adultos ou crianças (Koch, 1883).

Até hoje sete pandemias causadas pelo *Vibrio cholerae* foram registradas. Desde 1961, iniciou-se no sudeste asiático a sétima pandemia de cólera, sendo esta causada pelo *Vibrio cholerae* O1 do biotipo El Tor. Desde o final de 1992 tem sido registrada na Índia uma nova epidemia de cólera causada por um novo sorogrupo do *V.cholerae*, O139. Os primeiros dados epidemiológicos relacionados a este novo sorogrupo demonstram rápida disseminação da doença para países vizinhos e alta capacidade destas amostras em causar grandes surtos, demonstrando que este novo sorogrupo pode representar o agente etiológico de uma nova, oitava pandemia de cólera (Centers for Disease Control, 1993; Cholera Working Group, 1993; Public Health Laboratory service, 1993; Ramamurthy *et al.*, 1993; Swerdlow e Ries, 1993).

2.2.Aspectos históricos da cólera.

A cólera asiática é endêmica no subcontinente Indiano, em uma região centrada nos rios Ganges e Brahmaputra, desde a antiguidade (Pollizer, 1959). As epidemias de cólera ocorreram no sul da Índia com as peregrinações para o Ganges (McNeil, 1976), e desde o início do século dezenove, vêm se espalhando para o mundo. No total, ocorreram sete pandemias de cólera desde 1817 (Rabbani, 1986).

O aparecimento da cólera na Europa Ocidental gerou horror e repulsão como a peste bubônica o fez nos séculos anteriores (Spangler,1992). Respostas similares à doença ocorreram

na América do Norte na epidemia de 1832, exacerbada pelo fracasso até das mais restritas quarentenas (Rosenberg, 1962).

Meses após a introdução da cólera na Inglaterra, em 1831, reconheceu-se que o maior efeito da doença era a perda de fluidos e eletrólitos (Carpenter, 1992). A reposição de fluidos intravenosamente foi utilizada com sucesso em 1831 (Rabbani, 1986; Barua, 1988; Carpenter, 1992) mas não foi aceita pela maioria dos médicos que continuavam os tratamentos através de sangramentos e ópio. Esta situação é compreensível devido à alta mortalidade relacionada com embolia e septicemia decorrentes de infusões intravenosas (Barua, 1988).

O mais significativo avanço na prevenção da cólera ocorreu através dos estudos epidemiológicos de John Snow (Snow, 1855), em Londres, que demonstrou a ligação entre a água contaminada do canal da rua Broad e a doença. Este sanitarista também demonstrou diferença na incidência da cólera entre os compradores de água das companhias Southwark e Vauxhall, que utilizavam água de partes poluídas do rio Thames, e os da companhia Lambert, cuja água era proveniente de uma parte do rio acima do influxo de esgoto. Novas idéias visando a prevenção da cólera superaram rapidamente as idéias sobre o tratamento da doença em si, sendo o saneamento e outras medidas de saúde pública consideradas o melhor tipo de prevenção (Rosenberg, 1962).

A última grande descoberta para o entendimento da cólera durante o século dezenove foi a descrição do organismo causador da doença. Um médico italiano, Fillipo Pacini, observou, em 1853, a presença de grande número de bactérias curvadas nos fluidos intestinais de cadáveres de vítimas da cólera e a estas bactérias ele denominou *Vibrio cholerae* (Barua, 1988). Trinta anos depois, Robert Koch observou em outros trabalhos, independentemente, a mesma bactéria, a qual chamou de "Kommabazillen", nas fezes e fluidos intestinais obtidos em autópsias de vítimas da cólera. Suas primeiras observações foram realizadas na Alexandria (Koch, 1883) e posteriormente em Calcutá (Koch, 1884a), estabelecendo através de seus estudos, o caráter não invasivo da bactéria. Subsequentemente, Koch obteve culturas purificadas da bactéria (Koch, 1884b). O passo final no estabelecimento da ligação entre a bactéria e a cólera foi a demonstração de uma

doença semelhante a mesma, através do inóculo intra-duodenal da bactéria em cobaias tratadas com ópio (Koch, 1886), embora estes resultados não tenham sido aceitos universalmente na época (Barua, 1988; Finkelstein, 1988).

Após o isolamento da bactéria causadora da cólera, sucederam-se, rapidamente, várias tentativas de prevenção da doença através de vacinação, por via oral, de organismos mortos ou vivos atenuados e por inoculação de vacinas parenterais (Barua, 1988; Finkelstein, 1988).

2.3. Isolamento e identificação.

A bactéria *Vibrio cholerae* é uma espécie bem definida através de testes bioquímicos e estudos de homologia de DNA (Baumann *et al.*, 1984). Entretanto, esta espécie não é homogênea em relação ao seu potencial patogênico. Importantes distinções entre as linhagens são observadas conforme a capacidade de produção da enterotoxina colérica (toxina colérica ou CT), sorogrupo e potencial para causar epidemias. Até recentemente, a distinção entre as linhagens importantes para a saúde pública era simples, ou seja, linhagens de *Vibrio cholerae* do sorogrupo O1 que produzissem CT eram associadas com cólera epidêmica e todos os outros membros da espécie eram não patogênicos ou patógenos ocasionais. Entretanto, devido a recente epidemia de cólera por linhagens do sorogrupo O139, as distinções anteriores não são mais válidas. Existem, portanto, atualmente, dois sorogrupos, O1 e O139, associados com a doença epidêmica, sendo que dentro destes sorogrupos encontram-se linhagens que não produzem CT, e que, portanto, não estão envolvidas em epidemias. Da mesma forma existem linhagens de outros sorogrupos, que não O1 e O139, que são claramente patogênicas através da produção de CT ou de outros fatores de virulência. Entretanto, nenhum destes outros sorogrupos foi associado como causa de grandes epidemias ou pandemias extensas. Desta forma, para saber a importância na saúde pública de isolados de *Vibrio cholera*, deve-se não só determinar a espécie como também identificar duas propriedades: a produção de toxina colérica e o sorogrupo (O1 ou O139) (Kaper *et al.*, 1994).

Amostras de *Vibrio cholerae* do sorogrupo O1, produtoras de CT têm sido a muito tempo associadas com epidemias e pandemias de cólera. Este sorogrupo pode ser subdividido nos sorotipos Inaba, Ogawa e um terceiro raramente isolado que é o Hikojima (Gustafsson e Holme, 1985). Por outro lado, *V.cholerae* O1 também pode ser subdividido em dois biotipos: clássico e El Tor (Baumann *et al.*, 1984). Todas as combinações podem ser encontradas, como linhagens Clássicas Inaba ou Ogawa e linhagens El Tor Inaba e Ogawa .

Amostras de *Vibrio cholerae* não-O1 e não-O139 pertencentes aos sorogrupos O2 a O138 são normalmente consideradas não epidêmicas e foram divididas nestes sorogrupos conforme o seu antígeno lipopolissacarídeo somático (LPS). A maioria destas linhagens não produz toxina colérica e não está associadas com diarreia epidêmica (Morris, 1990). Estas linhagens são ocasionalmente isoladas de casos de diarreia e, também, de uma variedade de infecções extraintestinais como no ouvido, urina e fluido cerebrospinal (Morris, 1990; Morris e Black, 1985; Morris *et al.*, 1981; Hughs *et al.*, 1978). São regularmente encontradas em ambientes estuarinos e infecções causadas por estas linhagens são normalmente de origem ambiental (Morris, 1990). Embora a maioria das linhagens não-O1 e não-O139 não produza CT, algumas linhagens produzem outras toxinas (ST, LT, "Shiga-like", etc...); sendo que para a maioria destas linhagens os mecanismos de patogenicidade são desconhecidos.

A simples distinção de *V.cholerae* O1 e não-O1 foi considerada obsoleta no início de 1993 quando apareceram os primeiros dados sobre uma nova epidemia de uma doença tipo cólera que havia surgido na Índia oriental e em Bangladesh (Albert *et al.*, 1993). No início, o organismo responsável pela epidemia foi reconhecido apenas como *V.cholerae* não-O1 por não aglutinar com o antissoro O1. Entretanto, novas pesquisas revelaram que este organismo não pertencia a nenhum dos sorogrupos O previamente descritos para *V.cholerae*, mas a um novo sorogrupo designado O139 e sinônimo de "Bengal" devido ao local de origem desta linhagem (Shimada *et al.*, 1993). Em geral, este organismo parece ser um híbrido entre sorogrupos O1 e não-O1. Quanto a características de virulência, como produção de CT e produção do fator de colonização TCP, *V.cholerae* O139 é indistinguível do típico *V.cholerae* El Tor O1 (Hall *et al.*, 1993).

Entretanto, este organismo não produz LPS O1, não possui parte do material genético para a produção do antígeno O1 (Manning *et al.*, 1994) e, como várias linhagens não-O1, este organismo possui cápsula (Johnson *et al.*, 1993).

2.3.1.Subtipagem de *Vibrio cholerae*.

2.3.1.1.Sorotipagem.

O principal antígeno de superfície empregado na caracterização de *V.cholerae* é o antígeno O. Este antígeno é termoestável e é composto de um homopolímero do amino ácido D-perosamina ligado a um açúcar (4-amina-4,6-dideoxi-D-manose) no qual os grupos amino são acilados pelo ácido 3-dideoxi-L-tetronico (Kenne *et al.*, 1982; Manning *et al.*, 1994; Redmond, 1979). Os diferentes grupos O são referidos como sorogrupos (Sakazaki, 1992). O antígeno rugoso (R) de *V.cholerae* é idêntico em todas as linhagens (Shimada e Sakazaki, 1973). A forma R (rugosa) é difícil de ser distinguida da forma lisa (S) através de observação da morfologia de colônia, mas pode ser identificada utilizando-se o antissoro anti-R (Sakazaki, 1992). Além destes antígenos, o *V.cholerae* apresenta um antígeno flagelar (H), sendo que o valor deste antígeno na identificação das diferentes amostras é limitado devido a presença de epítomos comuns nos flagelos de todas as espécies de *Vibrio* (Shinoda *et al.*, 1976; Simonson e Siebling, 1988). Ao contrário de outras espécies entéricas, para as quais o termo sorogrupo normalmente significa uma combinação de antígenos O e H, para *V.cholerae* sorogrupo se refere a diferentes formas antigênicas do antígeno O.

Existem vários sistemas de classificação do antígeno O de *V.cholerae*. O sistema mais utilizado é o de Sakazaki e Shimada (1977) que utiliza antissoros preparados contra bactérias mortas por aquecimento. Este sistema possui 139 diferentes grupos O contando com o sorogrupo O139, recentemente determinado (Shimada *et al.*, 1993).

O sorogrupo O1 é dividido em 3 sorotipos ou subtipos correspondentes a formas antigênicas diferentes denominadas Inaba, Ogawa e Hikojima. O antígeno O de *V.cholerae* O1 consiste de 3 fatores designados A, B e C; o fator A deve ser o homopolímero de D-perosamina mas a natureza dos fatores B e C é desconhecida (Stroeher *et al.*, 1992). As diferenças entre os sorotipos são amplamente quantitativas. Sorotipos Ogawa produzem os antígenos A e B e uma pequena quantidade do C, enquanto sorotipos Inaba produzem somente antígenos A e C (Sakazaki, 1992). Antissoros específicos para os sorotipos Inaba ou Ogawa são preparados através da absorção do antissoro de um com o outro sorotipo. O sorotipo Hikojima contém todos os 3 fatores em quantidades iguais, reagindo com antissoros Inaba e Ogawa. O sorotipo Hikojima é raro e instável e não é reconhecido por alguns autores (Kelly *et al.*, 1991).

Demonstrou-se que as linhagens de *V.cholerae* O1 mudam de sorotipo entre Inaba e Ogawa (Sack e Miller, 1969). Esta conversão é usualmente irreversível em laboratório e ocorre mais frequentemente na direção de Ogawa para Inaba (Richardson e Parker, 1985). A análise de sequência de DNA dos genes (*rfb*) que codificam o antígeno O1 revelaram que as sequências para Inaba e Ogawa são quase idênticas (Stroeher *et al.*, 1992). A conversão de Ogawa para Inaba pode resultar de uma variedade de mudanças. Entre elas, a modificação de um único par de base no gene *rfbT* que crie um códon de terminação prematuro neste gene. As linhagens Inaba são assim mutantes *rfbT* e esta conversão de Ogawa para Inaba pode ser feita por pressão seletiva através de resposta imune anti-Ogawa durante a infecção (Stroeher *et al.*, 1992). Um estudo recente da conversão de sorotipos indicou que uma linhagem Ogawa, também pode surgir a partir de duas mutações: uma mutação de deleção no gene *rfbT* produzindo a inicial conversão de Ogawa para Inaba e uma segunda mutação de inserção que venha a restaurar a fase aberta de leitura original de *rfbT* e assim restaur o sorotipo Ogawa (Fields *et al.*, 1993)

2.3.1.2.Biotipagem.

Historicamente as linhagens de *V.cholerae* O1 têm sido divididas em 2 biotipos, clássico e El Tor. Amostras isoladas até a sexta pandemia eram quase que exclusivamente do biotipo clássico, sendo que até a sétima pandemia amostras isoladas do biotipo El Tor eram associadas com casos esporádicos de diarreia (Pollitzer, 1959). Porém nesta pandemia, a maioria das amostras de *V.cholerae* isoladas, são do biotipo El Tor. Nos últimos anos, o único país onde foram isoladas linhagens clássicas a partir de casos de diarreia foi Bangladesh (Siddique *et al.*, 1991).

As características utilizadas para distinguir os biotipos El Tor e clássico são: capacidade de hemolizar eritrócitos de carneiro, característica encontrada somente no biotipo El Tor (Barrett e Blake, 1981); capacidade de aglutinar eritrócitos de galinha, que também só ocorre em linhagens El Tor; reação de Voges-Proskauer que é positiva para o biotipo El Tor e negativa para o biotipo clássico; sensibilidade a polimixina B (50U), sendo o biotipo clássico sensível e o El Tor resistente e a susceptibilidade a lise pelos bacteriófagos clássico IV (Mukerjee, 1963) e FK (Takeya *et al.*, 1981), sendo o biotipo clássico lisado pelos dois fagos ao passo que El Tor não é lisado por nenhum deles. Um outro teste para diferenciar os biotipos é realizado através de hibridizações com sondas de oligonucleotídeo sintético de sequências internas do gene que codifica a hemolisina, uma vez que este gene é diferente nos dois biotipos (Alm e Manning, 1990). Uma outra forma de biotipagem, recentemente descrita, utiliza-se das diferenças nas sequências de DNA entre os genes que codificam o pilus TCP em linhagens clássicas e El Tor (Keasler e Hall, 1993), e através de reações de polimerase em cadeia (PCR ou "Polimerase chain reaction") produz fragmentos amplificados de tamanhos diferentes para os biotipos clássico e El Tor. Os fragmentos de restrição polimórficos (RFLP ou "Restriction Fragment Length Polymorphisms") dos genes de RNA ribossômico também são diferentes entre os dois biotipos podendo distingui-los (Koblavi *et al.*, 1990; Popovic *et al.*, 1993).

Por vários anos, a técnica de tipagem por fagos foi utilizada para diferenciar linhagens de *V.cholerae* O1 do mesmo biotipo e sorotipo. O uso desta técnica é, porém, limitado pela não disponibilidade de um set de fagos de *Vibrio* bem caracterizados, sendo restrita a um pequeno número de laboratórios de referência (Kaper *et al.*, 1994).

Variações nos genes que codificam a toxina colérica (*ctx*) e as sequências de DNA que flanqueiam estes têm ajudado no estudo da epidemiologia de *V.cholerae*. Kaper *et al.* (1982; 1986) examinaram RFLPs do locus *ctx* para estudar a relação entre linhagens de *V.cholerae* isoladas no Golfo dos Estados Unidos.

A análise eletroforética de enzimas multilocos (MEE) (ou análise de Zymovar) tem sido aplicada ao estudo de divergências de muitas espécies de bactérias (Selander *et al.*, 1986). Foi encontrada variação na mobilidade de diferentes enzimas entre linhagens de *V.cholerae* que podem ser divididas em múltiplos tipos eletroforéticos (ETs) e distinguir linhagens clássicas e El Tor (Momen e Sales, 1985; Wachsmuth *et al.*, 1994).

2.3.2.Isolamento, cultivo e identificação.

As bactérias do gênero *Vibrio* são classificados na família *Vibrionaceae*. As bactérias da espécie *V.cholerae* são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, são oxidase positivos e são móveis através de um único flagelo polar. Amostras de *V.cholerae* têm seu crescimento inibido pelo composto O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina) mas resistência a este composto têm aumentado, juntamente com a resistência a trimetopreno-sulfametoxazole (Nath e Sanyal, 1992; Ramamurthy *et al.*, 1992). *V.cholerae* O139 é resistente a O/129 (Albert *et al.*, 1993).

Como outras espécies de *Vibrio*, o crescimento de *V.cholerae* é estimulado pela adição de NaCl 1%. Entretanto, uma diferença importante das outras espécies de *Vibrio* é a capacidade de *V.cholerae* de crescer em meio nutriente sem NaCl. *Vibrio mimicus* também cresce nestas condições, mas pode ser diferenciado de *V.cholerae* por não fermentar sacarose (Heiberg, 1936).

Um teste fundamental para a identificação de *V.cholerae* de *Enterobacteriaceae* é o teste de oxidase, uma vez que o *V.cholerae* é oxidase positivo e membros da família *enterobacteriaceae* são oxidase negativos. (Kelly *et al.*, 1991). A confirmação para sorogrupo O1 de *V.cholerae* é realizada através da aglutinação com antissoro polivalente contra o antígeno O1 (Rahman *et al.*, 1989). Um teste baseado em anticorpos monoclonais e co-aglutinação para testar colônias isoladas ou amostras de diarreia é realizado através do kit "Cholerae SMART" produzido comercialmente (New Horizons Diagnostics Corp., Columbia, MD). Organismos oxidase positivos que aglutinam antissoro O1 devem ser considerados *V.cholerae* O1 e, a seguir, mandados para um laboratório de referência de saúde pública para a confirmação (Kelly *et al.*, 1991).

Hoje o antissoro contra O139 é produzido em vários laboratórios de referência e logo deverá ser comercialmente disponível.

Sondas moleculares não são utilizadas de forma rotineira para a identificação de *V.cholerae* devido à facilidade de identificação desta espécie por métodos convencionais, entretanto, elas têm sido extremamente úteis na distinção de linhagens que contêm os genes que codificam a toxina colérica (*ctx*) daquelas que não contêm estes genes. A primeira aplicação de sondas moleculares para a distinção entre linhagens toxigênicas e não toxigênicas utilizou sequências que codificam a enterotoxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica que apresenta grande homologia com CT (Kaper *et al.*, 1981). Foram desenvolvidos grande número de sondas de fragmentos de DNA e de oligonucleotídeos sintéticos para a detecção de sequências *ctx* (Popovic *et al.*, 1994). Foram utilizadas duas sondas de oligonucleotídeos sintéticos utilizando marcação não radioativa para identificar *V.cholerae* O1 toxigênico de placas de isolamento. Uma sonda de oligonucleotídeo de *ctx* marcada com fosfatase alcalina descrita por Wright *et al.* (1992) foi utilizada para triagem de colônias crescidas em meio não seletivo, inoculado com amostras de fezes de voluntários humanos experimentalmente inoculados com *V.cholerae* O1 toxigênico. Esta sonda detectou com sucesso todas as amostras de fezes com $>10^3$ *V.cholerae* por grama de fezes. Outra sonda de oligonucleotídeo marcada com fosfatase alcalina

foi utilizada por Yoh *et al.* (1993) para detectar genes *ctx* em amostras de fezes de um paciente retornando de um país endêmico para cólera.

A técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) também tem sido utilizada na detecção de sequências *ctx*, as quais são extremamente conservadas entre linhagens de *V.cholerae*. Shirai *et al.* (1991) desenvolveram um "set" de "primers" que amplificam uma região de 302pb e capaz de detectar até 1pg de DNA após 40 ciclos de amplificação. Estes pesquisadores também examinaram amostras de fezes de pacientes com diarreia e detectaram sequências de *ctx* por PCR em todas as amostras que eram positivas para *V.cholerae* O1 através de técnicas de cultura (Shirai *et al.*, 1991). Um estudo recente de 123 pacientes hospitalizados em Calcutá comparou as técnicas de detecção de CT por PCR com ELISAS com antissoro anti-CT e técnicas de cultura (Ramamurthy *et al.*, 1993), e a técnica de PCR mostrou-se mais sensível que a de ELISA na detecção de CT. Outros pesquisadores têm utilizado PCR para a detecção de sequências *ctx* em linhagens isoladas da epidemia de cólera na América Latina (Fields *et al.*, 1992; Varela *et al.*, 1993). A técnica de PCR tem, também, sido utilizada para a detecção de *V.cholerae* O1 toxigênico em amostras de comida (Koch *et al.*, 1993).

Entre outros testes de clássicos utilizados na detecção de *V.cholerae* destacam-se, os exames de fezes por microscopia "dark field" ou de contraste de fase. Frequentemente muitos vibrios móveis são observados no campo de visão, principalmente quando o número é superior a 10⁵ vibrios por ml de fezes. A adição de anticorpos policlonais (Greenough *et al.*, 1965) ou monoclonais (Gustafsson e Holme, 1985) contra o antígeno O1 resulta na inibição da motilidade, identificando assim *V.cholerae* O1 em 2 ou 5 minutos em cerca de 50% dos casos (Greenough *et al.*, 1965). Uma técnica utilizando anticorpos fluorescentes reativos contra O1 também tem sido utilizada para identificar *V.cholerae* O1 em amostras de fezes (Finkelstein e LaBrec, 1959; Sack e Barua, 1965) mas não é usada extensivamente devido ao alto preço do equipamento e ao grande número de organismos (10⁶-10⁷ por ml) necessários para detecção (Pal, 1992).

O rápido diagnóstico de *V.cholerae* O1 tem sido obtido por testes de coaglutinação utilizando anticorpos contra a subunidade CTB O1 (Jesudason *et al.*, 1984; Rahman *et al.*, 1989).

Um teste de ELISA para detectar CT demonstrou detectar a toxina diretamente de amostras de fezes (Ramamurthy *et al.*, 1992). Um teste de coaglutinação utilizando anticorpos monoclonais contra o antígeno O1 está disponível comercialmente (Cholera Screen, New Horizons Diagnostic Corp., Columbia, MD). Um teste modificado a partir do "kit Cholera Screen" é o "kit cholera SMART" (New Horizons Diagnostic Corp.) que consiste em um teste imunológico colorimétrico baseado em ouro coloidal (Hasan *et al.*, 1994).

2.4.Fatores de virulência.

As principais características de patogenicidade do *V.cholerae* estão bem estabelecidas. A infecção pelo *V.cholerae* começa pela ingestão de comida e/ou água contaminada. Após a passagem pela barreira ácida do estômago, o vibrio coloniza o intestino delgado através do *pilus* corregulado com a toxina colérica (TCP) e de outros fatores de colonização. A toxina colérica, produzida pelos vibrios aderidos ao epitélio intestinal, e possivelmente outras toxinas, alteram o transporte de íons das células epiteliais. A subsequente perda de água e eletrólitos causa a intensa diarreia que é característica da cólera. Embora as principais características de patogenicidade do *V.cholerae* estejam bem estabelecidas, existem, ainda, questões importantes a serem respondidas a respeito de vários aspectos da doença (Kaper *et al.*, 1994).

2.4.1.Toxinas.

O *V.cholerae* sintetiza uma série de produtos extracelulares que possuem efeitos deletérios nas células eucarióticas. A diarreia intensa e consequente desidratação característica da cólera é produzida pela toxina colérica (CT). Estudos de colera em voluntários humanos, experimentalmente infectados com *V.cholerae* O1 toxigênico (Cash *et al.*, 1974; Levine, 1980; Levine *et al.*, 1981) ou somente toxina colérica purificada (Levine *et al.*, 1983), demonstraram a grande importância da toxina colérica no estabelecimento de forte diarreia. Entretanto, linhagens

mutantes de *V.cholerae*, apresentando deleção nos genes que codificam CT, ainda foram capazes de causar diarreia pequena a moderada em muitos indivíduos (Kaper *et al.*, 1984a; Kaper *et al.*, 1984b; Levine *et al.*, 1988a; Levine *et al.*, 1988b; Mekalanos *et al.*, 1983). Este fato levou a pesquisa de toxinas adicionais que seriam produzidas por *V.cholerae*.

2.4.1.1.Toxina colérica.

A existência de uma toxina responsável pelos sintomas da cólera foi primeiramente inferida por Robert Koch que, em 1884, propôs que o agente responsável pela cólera deveria ser um "veneno especial" que agiria no epitélio intestinal e que os sintomas da cólera poderiam ser considerados como um "envenenamento" (Koch, 1884). A existência desta toxina hipotética foi demonstrada em 1959 por dois grupos independentes que trabalhavam na Índia. De *et al.* (1959) e Dutta *et al.* (1959) demonstraram que ocorria uma grande liberação de fluídos após a introdução de filtrados ou lisados de culturas de *V.cholerae* em experimentos de alça ligada de coelho. A purificação da toxina, dez anos mais tarde, por Finkelstein e LoSpalluto (1969) permitiu que diversos pesquisadores estudassem diversas características fundamentais da toxina tais como estrutura molecular, receptores e modelo de ação.

A estrutura da toxina colérica (CT) é típica do grupo de toxinas de subunidades A-B, nos quais cada subunidade possui uma função diferente. A subunidade B serve para ligar a holotoxina ao receptor da célula eucariótica e a subunidade A possui uma atividade enzimática específica que age intracelularmente. CT consiste de 5 subunidades B e uma subunidade A sendo que nenhuma das subunidades independentes são capazes de apresentar as propriedades da toxina íntegra tanto em modelos animais como em modelos de culturas celulares. A subunidade B madura possui 103 aminoácidos e tem peso molecular de 11,6kDa. A subunidade A madura tem peso molecular de 27,2kDa e é clivada proteoliticamente formando dois polipeptídeos: um polipeptídeo de 195 resíduos de aminoácidos denominado A₁ de 21,8kDa e um polipeptídeo de 45 resíduos de aminoácidos denominado A₂ de 5,4kDa. Após a clivagem proteolítica, os

peptídeos A₁ e A₂ ainda se encontram ligados por uma ponte dissulfeto antes da internalização (Gill e Rappaport, 1979). A formação de pontes de dissulfeto dentro das cadeias das subunidades A e B é catalizada pela enzima dissulfato isomerase (Yu e Keirst, 1992). Esta mesma enzima é necessária para a montagem do *pilus* TCP de *V.cholerae* que contém uma ponte de dissulfeto dentro de sua cadeia (Peek e Taylor, 1992). Outros aspectos da montagem de CT e sua secreção para o ambiente extracelular ainda não estão bem caracterizados (Hirst, 1991).

As estruturas cristalográficas de CT e de LT (toxina termo-lábil de *E. coli* enterotoxigênica), que são toxinas que apresentam grande homologia entre si, foram determinadas recentemente (Sixma *et al.*, 1991). As subunidades B formam um pentâmero através de interações do tipo β sheets entre os monômeros adjacentes. Um poro de 11 a 15 Å é formado no centro do pentâmero; a região C-terminal de A₂ localiza-se neste poro e se liga ao pentâmero das subunidades B através de inúmeras interações entre resíduos polares e com carga. A região N-terminal de A₂ é uma α -hélice que se estende para fora do pentâmero das subunidades B e interage com o peptídeo A₁. O peptídeo A₁ apresenta homologia com a região catalítica da exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* e com a toxina de difteria (Sixma *et al.*, 1991).

O receptor da toxina colérica é o gangliosídeo G_{M1} [Gal β 1-3GalNAc β 1(NeuAc α 2-3)-Glc-ceramida onde Gal é galactose, GalNAc é N-acetilgalactosamina, Glc é glicose e NeuAc é ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico)] (King e vanHeyningen, 1973; Spangler, 1992). A interação entre a toxina colérica e o receptor ocorre através da subunidade B, sendo que a adição da subunidade B (também conhecida como coleragenóide) ou de G_{M1} à alça ligada de coelho, antes da adição de CT, inibe a secreção de fluídos (King e vanHeyningen, 1973; Pierce, 1973). Anticorpos contra a subunidade B de CT, que é a subunidade imunodominante, são muito mais eficientes para neutralizar a atividade da toxina do que anticorpos contra a subunidade A (Peterson *et al.*, 1979; Peterson e Mekalanos, 1988). A ligação de CT às células epiteliais é aumentada por uma neuroaminidase (NANase) produzida por *V.cholerae*. Esta enzima, que possui um peso molecular proposto de 83kDa (Galen *et al.*, 1992), aumenta o efeito da toxina

colérica catalizando a conversão de gangliosídeos complexos em G_{M1} (Holmgren *et al.*, 1975). Existe a hipótese de que a neuroaminidase pode produzir localmente grandes concentrações do receptor G_{M1} para CT *in vivo*, aumentando, assim, a ligação de CT às células eucarióticas e levando à maior secreção de fluidos (Holmgren *et al.*, 1975; King e vanHeyningen, 1973). Experimentos utilizando NANase purificada e CT marcada com ^{125}I demonstraram que microvilosidades de intestino delgado de coelho ou cultura de células de neuroblastoma de camundongo quando expostas à NANase ligam 2 a 7 vezes mais CT do que células que não foram tratadas com NANase (Griffiths *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1982).

O alvo intracelular de CT é a adenilato ciclase, que é um dos mais importantes sistemas regulatórios das células eucarióticas. Esta enzima está envolvida na transformação de ATP em AMPc, o qual é um mensageiro intracelular fundamental para uma série de vias metabólicas. Normalmente, a adenilato ciclase é ativada ou inativada em resposta a uma variedade de estímulos. A regulação da adenilato ciclase é mediada por proteínas G, que ligam vários receptores da superfície celular com proteínas efetoras na membrana plasmática. Proteínas G são heterotrímeros compostos de 3 subunidades distintas: α (PM= 39 a 46kDa), β (PM= 37kDa) e γ (PM= 8kda) (Hepler e Gilman, 1992). A proteína G envolvida especificamente nestas reações é a proteína G_s , cuja ativação leva ao aumento da atividade da adenilato ciclase. CT cataliza a transferência de ADP-ribose de NAD para um resíduo de arginina específico na proteína $G_{s\alpha}$, resultando na ativação da adenilato ciclase e no subsequente aumento nos níveis celulares de AMPc. O AMPc ativa uma proteína kinase dependente de AMPc, promovendo fosforilação de proteínas, alterações de transporte de íons e a diarreia (Hepler e Gilman, 1992).

Depois que CT se liga às células, há período de 15 a 60 minutos até a ativação da adenilato ciclase (Gill e King, 1975). Este tempo é necessário para que o peptídeo A_1 atravesse a membrana e entre em contato com as proteínas G. A adenilato ciclase está localizada na membrana basolateral de células epiteliais intestinais polarizadas e uma série de mecanismos foram propostos para explicar como CT que se liga às microvilosidades (apical), alcança a adenilato ciclase que se encontra na membrana basolateral. A explicação mais convincente é que

CT entra na célula por endocitose e o pH baixo do compartimento endossômico permitiria a translocação da subunidade A através da membrana do endossomo. O endossomo então circula pela célula com o peptídeo A₁ ainda associado à sua membrana. Então, o peptídeo A₁ ADP-ribosila G_{sα} que está localizado na membrana basolateral. Vários pesquisadores observaram que a ação de CT é completamente inibida pela adição de brefeldina A, que é um metabólito de fungo que interfere com transporte endossômico e caminhos transcitoplasmáticos de várias células eucarióticas (Donta *et al.*, 1993; Lencer *et al.*, 1993; Lencer *et al.*, 1992; Nambiar *et al.*, 1993). Estes resultados demonstram a necessidade de um complexo de Golgi intacto para o transporte de CT intracelularmente e implica a endocitose da toxina para a entrada de CT nas células.

Uma vez na membrana basolateral, o peptídeo A₁ cataliza a transferência de ADP-ribose do NAD para um resíduo de arginina em G_{sα} através da seguinte reação: $\text{NAD} + \text{G}_{\text{s}\alpha} \rightarrow [\text{ADP-ribosil G}_{\text{s}\alpha}] + \text{nicotinamida} + \text{H}^+$ (Moss e Vaughan, 1977). A subunidade α de G_s contém um sítio de ligação de GTP e uma atividade GTPase intrínseca (Hepler e Gilman, 1992). A ligação de GTP à subunidade α leva à dissociação das subunidades α e β-γ e ao subsequente aumento da afinidade de α pela adenilato ciclase. A resultante ativação da adenilato ciclase continua até que a atividade GTPase intrínseca da proteína G hidrolise GTP para GDP, inativando, assim, a proteína G e a adenilato ciclase. A ADP-ribosilação da subunidade α pelo peptídeo A₁ de CT inibe a hidrólise de GTP para GDP, deixando a adenilato ciclase ativada constitutivamente, provavelmente por toda a vida celular (Cassel e Selinger, 1977; Kahn e Gilman, 1984).

O aumento da concentração intracelular de AMPc decorrente da ativação da adenilato ciclase por CT aumenta a secreção de Cl⁻ pelas criptas intestinais e diminui a absorção de NaCl pelas células das vilosidades (Field, 1990). O fluxo de eletrólitos para o lúmen intestinal resulta em um gradiente osmótico que causa o fluxo de água para o lúmen. A quantidade massiva de água no lúmen é maior que a capacidade de absorção do intestino resultando em diarreia. Os passos entre o aumento dos níveis de AMPc e diarreia ainda não são completamente conhecidos. Os primeiros estudos nesta área por Field *et al.* (1971; 1969) e outros pesquisadores (Finkelstein,

1992) demonstraram que CT pode concomitantemente aumentar os níveis de AMPc e o transporte de íons em um epitélio intestinal isolado em "Ussing chambers" (câmaras através das quais passa-se corrente elétrica, um pedaço de intestino de coelho é colocado nesta câmara juntamente com as bactérias patogênicas e a secreção de eletrólitos no lúmen intestinal é medida através da passagem de corrente elétrica). Uma importante resposta derivada do aumento de AMPc é a ativação da proteína kinase A que fosforila diversos substratos na célula (Chang e Rao, 1991).

Embora seja claro que canais de cloreto possam ser regulados por proteína kinases dependentes de AMPc, os canais afetados por CT ainda não são conhecidos. Existem diversos tipos de canais Cl^- na membrana apical com diferentes modos de ativação e distribuição subcelular (deJonge, 1991). Também não é certo se a proteína kinase A fosforila diretamente o canal de íons ou se fosforila um intermediário que, por sua vez, fosforila outras proteínas numa cascata. Um alvo protéico atraente é o produto do gene da fibrose cística (CF), a proteína CTFR. A proteína CTFR é um canal de Cl^- (Bear *et al.*, 1992) e possui muitas sequências que podem ser fosforiladas pela da kinase A. Ao contrário de tecidos intestinais normais, aqueles obtidos de pacientes com fibrose cística (homozigotos CF) não respondem a compostos secretogênicos de AMPc ou mediados por Ca^{+2} (Bershneider *et al.*, 1988). É interessante o fato de existir uma hipótese de que indivíduos que são heterozigotos para CF apresentarem uma vantagem seletiva sobre indivíduos homozigotos "normais" para sobreviver à cólera (Rodman e Zamudio, 1991). Os heterozigotos provavelmente possuem apenas metade dos canais de cloro respondendo à kinase. Após a infecção com *V.cholerae*, o heterozigoto CF deve ter menor secreção de cloro intestinal e, consequentemente, menor diarreia.

A ativação da adenilato ciclase conduzindo a um aumento do AMPc e à subsequente alteração no transporte de íons é o modelo "clássico" aceito para CT. Entretanto, dados de outros grupos sugerem que os níveis elevados de AMPc e a subsequente ativação da proteína kinase A não são suficientes para explicar todos os efeitos secretórios de CT. Existem evidências de que

prostaglandinas e o sistema nervoso entérico estejam envolvidos na resposta à CT em adição ao mecanismo da adenilato ciclase.

Vários estudos conectaram prostaglandinas com a patogenicidade de cólera (Bennett, 1971; Beubler *et al.*, 1979; Peterson e Ohno, 1989). Observou-se que pacientes de cólera, em estado secretório avançado, possuíam concentrações elevadas de prostaglandina PGE_2 no jejuno, quando comparados com pacientes em convalescência (Speelman *et al.*, 1985), sendo que as prostaglandinas PGE_1 e PGE_2 parecem estimular a adenilato ciclase em correntes de circuitos curtos (Isc) em "Ussing chambers" (Kimberg *et al.*, 1971).

Posteriormente, o envolvimento de prostaglandinas, leukotrienes e outros metabólitos do ácido araquidônico em diarreia foi bem documentado (Gaginella, 1990), embora seus mecanismos de ação exatos não sejam ainda claros. Peterson *et al.* (1989) demonstraram que a adição de AMPc induzia apenas a um pequeno e transiente aumento de fluídos em alça ligada de coelho, ao passo que PGE_2 induzia um acúmulo de fluídos bem maior. A adição de CT levou ao aumento de AMPc e PGE_2 em alça ligada de coelho e em células CHO, resultando na liberação de ácido araquidônico pelos fosfolipídios da membrana (Reitmeyer e Peterson, 1990). Num modelo sugerido por Peterson *et al.* (1991), os níveis aumentados de AMPc por CT, não só ativam a proteína kinase A como também regulam a transcrição de uma fosfolipase ou de uma proteína ativadora da fosfolipase. A fosfolipase ativada poderia, desta forma, agir nos fosfolipídios da membrana produzindo ácido araquidônico, que é o precursor de prostaglandinas e leukotrienes (Peterson *et al.*, 1991). Consistente com este modelo, o experimento realizado por de Jonge *et al.* (1991) utilizando células intestinais humanas HT29.c1.19A em "Ussing chambers" demonstraram que 40 a 60% da resposta Isc para CT é inibida por pequenas concentrações do inibidor mepacrine da fosfolipase A_2 . O efeito de CT no metabolismo do ácido araquidônico deve ocorrer através da ribosilação de ADP de G_s na membrana apical que poderia, então, diretamente ativar uma fosfolipase ou este efeito poderia ser mediado por uma proteína kinase A que por sua vez ativaria a fosfolipase.

O sistema nervoso entérico (ENS), que é parte do sistema nervoso autônomo, tem uma importante função na secreção e absorção intestinal (Cooke, 1991). O intestino também contém uma série de células que produzem hormônios e neuropeptídeos-produtos que podem afetar a secreção. Duas destas substâncias, cujo envolvimento em secreção é bem conhecido, são o peptídio intestinal vasoativo (VIP) e a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) (Cooke, 1991). Lungren *et al.* (1988) publicaram vários estudos que suportam a hipótese de que o ENS tem envolvimento crucial na secreção causada por CT. A hipótese proposta por estes pesquisadores é que CT se liga a "células receptoras", denominadas células enterocromafim, que liberariam uma substância semelhante à serotonina capaz de ativar estruturas tipo dendritos, localizadas abaixo do epitélio intestinal. Isto levaria à secreção de VIP, resultando na secreção de eletrólitos e fluídos.

Este modelo é sustentado por várias evidências, incluindo: (1) a secreção induzida por CT é inibida por uma série de bloqueadores gangliônicos ou de neurotransmissores (Cassuto *et al.*, 1981; Cassuto *et al.*, 1982; Cassuto *et al.*, 1983); (2) CT estimula a liberação de serotonina (5-HT) das células enterocromafim no lúmen intestinal (Nilsson *et al.*, 1983) sendo a secreção de fluídos por esta toxina marcadamente diminuída por receptores antagonistas de 5-HT (Sjöqvist *et al.*, 1992); e (3) a secreção induzida por CT é acompanhada por um aumento na secreção de VIP pelo intestino delgado sendo o aumento da liberação de VIP bloqueado por tetrodoxina (Nilsson *et al.*, 1983). Os pacientes de cólera também apresentam níveis sanguíneos elevados de VIP (Holmgren, 1992).

Cassuto *et al.* (1981) estimam que 60% da atividade de CT no transporte de fluídos intestinais pode ser atribuída ao sistema nervoso. A liberação de serotonina pelas células enterocromafim em resposta à ligação de CT poderia causar secreção por dois mecanismos: (1) A 5-HT poderia estimular diretamente o ENS, conduzindo a liberação de VIP ou (2) a 5-HT libera prostaglandinas que poderiam alterar a função de transporte diretamente ou através de ativação do ENS. Além do efeito secretório direto, também existem evidências de que CT aumenta a mobilidade intestinal o que poderia contribuir para a diarreia (Mathias *et al.*, 1976).

A toxina cólerica é um dos mais potentes imunógenos já estudados (Lycke e Holmgren, 1986). Intensa resposta imune não só é gerada contra CT ingerida oralmente, como também a antígenos não relacionados a CT ingeridos oralmente com esta toxina (Mathias *et al.*, 1976). Enquanto que a subunidade B isoladamente apresenta efeito adjuvante, provavelmente devido à ligação da subunidade B a G_{M1} (Czecekinnsky *et al.*, 1989; Francis *et al.*, 1992). O maior efeito adjuvante de CT e LT foi verificado como devido à atividade ADP ribosiltransferase da subunidade A. Lycke *et al.* (1992) demonstraram que a alteração de um único resíduo no sítio ativo da subunidade A diminuía significativamente o efeito adjuvante de LT.

Esta resposta à CT apresenta diversos efeitos sobre células do sistema imune como estimulação da produção de IL-1 e aumento da capacidade de apresentação de antígenos por macrófagos (Bromander *et al.*, 1991), promovendo a diferenciação das células B (Lycke e Strober, 1989), e inibição das células Th1 (Mung *et al.*, 1990). Também, foi sugerido que o efeito adjuvante de CT poderia ser devido ao aumento da permeabilidade intestinal em resposta à CT, talvez promovendo maior acesso dos antígenos às células do sistema imune presentes na mucosa intestinal (Lycke *et al.*, 1991).

Os genes que codificam CT (*ctxAB*) foram, inicialmente, clonados através de sua homologia com a sonda molecular dos genes que codificam LT de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (Gennaro *et al.*, 1982; Kaper e Levine, 1981; Pearson e Mekalanos, 1982). A sequência de DNA demonstrou uma similaridade de 78% e a sequência predita para a proteína mostrou uma similaridade de 80% entre os genes de CT e LT (Lockman e Kaper, 1983; Lockman *et al.*, 1984; Mekalanos *et al.*, 1983; Yamamoto *et al.*, 1984; Yamamoto e Yokoda, 1983). Estudos genéticos demonstraram que as subunidades A e B são codificadas em duas fases abertas de leitura separadas que se sobrepõem; as primeiras 2 bases do sinal de terminação (TGA) de tradução de *ctxA* são as duas últimas do códon de iniciação (ATG) de *ctxB* (Lockman e Kaper, 1983; Mekalanos *et al.*, 1983). Os cístrons A e B possuem sequências de ligação de ribossomos (RBS ou "ribosome binding sites") imediatamente acima de seus códons de iniciação, com o sítio RBS para *ctxB* localizando-se na terminação 3' de *ctxA*. A maior expressão da subunidade B,

levando à proporção de 5:1 de subunidades B:A na holotoxina, resulta de uma tradução mais eficiente, devida a um RBS mais forte para a subunidade B (Mekalanos *et al.*, 1983). A transcrição do operon *ctx* é regulada pelo sistema regulatório ToxR que será descrito posteriormente.

Muitas linhagens de *V.cholerae* O1 possuem múltiplas cópias do operon *ctx*. As linhagens clássicas apresentam duas cópias que são separadas no cromossomo de *V.cholerae* por uma distância desconhecida (Mekalanos, 1983; Moseley e Falkow, 1980). A maioria das linhagens El Tor apresentam apenas uma cópia do operon *ctx*, porém, cerca de 30% das linhagens El Tor contêm 2 ou mais cópias adjacentes (Mekalanos, 1983; Mekalanos, 1985).

O operon *ctx* juntamente com os genes que codificam as toxinas de *Zonulla occludens* (Zot) e colérica acessória (Ace) (descritas posteriormente), os quais localizam-se logo acima de *ctx*, estão localizados em uma região de 4,5kb denominada região core (Goldberg e Mekalanos, 1986). Flanqueando a região de 4,5kb, encontra-se uma ou mais cópias de uma sequência repetida de 2,7kb (RS1). A recombinação entre sequências RS1 pode gerar a duplicação em tandem ou amplificação da região core, como também a deleção desta (Goldberg e Mekalanos, 1986). A passagem serial de uma linhagem El Tor por alça ligada de coelho conduziu à amplificação *in vivo*, resultando em linhagens que expressavam maiores níveis de CT e possuíam mais cópias de *ctx* que a linhagem introduzida na primeira alça ligada de coelho (Mekalanos, 1983). Embora CT por si só possa ajudar na colonização (Pierce *et al.*, 1985), o aumento da colonização *in vivo* através da amplificação da região de 4,5kb inteira pode ser decorrente da presença nesta região de um gene que codifica um fator de colonização intestinal (Pearson *et al.*, 1993). As linhagens clássicas e algumas linhagens El Tor possuem sequências RS1 em apenas um dos lados da região core, sendo a duplicação e amplificação da região core não observada nestes casos (Mekalanos, 1983; Mekalanos, 1985). A sequência RS1 codifica um elemento de transposição sítio-específico que pode se inserir em uma sequência específica de 18pb denominada attRS1 (Pearson *et al.*, 1993).

Linhagens de *V.cholerae* isoladas da natureza que não produzem CT, não possuem sequências homólogas à *ctx* e o restante da região *core* (Kaper *et al.*, 1981; Miller e Mekalanos, 1984) mas contêm sequências *attRS1* (Pearson *et al.*, 1993). Pearson *et al.* (1993) demonstraram recentemente que quando a região *core* e *RS1* estão clonadas em um plasmídio suicida incapaz de se replicar em *V.cholerae* e transferido através de uma *E. coli* conjugativa, as sequências *RS1* e *ctx* podem inserir-se no sítio *attRS1* de uma forma independente de *recA*.

2.4.1.2.Outras toxinas produzidas por *V.cholerae*.

Toxina de *Zonnulla occludens* ("Zonnulla occludens toxin" ou Zot). A toxina de *Zonnulla occludens* foi descrita por Fasano *et al.* (1991) como sendo uma toxina que aumentava a permeabilidade da mucosa do intestino delgado afetando a estrutura das junções "tight" celulares ou zonnulla occludens (ZO). Quando sobrenadantes de culturas da linhagem de *V.cholerae* CVD101 ($\Delta ctxA$) foram adicionados a tecidos de íleo de coelhos montados em "Ussing chambers" foi observado um aumento imediato na condutividade do tecido (uma diminuição da resistência do tecido) (Fasano *et al.*, 1991). Ao contrário do aumento do potencial elétrico diferencial (PD) observado em resposta à CT, que reflete o transporte de íons através da membrana (Field *et al.*, 1972), no transporte transcelular, a variação na condução transepitelial reflete primariamente, embora não exclusivamente, a modificação da permeabilidade do tecido através dos espaços intercelulares, o transporte paracelular (Diamond, 1977). O exame por microscopia eletrônica das junções "tight" epiteliais, a maior barreira para este transporte (Diamond, 1977; Madara, 1989), revelaram que a exposição de tecido do íleo a sobrenadantes de culturas de CVD101 resultaram num relaxamento das junções "tight" (Fasano *et al.*, 1991). A toxina responsável por este efeito na *Zonnulla occludens* (ZO) foi denominada Zot (*Zonnulla occludens* toxin). Fasano *et al.* (1991) propuseram que Zot deve causar diarreia, aumentando a permeabilidade intestinal através do relaxamento das ZO, através de fluxo de água e eletrólitos para o lúmen intestinal.

O gene que codifica Zot foi clonado e se encontra imediatamente acima do *locus ctx* (Baudry *et al.*, 1992). A sequência do gene *zot* está presente em linhagens de *V.cholerae* O1 e não-O1, linhagens que contêm sequências *ctx* quase sempre contêm *zot* e vice versa (Farques *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1993; Karasawa *et al.*, 1993). O gene *zot* consiste de uma fase aberta de leitura de 1.3kb que potencialmente codifica um polipeptídeo de 44,8kDa. A sequência de aminoácidos prevista para Zot não apresenta homologia com nenhuma toxina bacteriana.

Toxina colérica acessória ("Accessory cholerae enterotoxin" ou Ace). A toxina colérica acessória (Ace) de *V.cholerae* foi identificada por Trucksis *et al.* (1993). Este trabalho demonstrou que o produto gênico de uma fase aberta de leitura acima de *zot* pode aumentar a corrente em circuito curto em "Ussing chambers". Como CT, e ao contrário de Zot, esta toxina aumenta o potencial elétrico diferencial e não a condutividade do tecido. Linhagens contendo o gene de *ace* clonado causaram significativo acúmulo de fluídos em alça ligada de coelho. O gene *ace* potencialmente pode codificar um peptídeo de 96 resíduos de aminoácidos com um peso molecular previsto de 11,3kDa (Trucksis *et al.*, 1993). A sequência de aminoácidos prevista para Ace mostra grande similaridade com uma família de ATPases de eucariotos envolvidas do transporte de íons, como a bomba de cálcio da membrana plasmática humana, a ATPase de transporte de cálcio do cérebro de ratos e o produto do gene da fibrose cística, o regulador de transmembrana da fibrose cística. As primeiras duas proteínas estão envolvidas no transporte de íons de cálcio através da membrana e CFTR funciona como um canal de cloro (Bear *et al.*, 1992). Ace também apresenta similaridade com uma proteína de virulência de *Salmonella dublin*, SpvB, que é essencial para a virulência em camundongos (Krause *et al.*, 1991).

A estrutura prevista para Ace sugere um modelo no qual multímeros de Ace inserem-se na membrana eucariótica com a região hidrofóbica para a bicamada lipídica e a região hidrofílica no interior de um poro transmembrana (Trucksis *et al.*, 1993).

Hemolisina/citolisina. Tradicionalmente a hemólise de eritrócitos de carneiro era utilizada para distinguir entre os biotipos El Tor e clássico de *V.cholerae*, embora os isolados mais recentes de El Tor sejam pouco hemolíticos para eritrócitos de carneiro (Barrett e Blake,

1981; Gallut *et al.*, 1974). A hemolisina foi purificada por Honda e Finkelstein (1979) e mostrou-se citolítica para uma série de eritrócitos e células de mamíferos em cultura além de ser rapidamente letal para camundongos. A hemolisina/citolisina é inicialmente traduzida como uma proteína de 82kDa, sendo processada em duas etapas, até uma citolisina ativa de 65kDa (Yamamoto *et al.*, 1990). Uma hemolisina idêntica, indistinguível fisicoquimicamente e antigenicamente da produzida por linhagens El Tor é produzida por *V.cholerae* não-O1 (Yamamoto *et al.*, 1986). Os genes que codificam esta hemolisina, *hlyA*, estão presentes em linhagens clássicas, El Tor e não-O1 de *V.cholerae* (Brown e Manning, 1985). Embora as linhagens clássicas sejam negativas para a hemólise de eritrócitos de carneiro, *E. coli* que contêm os genes *hlyA* clonados da linhagem clássica 395 são capazes de lisar eritrócitos de galinha e coelho, mas não de carneiro (Richardson *et al.*, 1986). As bases moleculares para as diferenças entre a atividade hemolítica entre linhagens clássica, El Tor antiga e El Tor recentes ainda não estão completamente entendidas, mas numa linhagem não hemolítica, 569B, foi encontrada uma deleção de 11pb que produziria um produto truncado de *hlyA* de 27kDa (Alm *et al.*, 1988). Uma sonda de oligonucleotídeo sintético contendo estes 11 pares de base hibridizou com todas as linhagens El Tor e não-O1 testadas, mas não hibridizou com as linhagens clássicas (Alm e Manning, 1990). Genes que codificam uma segunda hemolisina geneticamente distinta da hemolisina/citolisina de El Tor, foi clonada a partir da linhagem clássica 395 (Richardson *et al.*, 1986) mas não houve nenhuma caracterização posterior desta hemolisina.

A hemolisina purificada causa acúmulo de fluídos na alça ligada de coelho (Ichinose *et al.*, 1989). Em contraste com o fluido aquoso produzido por CT, o fluido acumulado em resposta à hemolisina é ensanguentado e possui muco (Ichinose *et al.*, 1987). McCardell *et al.* (1985) e Spira *et al.* (1986) descreveram uma citolisina que é citotóxica para células Y-1 e CHO e causa acúmulo de fluídos em alça ligada de coelho. Esta citolisina foi proposta como sendo idêntica à hemolisina de El Tor. Para testar se esta hemolisina era responsável pela diarreia observada em linhagens Δ ctx de *V.cholerae*, Kaper *et al.* (1988) construíram derivados destas linhagens que possuíam uma mutação no gene *hlyA* por deleção de um fragmento *Hpa* I de 400pb. Quando

testadas em voluntários humanos, as linhagens $\Delta hlyA$ CVD104 e CVD105 ainda causaram diarreia em 33% dos voluntários (Levine *et al.*, 1988b), indicando, assim, que a hemolisina/citolisina provavelmente não é a causa da diarreia observada em voluntários imunizados com Δctx *V.cholerae*.

Outras toxinas. Em adição a CT, Zot, Ace e hemolisina/citolisina, que são amplamente distribuídas em *V.cholerae* e cujos genes foram clonados e sequenciados, outras toxinas foram encontradas nesta espécie.

Foi descrita uma toxina "Shiga-like" para *V.cholerae* O1 com base em sua citotoxicidade em células HeLa que foi neutralizada por anticorpos contra a toxina Shiga purificada de *Shigella dysenteriae* 1 (O'Brien *et al.*, 1984).

Algumas linhagens de *V.cholerae* não-O1 produzem uma outra toxina que possui 50% de homologia com a toxina termo-estável (ST) de *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) (Ogawa *et al.*, 1990). Em 1983, Sanyal *et al.* demonstraram que linhagens de *V.cholerae* não-O1 que não possuíam genes que codificavam CT causava acúmulo de fluidos em alça ligada de coelho (Sanyal *et al.*, 1983). O acúmulo de fluidos foi observado com o uso de células inteiras ou com filtrados de culturas. Os filtrados também aumentaram a permeabilidade capilar da pele de coelho, mas ao contrário de CT também causaram necrose (Sanyal *et al.* 1983). A atividade enterotóxica foi subsequentemente encontrada em linhagens CT⁺ como a linhagem clássica Inaba 569B (Saha e Sanyal, 1988). Esta toxina foi denominada "nova toxina colérica" (NCT) e proposta como a causa da diarreia em voluntários imunizados com *V.cholerae* CT⁻ (Saha e Sanyal, 1990). Esta toxina foi encontrada em isolados clínicos e ambientais de *V.cholerae* e também foi encontrada em linhagens que naturalmente não possuem *ctx*, *zot* e *ace* (Baudry *et al.*, 1992). Até o momento nenhuma caracterização bioquímica ou genética desta toxina foi divulgada.

Tamplin *et al.* (1987) demonstraram que linhagens de *V.cholerae* O1, incluindo CT⁻ CVD101, produziam um fator que inibia canais de sódio. A caracterização inicial deste composto sugeriu que o composto ativo era tetrodoxina ou uma toxina relacionada, mas nenhuma caracterização adicional desta toxina foi publicada.

Uma hemolisina termoestável direta (TDH) (Kanagawa phenomenon hemolysin) de *V.parahaemolyticus* é responsável pela atividade enterotóxica desta espécie (Nishibuchi *et al.*, 1992). Genes que codificam uma toxina tipo hemolisina termoestável direta (tipo-TDH) foram encontrados em um plasmídio em *V.cholerae* não-O1 (Honda *et al.*, 1986) mas sequências homólogas ainda não foram encontradas em *V.cholerae* O1 (Terai *et al.*, 1991).

2.4.2.Fatores de colonização.

Embora a principal toxina responsável pelos sintomas da cólera tenha sido descrita a muitos anos atrás, apenas recentemente os mecanismos pelos quais o *V.cholerae* adere ao intestino delgado foram elucidados. Durante muitos anos, os trabalhos foram focalizados em aglutinação de eritrócitos como evidência da presença de fatores de colonização intestinais. Desta forma, verificou-se que *V.cholerae* produz pelo menos 4 hemaglutininas (HA) (Hanne e Finkelstein, 1982): (1) uma hemaglutinina D-manose, D-frutose sensível expressa por linhagens El Tor (MFSHA); (2) uma hemaglutinina L-fucose sensível expressa por linhagens clássicas (FSHA); (3) uma hemaglutinina D-manose, L-fucose resistente expressa por ambos os biotipos; e (4) uma hemaglutinina solúvel produzida por ambos os biotipos e que também possui atividade de protease. Estas hemaglutininas devem ter algum envolvimento na colonização intestinal, mas foi somente com a descrição do *pilus* TCP que um fator de colonização significativo para a doença foi demonstrado (Herrington *et al.*, 1988). Embora TCP seja importante para adesão às células epiteliais, a colonização intestinal pelo *V.cholerae* é, provavelmente, multifatorial.

A identidade dos receptores celulares intestinais que são o alvo de aderência do *V.cholerae* não é conhecida. Jones e Freter (1976) verificaram que L-fucose inibe parcialmente a aderência de *V.cholerae* às membranas das microvilosidades e propuseram que este açúcar forma parte do receptor intestinal. Yamamoto *et al.* (1988) utilizaram células do intestino delgado humano para estudos de aderência e demonstraram que L-fucose possuía um efeito inibitório, entre os açúcares pesquisados, na aderência de *V.cholerae* às células intestinais humanas. Estes

pesquisadores verificaram que os alvos primários para adesão de *V.cholerae* a células do intestino humano eram (por ordem de eficiência): (1) muco; (2) superfície de células epiteliais dos folículos linfáticos ileais, e (3) a superfície de células absorventes das vilosidades do jejuno ou íleo (Yamamoto *et al.*, 1988; Yamamoto e Yokoda, 1988). Dentro dos folículos linfóides, as células M foram melhores alvos para aderência, que outras células epiteliais dos folículos (Yamamoto e Yokoda, 1989). A especificidade dos alvos pode variar conforme as condições de crescimento das culturas bacterianas (Yamamoto *et al.*, 1988), indicando, assim, que a expressão de fatores de colonização em *V. cholera* é altamente regulada.

Os trabalhos iniciais sobre a adesão de *V.cholerae* normalmente empregavam linhagens de *V.cholerae* mutagenizadas quimicamente para estudar os vários fatores de colonização. A falta de mutações específicas e bem caracterizadas dificulta a interpretação destes resultados (Levine *et al.*, 1983).

2.4.2.1. *Pilus* corregulado com a toxina colérica ("Toxin coregulated pilus" ou TCP).

Em 1987, Taylor *et al.* publicaram a descoberta de um fator de colonização do tipo pilus em *V.cholerae* O1 que era composto de longos filamentos de 7nm de diâmetro e associados lateralmente em maços. Este pilus foi descoberto através do uso de *TnphoA*, que é um transposon utilizado para identificação de muitos fatores de virulência bacterianos. Quando o *TnphoA* se insere em frame em um gene que codifica uma proteína secretada ou de membrana, é formada uma proteína híbrida que expressa a atividade da fosfatase alcalina (Manoil e Beckwith, 1985), permitindo assim a diferenciação de proteínas híbridas citoplasmáticas, onde a fosfatase alcalina não é ativa. Taylor *et al.* (1987) triaram colônias que expressavam a atividade da fosfatase alcalina e encontraram um mutante de *TnphoA* que tinha sua capacidade de colonização muito diminuída quando testado em camundongos recém-nascidos. Este mutante era defectivo na produção de um *pilus* que era associado à hemaglutinação na presença de fucose. O *pilus* foi

denominado *pilus* corregulado com a toxina colérica (TCP) porque a expressão do *pilus* está relacionada com a expressão da toxina colérica.

TCP é o único fator de colonização de *V.cholerae* cuja importância na doença humana foi comprovada. Herrington *et al.* (1988) conduziram um estudo em voluntários humanos demonstrando que a colonização intestinal por uma linhagem de *V.cholerae*, onde a subunidade de TCP (TcpA) fora inativada, foi significativamente diminuída. Os voluntários que ingeriram a linhagem mutante não apresentaram diarreia e não foram recuperados vibrios das fezes destes voluntários. Nenhuma resposta imune significativa contra antígenos de *V.cholerae* foi observada após a ingestão do mutante *tcpA*. Curiosamente, apesar do requerimento de TCP funcional para uma resposta imune, voluntários que ingeriram *V.cholerae* selvagem não apresentaram anticorpos contra TCP, mesmo na presença de uma forte resposta vibriocida ou anti-toxina (Hall *et al.*, 1991). Embor anticorpos contra TCP protejam camundongos da doença, no modelo do camundongo recém-nascido (Sun *et al.*, 1990a; Sun *et al.*, 1990b), sólida proteção a longo prazo em humanos pode ser obtida mesmo sem uma resposta imune anti-TCP detectável.

A sequência prevista de aminoácidos da subunidade de 20,5kDa de TcpA apresenta significativa homologia com *pili* tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella bovis* e *Bacterioides nodosus* (Shaw e Taylor, 1990). TCP é encontrada em linhagens El Tor e clássicas e a sequência prevista para a proteína apresenta similaridade de 82-83% entre os biotipos (Rhine e Taylor, 1994). Anticorpos monoclonais produzidos contra TCP, mostram diferenças de epitopos entre os *pili* produzidos por linhagens clássicas e El Tor (Jonson *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1990a). As linhagens El Tor produzem menos TCP que as linhagens clássicas e as condições ótimas de culturas para a expressão de TCP diferem entre os biotipos (Jonson *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1990b; Voss e Attridge, 1993). Sequências que codificam TCP não foram encontradas em uma coleção de linhagens de *V.cholerae* não-O1 ou em isolados ambientais de *V.cholerae* O1 que não produziavam CT (Taylor *et al.*, 1988). A síntese de TCP é complexa e não totalmente compreendida, mais de 15 fases abertas de leitura são encontrados no conjunto de genes *tcp* (Kaufman *et al.*, 1993; Ogierman e Manning, 1992; Ogierman *et al.*, 1993) e pelo

menos um outro gene não ligado ao conjunto, *tcpG* (*dsbA*), também é requerido para a expressão de um *pilus* funcional (Peek e Taylor, 1992). Regulação da expressão de *tcp* é similarmente complexa e encontra-se sob a regulação de sistema *toxR* (Kaufman *et al.*, 1993; Miller e Mekalanos 1988; Oigerman *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1987). Há também evidência de que a expressão de TCP é diminuída na presença do plasmídeo conjugativo P de *V.cholerae* (Bartowsky *et al.*, 1990), sugerindo, assim, que níveis adicionais de regulação podem estar envolvidos na biossíntese de TCP.

TCP foi estudada quase que exclusivamente em *V.cholerae* O1 e a produção de TCP ou a posseção de genes *tcp* não foi encontrada em linhagens de *V.cholerae* não-O1. Entretanto TCP é expressa em *V.cholerae* O139 quando crescido em condições favoráveis à expressão de TCP em *V.cholerae* O1 El Tor (Hall *et al.*, 1993).

2.4.2.2.Fator acessório de colonização ("Accessory colonization factor" ou ACF).

Mutagênese por *tnphoA* também foi utilizada para descobrir um outro potencial fator de colonização de *V.cholerae*. Peterson e Mekalanos (1988) isolaram mutantes de *TnphoA* que eram regulados por *ToxR* e encontraram 4 mutantes cuja capacidade para colonização encontrava-se diminuída em camundongos recém-nascidos. A redução de colonização observada através de inserções no *locus acf* (fator acessório de colonização) foi de cerca de 10 a 50 vezes menor que a da linhagem selvagem, não sendo tão severa quanto a diminuição de colonização observada no mutante de TCP (1000 vezes (Taylor *et al.*, 1987). A natureza do ACF ainda não é conhecida, mas uma das 4 fases abertas de leitura deste *locus* (*acf D*) codifica uma lipoproteína (Parsot *et al.*, 1991). A sequência de nucleotídeos do *locus acf* foi determinada (Everiss *et al.*, 1992) e localizada imediatamente adjacente aos *loci tcp* e *toxT*. Sendo assim, parece haver uma segunda região do cromossomo de *V.cholerae*, em adição à região que contém *ctx*, *zot* e *ace* na qual genes codificando fatores de virulência estão agrupados.

2.4.2.3.Hemaglutinina resistente a manose e fucose (MFRHA).

Uma hemaglutinina associada com a célula e que não é inibida por manose, fucose ou outros açúcares, é produzida por ambos os biotipos de *V.cholerae*. O gene que codifica esta hemaglutinina, denominada hemaglutinina resistente a manose e fucose (MFRHA), foi clonado por Franzon e Manning (1986). A sequência de nucleotídeos de uma fase de leitura aberta de 693pb prevê uma proteína de 26,9kDa associada com esta atividade (Franzon *et al.*, 1993). Uma linhagem isogênica mutada neste gene mostrou-se atenuada em camundongos recém-nascidos (Franzon *et al.*, 1993). Experimentos de colonização competitiva em camundongos recém-nascidos mostrou que a colonização *in vivo* do mutante estava reduzida 100-1300 vezes em relação à linhagem selvagem. A natureza de MFRHA não é conhecida, mas foi sugerido que MFRHA é uma proteína de membrana externa catiônica que é mantida na superfície celular primariamente por interações de carga com o LPS (Kolvin e Roberts, 1982).

2.4.2.4.Hemaglutinina sensível a manose.

A hemaglutinina sensível a manose (MSHA) de *V.cholerae* é expressa por linhagens do biotipo El Tor e é raramente expressa por linhagens do biotipo clássico (Jonson *et al.*, 1991). Jonson *et al.* (1991) identificaram este fator de colonização como um pilus fino e flexível composto de subunidades de peso molecular de 17kDa. Um anticorpo monoclonal capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos de galinha mediada por linhagens El Tor, liga-se especificamente ao longo do pilus, sugerindo que a porção de ligação ao receptor reside na subunidade estrutural (Jonson *et al.*, 1991). Os mesmos anticorpos monoclonais protegem contra cólera experimental causada por *V.cholerae* el Tor em camundongos recém-nascidos e alça ligada de coelho (Osek *et al.*, 1992). Os anticorpos monoclonais não protegem contra desafio com *V.cholerae* do biotipo clássico, sugerindo que existe um antígeno protetor específico para o biotipo El Tor. Finn *et al.*

(1987) caracterizaram mutantes produzidos por Tn5 em linhagens El Tor que não produziam MSHA. Estes mutantes eram defectivos para colonização do tecido do íleo de coelhos 10⁴ vezes menos em relação à linhagem selvagem. A análise inicial da sequência de nucleotídeos dos genes inativados por inserção de Tn5 sugeriram que os transposons não estão inseridos no gene estrutural do pilus MSHA mas em um gene requerido para secreção e/ou montagem do pilus (Häse *et al.*, 1993).

2.4.2.5. *Pilus* codificado no "core" ("Core encoded *pilus*" ou CEP).

Além de possuir os genes para as toxinas *ctx*, *zot* e *ace*, o elemento de 4,5kb do "core" contém um gene que codifica um fator que aumenta a colonização em camundongos recém nascidos. Pearson *et al.* (1993) demonstraram que uma proteína de 82 aminoácidos é codificada pelo *locus cep* ("core-encoded *pilus*"). A sequência de aminoácidos prevista para esta proteína apresenta similaridade com um *pilus* flexível de *Aeromonas hydrophila*, embora uma estrutura de *pilus* não tenha sido identificada ainda com o produto do gene *cep*. Uma deleção do *locus cep* reduziu a colonização em camundongos recém-nascidos de 13 a 21 vezes (Pearson *et al.*, 1993). Experimentos anteriores mostrando que a região "core" de 4,5kb pode ser amplificada *in vivo* (Mekalanos, 1983) podem ser explicados pela vantagem seletiva na colonização conferida pelo *locus cep*. A informação disponível sugere que *cep* contribui pouco para a colonização intestinal humana. Tacket *et al.* (1993) experimentaram em voluntários humanos uma linhagem derivada de *V.cholerae* El Tor E7946 deletada para *cep*. A linhagem mutante resultou em respostas imunes idênticas às observadas para a linhagem selvagem que contém *cep*.

2.4.2.6. Hemaglutinina/protease solúvel.

A hemaglutinina/protease (HA/protease) de *V.cholerae* não parece ser um fator de colonização, mas é uma metaloenzima com zinco que corta a toxina colérica e também quebra

fibronectina, mucina e lactoferrina (Finkelstein *et al.*, 1983). Esta enzima é produzida por linhagens de ambos os biotipos, mas linhagens El Tor produzem níveis maiores de HA /protease que linhagens clássicas (Duby *et al.*, 1990; Svennerholm *et al.*, 1983). O gene que codifica a HA/protease (*hap*) foi clonado (Häse e Finkelstein, 1991) e a sequência de aminoácidos prevista para a proteína de 46,7kDa possui 61,5% de similaridade com a elastase de *Pseudomonas aeruginosa*. A proteína de 46,7kDa é processada em uma proteína de 32kDa que é a forma comumente isolada (Häse e Finkelstein, 1991). Embora a HA/protease seja um atraente fator de virulência potencial, uma linhagem isogênica de *V.cholerae*, mutada neste gene, não era menos virulenta que a linhagem selvagem em camundongos recém-nascidos (Finkelstein *et al.*, 1992). Um aspecto interessante, é que a HA/protease possui uma atividade de "descolamento" que permitem aos vibrios se descolarem em culturas de células epiteliais intestinais humanas (Finkelstein *et al.*, 1992). O significado desta atividade não é conhecido, mas poderia contribuir para o espalhamento do organismo no meio ambiente (Finkelstein *et al.*, 1992).

2.4.2.7. Outros *pili*.

Existem outras fimbrias descritas para *V.cholerae* O1, mas a relação entre estas estruturas e a potencial colonização intestinal não é clara. Hall *et al.* (1988) descreveram pelo menos dois outros tipos de fimbria além de TCP e que diversos tipos de fimbrias podem ser expressos pela mesma linhagem. Ehara e colaboradores (1987) purificaram um *pilus* de *V.cholerae* O1 que possuía um peso molecular de 16kDa. Este peso molecular é semelhante ao de MSHA, mas o *pili* descrito por Ehara possui atividade hemaglutinante resistente à manose e à frutose. Nakasone e Inagawa (1990) purificaram um *pili* de uma linhagem de *V.cholerae* não-O1 com uma subunidade de peso molecular de 16kDa. Anticorpos contra este *pili* reagiram com 12 entre 49 linhagens de *V.cholerae* não-O1 e 25 entre 99 linhagens de *V.cholerae* O1, indicando ser um *pilus* comum a várias linhagens de *V.cholerae* de sorogrupos distintos.

2.4.2.8. Proteínas de membrana externa (OMPs).

Numerosas proteínas de membrana de *V.cholerae* foram identificadas e os genes que codificam várias delas, clonados. Anticorpos contra OMPs inibem a colonização intestinal em camundongos recém-nascidos (Sengupta *et al.*, 1992). Uma OMP que é importante para a virulência em camundongos é IrgA, uma OMP de 77kDa cuja expressão é regulada por ferro. Uma linhagem de *V.cholerae* O1 especificamente mutagenizada no gene *irgA* mostrou um aumento de 100 vezes na LD₅₀ quando comparada com a linhagem selvagem (Goldberg *et al.*, 1990). A colonização competitiva do mutante *irgA* foi reduzida 10 vezes (Goldberg *et al.*, 1990), sugerindo a existência de um defeito de colonização neste mutante. Uma OMP que é necessária à biogênese de TCP é TcpC, que possui peso molecular de 55kDa conforme a sequência da proteína prevista pelo gene *tcpC* (Ogierman e Manning, 1992). TcpC é uma lipoproteína envolvida na resistência sérica de *V.cholerae* (Parsot *et al.*, 1991).

A função de outras OMPs na virulência do *V.cholerae* ainda não foi estabelecida utilizando-se modelos animais nem humanos. OmpV é uma OMP de 25kDa, cujo gene foi clonado e sequenciado (Pohlner *et al.*, 1986). Apesar do fato de que esta é um dos maiores compostos imunogênicos da superfície de *V.cholerae*, uma inserção de *TnphoA* neste gene não afetou a LD₅₀ ou a colonização competitiva em camundongos recém-nascidos (Taylor *et al.*, 1987). Outra OMP imunogênica é uma OMP de 22kDa denominada OmpW (Jalajakumari e Manning, 1990), para a qual nenhum envolvimento em virulência foi demonstrado. OmpS é uma proteína de 44kDa que é induzida por maltose e possui homologia com o receptor λ LamB de *E. coli* (Lang e Palva, 1987; Lang e Palva, 1993); em *E. coli* a proteína LamB funciona como um poro e uma função semelhante foi proposta para OmpS de *V.cholerae* (Lang e Palva, 1993). *V.cholerae* também produz uma OMP de 35kDa que reage com antissoro anti-OmpA de *E. coli* e uma sonda molecular de *ompA* de *Serratia marcescens* hibridizou fracamente com *V.cholerae* (Alm *et al.*, 1986). Duas outras OMPs, OmpT (40kDa) e OmpU (38kDa) estão sob regulação de ToxR, sendo que OmpU é ativada e OmpT é reprimida por ToxR (Miller e Mekalanos, 1988).

2.4.2.9. Motilidade e flagelo.

O *V.cholerae* é móvel através de um único flagelo polar móvel. O "core" do flagelo é constituído de duas proteínas de 47 e 49kDa (Richardson e Parker, 1985). Anticorpos contra estas proteínas não aglutinam nem inibem a motilidade de *V.cholerae* (Richardson e Parker, 1985). Uma cobertura membranosa recobre o flagelo e parece ser contínua com a membrana externa (Follet e Gordon, 1963). As proteínas associadas com esta cobertura do flagelo são três polipeptídeos de 56, 60 e 61,5kDa (Hranitzky *et al.*, 1980) ou duas proteínas de 38 e 40kDa (Sinha *et al.*, 1993). Anticorpos contra as proteínas de 38kDa e 40kDa inibiram a motilidade de *V.cholerae* mas não induziram imunização protetora contra a doença em coelhos (Richardson e Parker, 1985). Anticorpos contra o LPS de *V.cholerae*, marcaram o flagelo recoberto, indicando que o flagelo e a superfície celular possuem antígenos de LPS comuns (Fuerst e Perry, 1988).

2.4.2.10. Lipopolissacarídeos (LPS).

Existem evidências de que o LPS esteja envolvido na aderência de *V.cholerae* O1 à mucosa intestinal. Em um estudo, LPS purificado inibiu significativamente, a aderência de *V.cholerae* Inaba à mucosa de coelhos (Chitnis *et al.*, 1982). Em experimentos "in vitro" e em animais, anticorpos contra LPS Ogawa e Inaba demonstraram inibir a aderência de *V.cholerae* à mucosa intestinal (Chitnis *et al.*, 1982; Freter e Jones, 1976).

2.4.2.11. Cápsula de lipopolissacarídeos.

Embora *V.cholerae* O1 não seja encapsulado, linhagens de *V.cholerae* não-O1 produzem uma cápsula de polissacarídeos (Johnson *et al.*, 1992). Esta cápsula poderia facilitar a septicemia em hospedeiros susceptíveis, algo que não é incomum com linhagens não-O1. Johnson *et al.*

(1992) descobriram que um mutante acapsulado derivado por mutagênese com transposon era menos virulento em camundongos que a linhagem selvagem capsulada. A linhagem selvagem capsulada era protegida contra a atividade bactericida do soro, enquanto que o mutante acapsulado era morto imediatamente. Existe, também, evidência de que a cápsula de polissacarídeos (LPS) está envolvida na aderência às células epiteliais. Utilizando a linhagem de células epiteliais intestinais Caco-2, encontrou-se uma clara correlação entre a quantidade de material capsular expresso e a avidade de ligação às células Caco-2 (Johnson *et al.*, 1993b). A pré-incubação de células Caco-2 com LPS purificado da linhagem capsulada NRT-36S inibiu 50% da adesão desta linhagem enquanto que CPS de uma outra linhagem não inibiu a adesão. Um fato interessante, é que linhagens de *V.cholerae* O139 também produzem uma cápsula de polissacarídeos (Johnson *et al.*, 1993a) que possivelmente pode ter contribuído para um caso de septicemia com este sorogrupo (Jesudason *et al.*, 1993).

2.4.2.12. Outros fatores.

Uma pequena hemaglutinina, de natureza não esclarecida, presente no flagelo está envolvida na aderência não específica de *V.cholerae* (Atridge and Rowley, 1983). Uma proteína de superfície de 33kDa de *V.cholerae* El Tor induz a produção de anticorpos capazes de bloquear a aderência de *V.cholerae* a mucosas de rato e coelho (Jacob *et al.*, 1993).

2.5. Regulação de mecanismos de virulência.

Existem vários sistemas envolvidos na regulação da virulência em *V.cholerae*. O regulon ToxR regula a expressão de vários fatores de virulência importantes e foi o mais extensamente caracterizado. A regulação em resposta à concentração de ferro é um sistema regulatório distinto, que controla prováveis fatores de virulência adicionais. Outros prováveis fatores de virulência como a neuroaminidase e várias hemaglutininas se não encontram sob a regulação de nenhum

destes dois sistemas. Existe, também, uma série de genes que são expressos somente *in vivo* e não pertencem aos sistemas regulatórios ToxR e de ferro. Estes diferentes sistemas regulatórios, sem dúvida, permitem que o *V.cholerae* varie a expressão de seus genes para otimizar sua sobrevivência em uma variedade de ambientes que vão desde o intestino humano ao ambiente estuarino.

2.5.1. O regulon ToxR.

Como mostrado por Miller e Mekalanos (1984; 1988), a expressão de vários fatores de virulência em *V.cholerae* O1 é regulada coordenadamente. Desta maneira, vários genes respondem de uma mesma forma às condições ambientais. A regulação coordenada e transdução sensorial para o controle de fatores de virulência, foi encontrada em diversos patógenos bacterianos (Miller *et al.*, 1989). Para o *V.cholerae* O1 o fator principal para o controle destes fatores é ToxR; uma proteína trans-membrânica de 32kDa (Miller *et al.*, 1987). ToxR se liga a uma sequência repetida em tandem de 7pb acima dos genes estruturais *ctxAB* aumentando a transcrição de *ctxAB*, resultando em maiores níveis de expressão da toxina colérica (Miller e Mekalanos, 1984; Miller *et al.*, 1987). A atividade de ToxR é aumentada pela proteína ToxS, uma proteína trans-membrânica de 19kDa que interage com ToxR (DiRita e Mekalanos, 1991). Foi proposto um modelo no qual dímeros de ToxR são ativos para se ligar ao DNA e aumentar a transcrição, enquanto que ToxS serve para montar monômeros de ToxR em sua forma dimérica ativa (DiRita e Mekalanos, 1991).

Além da produção da toxina colérica, ToxR também controla a expressão do fator de colonização TCP (Taylor *et al.*, 1987), do fator de colonização acessório ACF (Peterson e Mekalanos, 1988), das proteínas de membrana externa OmpT e OmpU (Miller e Mekalanos, 1988) e três lipoproteínas (Parsot *et al.*, 1991). O efeito de ToxR na maioria destes fatores é aumentar a sua expressão com exceção da proteína OmpT cuja expressão é diminuída na presença de ToxR (Miller e Mekalanos, 1988). Uma pesquisa de genes cuja expressão é

controlada por ToxR foi realizada por Peterson e Mekalanos (1988) que encontraram pelo menos 17 genes distintos regulados por ToxR. Estes genes formam o regulon ToxR. A importância de ToxR na doença humana foi demonstrada por Herrington e colaboradores (1988) que infectaram voluntários humanos com uma linhagem derivada de *V.cholerae* clássico 395 que possuía uma mutação em ToxR. Nenhum dos voluntários infectados com o mutante de toxR desenvolveu diarreia e os organismos utilizados no desafio não puderam ser recuperados de amostras de fezes.

A ligação direta de ToxR ao operon *ctx* parece ser a exceção e não a regra para o regulon ToxR. A sequência repetida de 7pb para a ligação de ToxR não é encontrada acima de nenhum outro gene regulado por ToxR (DiRita, 1992). A expressão de pelo menos alguns dos genes do regulon ToxR é controlada por um outro fator de regulação, ToxT (DiRita *et al.*, 1991). ToxT é uma proteína de 32kDa que possui homologia com os ativadores transcricionais da família AraC (Higgins *et al.*, 1992; Ogierman e Manning., 1992). Os estudos de DiRita e colaboradores (1991) indicam que ToxR controla a transcrição do gene *toxT*. O aumento na expressão de ToxT, leva à ativação de outros genes do regulon ToxR. Sendo assim, existe uma regulação em cascata que controla a expressão de importantes fatores de virulência de *V.cholerae* sendo ToxR a primeira proteína reguladora, ToxT em segundo lugar, e vários genes controlados por ToxT estão no último nível (DiRita *et al.*, 1991).

A influência de fatores ambientais na expressão de CT é conhecida há muito tempo (Richardson, 1969). A expressão de outros fatores de virulência, como TCP, respondem, de forma similar, a estes fatores, e muitas destas respostas são controladas pelo regulon ToxR. Foi proposto que a proteína ToxR sente estas condições ambientais e transmite esta informação para outros genes através de transdução de sinal (DiRita, 1992). Para linhagens clássicas, o aumento da expressão do regulon ToxR ocorre em pH6,5, 37°C e 66mM de NaCl (Miller e Mekalanos, 1988). A expressão de CT, TCP e outros fatores de virulência potenciais difere entre os biotipos clássico e El Tor (Jonson *et al.*, 1990) sendo o controle do regulon ToxR em El Tor não totalmente caracterizado. A diminuição da expressão de fatores de virulência a 37°C *in vitro* conhecidamente expressos a 37°C, no intestino, é paradoxal. Talvez o efeito da temperatura *in*

vitro seja resultante da falta de outros sinais *in vitro* que estão presentes *in vivo* a 37°C (DiRita, 1992). Outros fatores de regulação devem estar envolvidos na regulação do regulon ToxR. Logo acima do gene que codifica ToxR, localiza-se um gene para uma proteína de choque térmico, *htpG* (Parsot e Mekalanos, 1990). Os genes para *htpG* e *toxR* são transcritos em direções opostas, e os promotores dos dois genes estão tão próximos que apenas uma RNA polimerase pode ligar-se à região intergênica. No modelo proposto por Parsot e Mekalanos (1990), a RNA polimerase normal sigma-70 pode ligar-se ao promotor de ToxR e transcrever *toxR* apenas a baixas temperaturas. A temperaturas elevadas (>37°C), a subunidade sigma da RNA polimerase envolvida na transcrição de genes de choque térmico, sigma-32, liga-se ao promotor de *htpG* resultando na repressão do promotor de *toxR*. Foi sugerido que após a entrada no corpo e a passagem pelo estômago, a resposta de choque térmico é primeiramente induzida, diminuindo assim a expressão do regulon ToxR (Parsot e Mekalanos, 1990). Quando o organismo está no intestino delgado, o sistema de choque térmico não seria mais expresso, viabilizando assim a expressão do regulon ToxR.

2.5.2. Regulação de ferro.

O crescimento de *V.cholerae* em condições limitantes de ferro induz a expressão de várias proteínas de membrana externa (OMPs) que normalmente não são observadas em células cultivadas em meios ricos em ferro (Siegel e Payne, 1982). Muitas destas proteínas são similares a proteínas induzidas pelo crescimento "in vivo" de *V.cholerae*, indicando que o ambiente intestinal é pobre em ferro (Sciortino e Finkelstein, 1983). A expressão de algumas OMPs diminui em condições de limitação de ferro (Sciortino e Finkelstein, 1983; Siegel e Payne, 1982). Várias proteínas cuja expressão é intensificada em condições limitantes de ferro foram identificadas, incluindo a hemaglutinina/citolisina, vibriobactina e IrgA (Goldberg *et al.*, 1990; Stoeckner e Payne, 1988).

V.cholerae possui pelo menos dois sistemas altamente eficientes para captação de ferro. O primeiro, envolve a expressão de um sideróforo tipo fenolato, denominado vibriobactina, que é produzido em condições limitantes de ferro (Griffiths *et al.*, 1984; Laval, 1989). A vibriobactina se liga ao ferro extracelularmente e o transporta através da célula por um receptor específico (Stoebner *et al.*, 1992). O receptor da vibriobactina é uma OMP de 74kDa codificada pelo gene *viuA* (Butterton *et al.*, 1992). Mutações em *viuA* impedem o crescimento em meio pobre em ferro, mas não afetam a síntese de vibriobactina ou o transporte de outros complexos de ferro como ferrocromo, hemina e citrato férrico (Stoebner, *et al.*, 1992). Demonstrou-se que a produção de vibriobactina não era essencial para a virulência (Siegel *et al.*, 1985), o que sugere a existência de outros sistemas de transporte de ferro. O segundo sistema de *V.cholerae* para captação de ferro, utiliza heme e hemoglobina como fonte deste elemento (Stoebner e Payne, 1988). Henderson e Payne (1993), clonaram os genes que codificam uma proteína de membrana interna de 26kDa e uma OMP de 77kDa (diferente de IrgA) que permitem o transporte de heme para dentro da célula.

A regulação da expressão de genes envolvidos com os sistemas de captação de ferro em *V.cholerae* envolve uma proteína denominada Fur que possui 76% de similaridade com a proteína Fur de *E.coli* (Butterton *et al.*, 1992). A regulação por Fur envolve a ligação da proteína Fur, na presença de ferro, a uma sequência operadora de 21pb encontrada nos promotores dos genes regulados por ferro, reprimindo, assim, a transcrição (Calderwood e Mekalanos, 1987). Em *V.cholerae*, Fur funciona como um repressor para os genes *irgA* e *viuA* (Butterton *et al.*, 1992; Goldberg *et al.*, 1990). A regulação de *irgA* também requer uma segunda proteína, IrgB, que age como um ativador de transcrição positivo (Goldberg *et al.*, 1991). O gene *irgB* é localizado imediatamente acima de *irgA* e a transcrição de *irgB* é reprimida por Fur na presença de ferro.

2.5.3. Regulação *in vivo*.

Além dos genes cuja expressão é regulada por ToxR ou por ferro, existem outros genes que são expressos *in vivo* mas não *in vitro*. Sciortino e Finkelstein (1983) mostraram que cultura de *V.cholerae* cultivado em alça ligada de coelho, apresentava um padrão de proteínas diferente de *V.cholerae* cultivado *in vitro*. Algumas pareciam ser induzidas em condições de limitação de ferro. Estudos subsequentes por Richardson e colaboradores (1989) e Jonson e colaboradores (1989) também demonstraram a presença de novas proteínas expressas *in vivo*. Também notaram-se antígenos que eram expressos *in vitro*, mas eram reprimidos *in vivo*. Jonson e colaboradores (1989) encontraram proteínas expressas *in vivo* entre 29 e 100kDa que não eram induzidas por meios pobres em ferro. Não foi observado nenhum aumento na expressão de proteínas reguladas por ToxR, como TCP e OmpU, *in vivo*. A resposta imune humana a proteínas expressas *in vivo* foi examinada por Richardson e colaboradores (1989) utilizando IgG do soro e IgA do fluido intestinal de voluntários em convalescência infectados com *V.cholerae*. Em adição a anticorpos que reagiam com antígenos expressos *in vitro*, tanto o soro como o fluido do jejuno reagiram com vários antígenos produzidos somente *in vivo*.

2.6.Vacinas.

Um ano após o isolamento de *V.cholerae* por Koch em 1883, uma vacina constituída de cultura líquida de *V.cholerae* foi administrada parenteralmente (Bornside, 1981). A vacina parenteral licenciada atualmente nos Estados Unidos consiste de organismos de *V.cholerae* mortos por fenol e promove uma imunidade moderada e de curta duração. A vacina também é reactogênica e uma variedade de sintomas como dor no local, febre, moleza e dor de cabeça foram observados (Tacket *et al.*, 1992). Devido à modesta e curta eficácia e o fato de que estas vacinas não previnem infecções assintomáticas, estas vacinas não são recomendadas pela World Health Organization (WHO) (Glass *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, tem sido reconhecida a importância do sistema imune intestinal na produção de anticorpos protetores, ocasionando uma mudança das vacinas parenterais para as vacinas orais. Uma vez que o *V.cholerae* coloniza a mucosa intestinal sem invadir os enterócitos, acredita-se que a proteção imune seja devida à produção de anticorpos pela mucosa e não pelo soro. Para maximizar a secreção de anticorpos intestinais, os antígenos devem ser entregues diretamente à superfície da mucosa através da via oral (Levine e Pierce, 1992). A administração parenteral de antígenos pode resultar em um aumento de anticorpos SIgA (secretory IgA), porém esta resposta é de curta duração e é usualmente restrita a indivíduos com um excelente sistema imune (Levine e Pierce, 1992). Já a imunização oral, estimula a memória de longa duração permitindo que o sistema imune intestinal possa rapidamente responder a uma subsequente exposição ao antígeno.

Holmgren e Svennerholm (1986) desenvolveram uma vacina oral consistindo na combinação de 1mg da subunidade B de CT purificada e células de *V.cholerae* mortas. Sendo que as linhagens representavam ambos os biotipos e sorotipos e foram mortas por aquecimento ou formalina. Esta vacina denominada B-WC mostrou-se segura e protetora. Mas a limitação no uso desta vacina deve-se a: (1) a menor proteção em pessoas do grupo sanguíneo O; (2) As múltiplas doses requeridas espaçadamente; (3) a proteção transiente em crianças; e (4) o alto custo do preparo de subunidades B e do grande número de bactérias inativadas requeridas.

As linhagens vivas são mais eficientemente incorporadas pelas células M, a principal célula de reconhecimento de antígenos no intestino (Qwen *et al.*, 1986). Além do mais, existem uma série de antígenos reconhecidos durante a infecção que são expressos *in vivo*, mas não *in vitro* (Jonson *et al.*, 1989; Richardson *et al.*, 1989). A possibilidade de se fazer uma vacina viva e atenuada foi inicialmente demonstrada com a linhagem de *V.cholerae* Texas Star-SR, atenuada por mutagênese química de forma a produzir a subunidade B mas não a subunidade A de CT (Honda e Finkelstein, 1979; Levine *et al.*, 1984). Vacinas atenuadas subsequentes a esta foram construídas através de técnicas de DNA recombinante através da obtenção de mutantes deletados

de centenas de pares de base no gene que codifica a subunidade A de CT, evitando a potencial reversão da mutação (Kaper *et al.*, 1994).

A primeira mutação nestas linhagens atenuadas, envolve a deleção de centenas de pares de base do gene *ctxA* clonado que codifica a subunidade A de CT. O promotor de *ctx* e o gene *ctxB*, que codifica a subunidade B são mantidos e os genes mutados são introduzidos em *V.cholerae* selvagem por uma recombinação homóloga. Grande variedade de vacinas atenuadas foram desenvolvidas por pesquisadores do Center for Vaccine Development na University of Maryland (Kaper *et al.*, 1984a; Kaper *et al.*, 1984b; Levine *et al.*, 1988a; Levine *et al.*, 1988b) e na Harvard University (Mekalanos *et al.*, 1983; Pearson *et al.*, 1990).

As primeiras linhagens recombinantes atenuadas de *V.cholerae* O1 El Tor Inaba JBK70, CT (A⁻B⁻), e *V.cholerae* O1 clássico Ogawa CVD101, CT(A⁻B⁺) (Levine *et al.*, 1988b) demonstraram ser imunogênicas, porém reatogênicas. Acreditou-se que esta reatogenicidade poderia ser devida a potenciais toxinas adicionais que foram identificadas posteriormente como hemolisina/citolisina, Zot e Ace (veja acima). O envolvimento de hemolisina foi estudado construindo-se linhagens mutantes derivadas de CVD101 (*V.cholerae* clássico $\Delta ctxA$) e JBK70 (*V.cholerae* El Tor $\Delta ctxA$ e $\Delta ctxB$) que não produziam hemolisina. Os voluntários que receberam estas linhagens CT e hemolisina negativas, ainda apresentaram diarreia e outros sintomas (Levine *et al.*, 1988b). Uma linhagem derivada de *V.cholerae* O1 deletada para os genes que codificam CT, hemolisina/citolisina, Zot e Ace foi construída e denominada CVD110 (Michalski *et al.*, 1993), e esta ainda apresentou a produção de diarreia e outros sintomas em voluntários, demonstrando que existem outros fatores de virulência ainda não descritos que podem ser os responsáveis pela produção desta diarreia residual nestas linhagens de vacinas (Tacket *et al.*, 1993).

Embora as primeiras gerações de vacinas recombinantes tenham sido inaceitavelmente reatogênicas e insuficientemente imunogênicas, existe uma linhagem de vacina recombinante de *V.cholerae* O1 que mostrou-se bem tolerada e bastante imunogênica em extensivos estudos realizados em vários países. Esta linhagem de vacina é denominada *V.cholerae* CVD 103-HgR e

é derivada da linhagem clássica Inaba 569B (Ketley *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1988a) sendo construída através da deleção de 550pb do gene *ctxA*, removendo 94% da região que codifica a subunidade A₁ madura de CT e da inserção de um gene codificando resistência a mercúrio (*mer*) no locus que codifica a hemolisina (*hlyA*) no cromossomo.

3. OBJETIVOS:

Grande parte dos genes relacionados à virulência de *V.cholerae* são positivamente regulados pela proteína ToxR. Esta proteína, também regula positivamente uma proteína de membrana externa ,OmpU (Miller e Mekalanos, 1988), cuja função ainda não é conhecida. O objetivo do presente trabalho foi a purificação da proteína de membrana externa OmpU de *V.cholerae*, a determinação de sua função e seu envolvimento na virulência do *V.cholerae*, a clonagem e o sequenciamento parcial do gene que codifica esta proteína.

4.MATERIAL:

TABELA 1-Amostras utilizadas

Amostra	Genótipo	Referência/Origem
<i>V. cholerae</i>		
395	O1 amostra inaba clássica selvagem	CVD
E7946	O1 El Tor, Ogawa, selvagem	CVD
CVD101	O395 $\Delta ctxA$	(Kaper <i>et al.</i> , 1983)
CVD110	E7946 $\Delta ctxA, \Delta zot, orfU, hlyA::mer-ctxB$	(Michalsky <i>et al.</i> , 1993)
395ToxR-	395, $toxR^-$	CVD
Kb207	El Tor selvagem	CVD
TCP2	Clássica 395 $\Delta tcpA$	(Taylor <i>et al.</i> , 1988)
395 Sm ^r	amostra O395 Sm ^r	CVD
569B	O1 amostra Inaba clássica selvagem	CVD
CVD103-HgR	569B $\Delta ctxA, zot^-, ace^-, orfU^-, hlyA::mer-ctxB$	(Ketley <i>et al.</i> , 1993)
AI1837	sorogrupo O139, capsulado	CVD
1A	AI1827 mutante não capsulado	(Comstock <i>et al.</i> , 1994)
E6	AI1837 mutante acapsulado	(Comstock <i>et al.</i> , 1994)
<i>E. coli</i>		
PAP702	$OmpA^-$	(Pasteur Institut)
SM10 λ pir	$thr, leu, lacY, thi, tyrT, recA, Rp4-2-Tc::Mu$	CVD
S327 λ pir	$F^-, araD \Delta(lac pro), argE(Am), recA56, rif^r, nalA$	CVD
HB101	$hsd20(r-b, m-b)recAB, ara-14, proA2, leu, lacY1, galK2, (Sm^r), rspL20, xyl-5$	CVD
DH5 α	F-s 80d $lacZ M15 (lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(r-k, m-k), supE44 -thi-1, gyrA, relA1$	CVD
XL1-Blue	$supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac F[proAB^+ lacI^q LacZ\Delta M15 Tn10 (tet^r)]$	(LBMP, CBMEG)
<i>Bacillus subtilis</i>		
BR151	selvagem	(Ambulus, N.;UMAB)

CVD= Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, MD, USA

Sm= antimicrobiano estreptomicina; UMAB= University of Maryland at Baltimore;

LBMP= Laboratório de biologia molecular de plantas; CBMEG=Centro de biologia molecular e engenharia genética, UNICAMP.

TABELA 2-Plasmídios utilizados

Plasmídios e cosmídios	Características	Origem
pBluescript IIS-	<i>lacZ</i> , F1, Ap ^r , ColE1 ori	Stratagene
pT291	Tn <i>phoA</i> , Tc ^r , IncP1	CVD
pPH1JI	Gen ^r , Sm ^r , tra, IncP1, Spc ^r	CVD
pGP704	Ap ^r , mobRP4, R6K ori	CVD
λ ZAPII	fagoλ com pBluescript SK	Stratagene

CVD= Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, MD, USA

MCS= Multiple cloning site

Tn*phoA*= Transposon contendo o gene para fosfatase alcalina

Ap= antimicrobiano ampicilina

Tc= antimicrobiano tetraciclina

Gen=antimicrobiano gentamicina

4.1. Meios de cultura:

Na formulação dos meios de cultura e soluções adicionais utilizadas para a manutenção, cultivo e ensaio das amostras bacterianas, foram empregados reagentes de grau P.A. e água destilada ou deionizada (Mili-Q), conforme a necessidade. Os meios de cultura foram sempre autoclavados, a menos que de outra maneira especificado.

4.1.1.LB (Luria Bertani broth)

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g
H ₂ O	1000ml
	pH7,2

4.1.2.LA (Luria Bertani Agar)

LB	1000ml
Ágar	15g
	pH7,2

4.1.3.CYE (Mekalanos, 1988)

Caseína ácido-hidrolisada	30g
Extrato de levedura	5g
H ₂ O	1000ml
	pH7,0

4.1.4.SOC

LB	1000ml
1M MgCl_2	2ml
1M MgSO_4	2ml
1M KCl	0,25ml

4.1.5.Meio Mínimo

4.1.5.1.Solução de sais 10X

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20g
K_2HPO_4	140g
KH_2PO_4	60g
Na Citrato. $2\text{H}_2\text{O}$	10g
H_2O	1000ml

4.1.5.2.Meio mínimo

dH_2O	9ml
Solução de sais 10X	1ml
Glicose 50%	0,10ml
Caseína hidrolizada 5%	0,10ml
MgSO_4 1M	0,05ml
Metionina 10mg/ml	0,05ml
Triptofano 10mg/ml	0,05ml
Lisina 10mg/ml	0,05ml

4.1.6. Meio LBM

Meio LB	1000ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,46g

4.2. Soluções e Tampões:

4.2.1. Tampão HMNS (Miller e Mekalanos, 1988)

50mM HEPES
10mM MgCl ₂
150mM NaCl
5% sacarose

4.2.2. Soluções para SDS-Page:

4.2.2.1. Solução de Acrilamida (30:0,8% acrilamida:bis)

Acrilamida	30g
Bis-acrilamida	0,8g
H ₂ O	100ml

4.2.2.2. Tampão do gel de resolução

Tris-base	90,83g
H ₂ O	500ml
	pH8,8

4.2.2.3. Tampão do gel de empacotamento

Tris-base	30,28g
H ₂ O	500ml
	pH6,8

4.2.2.4. Tampão Tris-Glicina

50mM Tris-base
384mM glicina
0,1% SDS

4.2.2.5. Tampão de Ressuspensão das amostras

20% SDS
20% glicerol
200mM tris-base (pH6,8)
0,001% azul de bromofenol

4.2.2.6. Gel de resolução (35ml)

solução estoque	acrilamida		
	10%	12%	14%
Acrilamida: Bis	11,70ml	14,0ml	16,30ml
Tampão de resolução	8,75ml	8,75ml	8,75ml
10% SDS	0,35ml	0,35ml	0,35ml
20% NaCl	0,70ml	0,70ml	0,70ml
dH ₂ O	3,30ml	11,00ml	8,70ml
10% Persulfato de amônio	0,30ml	0,30ml	0,30ml
TEMED	0,02ml	0,02ml	0,02ml

4.2.2.7. Gel de empacotamento

Solução estoque	volume para 10ml de solução
Acrilamida: Bis	1,50ml
Tampão de empacotamento	5,00ml
10% SDS	0,10ml
dH ₂ O	3,35ml
10% Persulfato de amônio	0,03ml
TEMED	0,03ml

4.2.3.Soluções para coloração com Coomassie blue

4.2.3.1.Solução de Coomassie blue

Coomassie blue	0,5g em 50ml de etanol
Ácido acético	500ml
Etanol	200ml
H ₂ O	200ml

4.2.3.2.Solução de descoloração de Coomassie blue

Metanol	50ml
Ácido acético glacial	75ml
Glicerol	0,5ml
H ₂ O	875ml

4.2.4. Padrões de pesos moleculares de proteínas

4.2.4.1. Padrões de alto peso molecular

Proteína	Peso molecular (kDa)
Miosina (cadeia H)	200,0
Fosforilase B	97,4
Sero-albumina bovina	68,0
Ovoalbumina	43,0
Anidrase carbônica	29,0
β -lactoalbumina	18,4
Lisozima	14,3

4.2.4.2. Padrões de baixo peso molecular

Proteína	Peso molecular (kDa)
Ovoalbumina	43,0
Anidrase carbônica	29,0
β -lactoalbumina	18,4
Lisozima	14,3
Inibidor de tripsina bovina	6,2
Insulina (cadeias α e β)	2,3 e 3,4

4.2.5. Tampão de transferência

192mM Glicina

25mM Tris-base

15% metanol

pH8,3

4.2.6. Tampão de transferência CAPS

10mM CAPS (3-[ciclohexilamino]-1-ácido propanisulfúrico

10% metanol

pH11,0

4.2.7. Coloração com Amido Black

4.2.7.1. Solução de Amido Black

0,1% Amido Black

10% Metanol

2% Ácido Acético Glacial

4.2.7.2. Solução de descoloração de Amido Black

90% Metanol

2% Ácido Acético Glacial

8% H₂O

4.2.8. Tampão PBS

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,15g
KCl	0,20g
NaCl	8,00g
KH_2PO_4	0,20g
H_2O	100ml
	pH7,4

4.2.9. Soluções para eletroeluição de proteínas

4.2.9.1. 0,2M Tris/Acetato (pH7,4), 1% SDS

Acetato de sódio	0,14g
Tris-HCl	0,16g
SDS (20%)	263ml
H_2O	5ml

4.2.9.2. Tampão de corrida

Acetato de sódio	0,14g
Tris-HCl	7,90g
SDS (20%)	5ml
Tioglicolato de sódio	0,06g
	pH7,4

4.2.9.3. 0,2M Bicarbonato de sódio, 0,02% SDS

Bicarbonato de sódio	50,40g
SDS (20%)	3ml
H ₂ O	3000ml

4.2.10. Tampão carbonato

Na ₂ CO ₃	1,18g
NaHCO ₃	3,47g
H ₂ O	1000ml
	pH9,5

4.2.11. Soluções para extração de plasmídeo

4.2.11.1. Solução I

Lisozima	10mg
0,5M EDTA	0,1ml
1M Tris, pH8,0	0,125ml
Glicose 20%	222ml
H ₂ O	4,55ml

4.2.11.2. Solução II

10N NaOH	0,2ml
20% SDS	0,5ml
H ₂ O	9,3ml

4.2.11.3. Solução III

3M Acetato de Sódio (pH4,8)

4.2.12. Tampão Tris-borato (TBE)

89mM Tris base

2,8mM Na₄EDTA

89mM Ácido bórico

4.2.13. Stop mix (5X)

0,07% Azul de bromofenol

7% SDS

20% Ficoll

4.2.14. Tampão TE

10mM Tris-base

1mM EDTA

4.2.15. Tampão TES (1X)

10mM Tris-base

5mM EDTA

10mM NaCl

pH8,0

4.2.16. Solução de Denhardt's (10X)

0,2% Ficoll

0,2% Vinilpirrolidona

0,2% Sero-albumina bovina

4.2.17.SSC (1X)

0,15M NaCl

0,015M Na₃ Citrato 2H₂O

pH7,0

4.2.18.Tampão de neutralização

1,0M Tris

0,6M NaCl

pH7,0-7,5

4.2.19.Solução de desnaturação para Southern blot

NaOH 10M	20ml
----------	------

NaCl	35g
------	-----

H ₂ O	1000ml
------------------	--------

4.2.20.Solução de hibridização para sondas marcadas por extensão por "primer" aleatório (40% formamida)

100% formamida	2ml
----------------	-----

20X SSC	1,25ml
---------	--------

20% SDS	25ml
---------	------

Esperma de salmão (fervido)	10ml
-----------------------------	------

0,5 EDTA pH8,0	10ml
----------------	------

10X Denhardt's	0,50ml
----------------	--------

H ₂ O	1,25ml
------------------	--------

4.2.21. Solução de lavagem para sondas marcadas por extensão por "primer" aleatório

5X SSC

0,1% SDS

4.2.22. Enzimas e tampões para biologia molecular

Todas as enzimas e tampões utilizados nas técnicas de biologia molecular são procedentes da Gibco BRL ou da Pharmacia.

4.2.23. Soluções para extração de DNA genômico

4.2.23.1. Tampão de lise

100mM Tris pH7,8

50mM EDTA

5% SDS

4.2.24. Tampões de transformação

4.2.24.1. Tampão TfbI

30mM KOAc

100mM RbCl

10mM CaCl₂

50mM MnCl₂

Glicerol 15%

pH5,8

4.2.24.2. Tampão TfbII

10mM MOPS

75mM CaCl₂

10mM RbCl

glicerol 15%

pH6,5

4.2.25. Soluções para sequenciamento de DNA

4.2.25.1. Solução de denaturação

10M NaOH	20ml
----------	------

0,5M EDTA	2ml
-----------	-----

H ₂ O	980ml
------------------	-------

4.2.25.2. Solução de neutralização

2M Acetato de Amônio

pH4,5

4.2.25.3. Gel de sequenciamento 7,2%

Acrilamida (19:1) 40%	180ml
-----------------------	-------

Urea	420g
------	------

Tampão tris-borato 10X	100ml
------------------------	-------

H ₂ O	320ml
------------------	-------

4.2.25.4. Kit de sequenciamento

O kit de sequenciamento utilizado foi o 70770 sequenase version 2.0 DNA sequencing kit da United States Biochemical Corporation.

4.2.26. Tampão de adesão para purificação de fragmentos F(ab)₂

Tampão Tris 0,1M

pH8,0

4.2.27. Tampão de eluição para purificação de fragmentos F(ab)₂

Tampão Glicina 0,1M

pH2,8

4.2.28. Tampão de digestão para purificação de fragmentos F(ab)₂

Acetato de sódio 2,72g

H₂O 1000ml

pH2,8

4.2.29. Solução SM

50mM Tris-HCl pH7,5

100mM NaCl

10mM MgSO₄

5.MÉTODOS

5.1.Extração de proteínas de membrana externa (OMPs).

A extração de proteínas de membrana externa (OMPs) foi realizada conforme descrito por Miller e Mekalanos (1988). As amostras foram crescidas a diferentes temperaturas (30°C, 37°C e 15°C) por 18 horas sob agitação (150rpm) em 200mls de meio CYE (4.1.3), centrifugadas a 10000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 100mls de tampão HMNS (4.2.1). A seguir, centrifugou-se por 10 minutos a 10000g a 4°C, descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o sedimento em 30mls de tampão HMNS, a suspensão foi, então, colocada em uma prensa francesa a 15000lb/in² para lisar as células e a seguir centrifugada por mais 10 minutos a 10000g para remover as células não lisadas. O sobrenadante, contendo as células lisadas, foi coletado e centrifugado em um rotor Beckman Ti50 por 90 minutos a 12000rpm a 5°C, e o sedimento, contendo as membranas interna e externa, suspenso em 20mls de tampão HMNS. A esta suspensão foram adicionados 4mls de triton X100 10%-10mM MgCl₂, e esta incubada por 20 minutos a 25°C e a seguir centrifugada em um rotor Beckman Ti50 a 40000rpm por 90 minutos a 5°C. O sedimento final, contendo as proteínas de membrana externa que são insolúveis em triton, foi então suspenso em 24mls de tampão HMNS.

5.2.Extração de proteínas totais.

As amostras foram crescidas a 37°C por 18 horas em meio LB, centrifugadas a 10000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, o sedimento suspenso em tampão HMNS por "vortex", lisando a parede celular, e as suspensões foram aquecidas em banho maria a 100°C por 5 minutos.

5.3. Eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE.

A eletroforese de proteínas foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970) em um gel composto de géis de separação e empacotamento conforme descrito nos itens 4.2.2.6 e 4.2.2.7. A eletroforese foi conduzida com tampão Tris-glicina (4.2.2.4) sob uma corrente de 100mA por 3 horas em uma cuba modelo SE600 da Hoefer Scientific Instruments.

5.4. Coloração de Coomassie blue.

O gel foi colocado em solução de Coomassie blue (4.2.3.1) por uma hora e a seguir colocado em solução de descoloração (4.2.3.2) por 18 horas ou até que as bandas protéicas fossem visíveis.

5.5. Purificação de proteínas para sequenciamento amino-terminal.

Realizou-se a eletroforese em gel SDS-PAGE (5.3) por 3 horas em tampão tris-glicina (4.2.2.4) sob uma corrente de 100mA. Cortou-se um pedaço da membrana de transferência (Immobilon-P, Millipore) do tamanho do gel, a qual foi umedecida em metanol 100%. O sistema de transferência foi montado conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989) em tampão de transferência CAPS (4.2.6) por 3 horas sob uma corrente de 200mA. A membrana de transferência foi corada com amido black (4.2.7.1) por 5 minutos e depois descorada com solução de descoloração de amido black (4.2.7.2) até as bandas protéicas tornarem-se visíveis. A banda protéica de interesse foi cortada e enviada para sequenciamento amino terminal.

5.6. Sequenciamento amino terminal.

O sequenciamento amino-terminal foi realizado pelo Dr. Robert Hall na Food and Drug Administration (FDA) em Washington (D.C) através da degradação automática de Edman (890M; Beckman Instruments).

5.7. Western-blotting.

Os experimentos de "Western-blotting" foram realizados conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). Foi realizada a eletroforese de proteínas em um gel SDS-PAGE 12,5% (5.3), por 3 horas em tampão tris-glicina (4.2.2.4) sob uma corrente de 100mA. A seguir cortou-se uma folha de papel de filtro de nitrocelulose do tamanho aproximado do gel e este foi umedecido em água destilada. Foi montado o sistema de transferência e a transferência realizada em tampão de transferência (4.2.5) por três horas sob uma corrente de 200mA. O filtro foi bloqueado por duas horas à temperatura ambiente em tampão PBS (4.2.8) /0,5% Tween 20/ 3% leite desnatado sob leve agitação. Após este período adicionou-se o anticorpo primário e incubou-se por uma hora à temperatura ambiente sob leve agitação. O filtro foi lavado em tampão PBS/ 0,5%Tween 20 por 3 vezes de 20 minutos cada, e colocados em presença do anticorpo secundário (anti-IgG, Sigma, conjugado com fosfatase alcalina) na diluição de 1:2000 por 1 hora à temperatura ambiente. O filtro, a seguir, foi lavado por mais três vezes de vinte minutos cada em tampão PBS/ 0,5%Tween 20 e adicionando-se o substrato BCIP (Sigma) para fosfatase alcalina com agitação até o aparecimento de bandas. O filtro foi mergulhado em água e fotografado.

5.8. Purificação de proteínas para obtenção do antissoro policlonal específico

A purificação de proteínas e a obtenção de antissoro policlonal específico foram realizadas conforme descrito por Harlow e Lane (1989). Realizou-se eletroforese das proteínas em gel SDS-page 12,5% por 3 horas sob uma corrente de 100mA em tampão Tris-glicina (5.3). O gel foi corado com Coomassie blue, conforme descrito no item 5.4, e a banda protéica de interesse foi excisada do gel, congelada a -70°C por 30 minutos, liofilizada por 18 horas, macerada e metade do total de proteína obtida suspensa em 1ml de tampão PBS e 1ml de adjuvante completo de Freund e aplicada no coelho. Após 21 dias aplicou-se a segunda metade da proteína purificada no coelho, tendo sido esta suspendida em 1ml de tampão PBS e 1ml de adjuvante incompleto de Freund. Após um período de 10 dias, o coelho foi sangrado as hemácias separadas do soro por centrifugação a 5000rpm por 10 minutos a 4°C, o antissoro coletado e o título e especificidade do antissoro medido por testes de Western-blot e ELISA.

5.9. Purificação de proteínas por eletroeluição.

A purificação de proteínas por eletroeluição foi realizada conforme descrito por Harlow e Lane (1989). Realizou-se a eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE 12,5% (5.3), conforme descrito no item 5.3. O gel foi corado com KCl 0,25M/ DTT 1mM conforme descrito por Hager e Burgess (1980) (esta solução estando a 4°C) até o aparecimento das bandas protéicas. As bandas proteicas de interesse foram excisadas do gel e colocadas cada uma em um saco de diálise contendo 1ml da solução 4.2.9.1 e eletroeluídas por 3 horas a 100V em Tampão de corrida (4.2.9.2). As soluções foram removidas dos sacos de diálise e dializadas contra Bicarbonato de sódio 0,2M/ SDS 0,02% (4.2.9.3) por 24 horas a 4°C. Após as soluções terem sido removidas dos sacos de diálise, foram congeladas a -70°C por 15 minutos e liofolizadas por 24 horas, suspensas em 10mls de água destilada e liofolizadas novamente por 24 horas. Os sedimentos foram então suspensos em 250µls de água destilada.

5.10. ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay").

Os experimentos de ELISA foram realizados conforme descrito em Harlow e Lane (1989). Uma placa de acrílico Falcon de 94 canaletas foi recoberta com o antígeno em tampão carbonato (4.2.10) em diferentes concentrações a 4°C por 18 horas e a seguir lavada 3 vezes com tampão PBS/ 0,5%Tween 20 e bloqueada com tampão PBS/ 0,5%Tween 20/ 1%BSA ("bovine-serum-albumine") por 2 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão PBS/ 0,5%tween 20, adicionou-se o anticorpo primário em diferentes concentrações e incubou-se à temperatura ambiente por uma hora. A seguir, lavou-se novamente 3 vezes com tampão PBS/ 0,5%Tween 20, incubou-se uma hora com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1:2000 a temperatura ambiente, lavou-se 3 vezes com tampão PBS/ 0,5%Tween 20, adicionou-se o substrato para a fosfatase alcalina (Sigma) e realizou-se a leitura da placa em espectrofotômetro na DO (Densidade óptica) de 405nm depois de intervalos de 15 minutos, 30 minutos e 1 hora.

5.11. Testes de adesão de OmpU à fibronectina, colágeno, laminina e ao tripeptídeo Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD).

Uma placa de acrílico Falcon de 94 canaletas foi recoberta com fibronectina (Sigma) ou laminina (Sigma) ou colágeno (Sigma) ou RGD (sintetizado no Biopolimer Laboratory, University of Maryland) em tampão carbonato (4.2.10) em diferentes concentrações por 18 horas a 4°C. A seguir, lavou-se 3 vezes com tampão PBS/ 0,5%Tween 20, bloqueou-se por 2 horas à temperatura ambiente com PBS/ 0,5%Tween 20/ 1%BSA e incubou-se com o antígeno (proteínas de membrana externa de *Vibrio cholerae*) na concentração de 1:100 em tampão PBS/ 0,5%Tween 20 por uma hora à temperatura ambiente. Após este período, lavou-se 3 vezes com PBS/ 0,5%Tween 20, incubou-se por uma hora com anticorpo primário (anti-OmpU) na

concentração de 1:100 em PBS/ 0,5%Tween 20 à temperatura ambiente, lavou-se 3 vezes com PBS/ 0,5%Tween 20 e incubou-se por uma hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário na concentração de 1:2000 em PBS/ 0,5%Tween 20. Após este procedimento, lavou-se 3 vezes com PBS/ 0,5%Tween 20, adicionou-se o substrato para a fosfatase alcalina e a leitura foi realizada no espectrofotômetro na densidade óptica de 405nm depois de intervalos de 30 minutos e 60 minutos.

5.12. Testes de inibição de adesão de OmpU à fibronectina e RGD

A placa de acrílico Falcon de 94 canaletas foi recoberta com fibronectina ou RGD em tampão carbonato (4.2.10) nas concentrações de 1:2000 e de 1:1000 respectivamente, por 18 horas a 4°C. A seguir, lavou-se 3 vezes com tampão PBS/0,5%Tween 20, bloqueou-se por 2 horas à temperatura ambiente com 200ml de PBS/0,5%Tween 20/1% BSA, incubou-se com 100µls de RGD nas concentrações de 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000 a placa recoberta com fibronectina, e com 100µls de fibronectina nas concentrações de 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000 a placa recoberta com RGD por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se 3 vezes com PBS/0,5%tween 20. Como foi descrito anteriormente (Patti *et al.*, 1994) que fibronectina se liga a RGD e vice versa, se o receptor de OmpU na fibronectina for o mesmo de RDG, o RGD bloqueará a ligação de OmpU a fibronectina, ou a fibronectina bloqueará sua ligação ao RGD. Sendo assim, adicionaram-se 100µls de OMPs da amostra de *V. cholerae* CVD101 (Tab.1) na concentração de 1:100 em PBS/0,5%Tween 20 e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente. Após este procedimento, lavou-se 3 vezes com PBS/0,5%Tween 20, incubou-se com 100µls do antissoro anti-OmpU diluído de 1:100 em PBS/Tween 20 por 1 hora à temperatura ambiente, lavou-se 3 vezes com PBS/0,5%Tween 20, incubou-se com o anticorpo secundário na concentração de 1:2000, lavou-se mais 3 vezes, adicionou-se o substrato para a fosfatase alcalina e a leitura sendo realizada em espectrofotômetro na densidade óptica de 405nm depois de intervalos de 30 e 60 minutos.

5.13. Cultura de células HeLa, Int- 407 e HEp-2.

Para a manutenção das linhagens celulares, as células foram cultivadas em 50mls de meio MEM (minimal essential medium) da GIBCO + 5mls de soro fetal bovino (BSA) (10% do volume final) + 0,5mls de antibiotic-antimycotic (GIBCO, 10000U/ml de penicilina G sódio, 10000µg/ml de sulfato de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina B em salina 0,85%) em garrafas de cultura Falcon de 150mls a 37°C até que houvesse a formação de uma monocamada de células.

5.14. Teste de adesão das amostras de *V. cholerae* as células HeLa, Int-407 e HEp-2

As células HeLa, Int-407 e HEp-2 foram crescidas a 37°C até que formassem uma monocamada conforme descrito no item 5.13, e, a seguir, lavadas com 10mls de tampão PBS (esterilizado). A esta suspensão celular foi adicionado 1ml de tripsina e esta incubada a 37°C por 5 minutos para suspender as células. A seguir, adicionaram-se, então, 50mls de meio MEM+1% D-Manose.

Em uma lâmina "Chamber slide" da Lab-TeK nº177402, foram colocados 100µls de suspensão celular ($DO_{600}=5 \times 10^7$ cfu/ml) por canaleta, a cada canaleta adicionaram-se 30µls de bactérias (*V. cholerae* 395, E7946, TCP2, 569B, CVD103-HgR, AI1837, 1A, E6 e *E. coli* E2348/69) cultivadas em meio LB por 18 horas a 37°C ($DO_{600}=5 \times 10^7$ cfu/ml). Após incubação por 3 horas a 37°C, a lâmina foi lavada com tampão PBS 6 vezes, a cultura fixada com metanol 100% por 20 minutos à temperatura ambiente e após remoção do metanol corou-se com giemsa (filtrado) por 20 minutos e as preparações celulares, em lâmina, foram observadas com o auxílio de um microscópio óptico, sendo a adesão quantificada conforme descrito adiante no item 5.19.

5.15. Inibição da adesão das amostras de *V. cholerae* às células HeLa, Int-407 e HEp-2 com os antissoros anti-OmpU e anti-TcpA.

As células HeLa, Int-407 e HEp-2 foram cultivadas conforme descrito no item 3.13 até a formação de uma monocamada. A seguir foram lavadas 1 vez com 10mls de tampão PBS, adicionou-se 1ml de tripsina, incubou-se a 37°C por 5 minutos e adicionaram-se 50mls de meio MEM+1% D-manose. A seguir, colocaram-se 100µls destas culturas em cada canaleta de uma lâmina "Chamber slide" da Lab-Tek nº177402 e sobre as mesmas foram colocados 30µls das culturas bacterianas das linhagens 395, e7946, TCP2, 569B, CVD103-HgR, AI1837, 1A e E6 de *V. cholerae* e E2348/69 de *E. coli* enteropatogênica cultivadas em meio LB por 18 horas a 37°C ($DO_{600}=5 \times 10^7$ cfu/ml). As células HeLa, HEp-2, Int-407 e as culturas bacterianas foram incubadas separadamente, anteriormente, por 20 minutos à temperatura ambiente com os antissoros anti-OmpU, soro normal de coelho e anti-TcpA (contra a subunidade do *pilus* TCP) nas concentrações de 1:10, 1:25, 1:50 e 1:100 em 100mls de meio MEM+1% D-manose. Esta mistura foi adicionada às células e incubada a 37°C por 3 horas, a qual foi, a seguir, lavada 6 vezes com PBS, fixada com metanol 100% por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a remoção do metanol corou-se com giemsa (filtrado) por 20 minutos. As preparações celulares, assim obtidas em lâminas, foram observadas com o auxílio de um microscópio óptico e fotografadas.

5.16. Preparo de fragmentos F(ab)₂ de antissoro anti-OmpU.

O preparo de fragmentos F(ab)₂ foi realizado com o "kit" da PIERCE conforme as especificações do fabricante. A purificação das imunoglobulinas pertencentes à classe das IgG do antissoro foi realizada utilizando-se uma coluna de sefarose-proteína A (PIERCE), esta coluna foi equilibrada em um Erlenmeyer com o tampão de adesão (4.2.26) e este foi retirado com o auxílio

de uma pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido duas vezes e a resina empacotada em uma coluna de 5mls e, a seguir, lavada com o equivalente a 10 volumes do tampão de adesão (4.2.26).

Foram diluídos 2mls do antissoro anti-OmpU em 18mls do tampão de adesão (4.2.26) e este foi aplicado na coluna de sefarose-proteína A. A seguir, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de adesão (4.2.26) e os IgGs do antissoro eluídos da coluna com 2mls do tampão de eluição (4.2.27). No frasco coletor foi colocado 1ml de Tris 1M para neutralização dos IgG. Os IgGs foram dializados em água por 18 horas a 4°C, congelados e liofilizados por 18 horas.

A coluna de sefarose-proteína A foi reequilibrada com 10 volumes do tampão de adesão (4.2.26).

Após a sua purificação, os IgGs foram digeridos com pepsina. Para equilibrar a pepsina imobilizada (PIERCE), 0,25mls da pepsina imobilizada 50% foram colocados em um tubo de ensaio e a este adicionaram-se 4mls do tampão de digestão (4.2.28). Após sedimentação da pepsina no fundo do tubo, o tampão de digestão foi aspirado com uma pipeta Pasteur. A pepsina imobilizada foi, então, suspensa em 500µls do tampão de digestão (4.2.28). A esta pepsina adicionou-se 1 ml dos IgGs do antissoro e incubou-se por 4 horas a 37°C a 150rpm, após o qual o tubo foi colocado em repouso. Após nova sedimentação da pepsina, o sobrenadante (contendo os fragmentos F(ab)₂, Fc e IgGs não digeridos) foi recolhido com uma pipeta Pasteur. Este sobrenadante foi aplicado à coluna de sefarose-proteína A reequilibrada, que foi eluída com 6mls do tampão de adesão (4.2.26). O eluato, a seguir, foi coletado e dializado contra tampão PBS pH7,4 por 18 horas a 4°C utilizando tubos de diálise com um limite de exclusão de peso molecular de 50kDa para eliminar os fragmentos Fc restantes. A quantidade de fragmentos F(ab)₂ obtida foi estimada pelo "Biorad Protein Assay".

5.17. Inibição da adesão de amostras de *V. cholerae* às células HEp-2 com fragmentos F(ab)₂ do antissoro anti-OmpU.

Para os experimentos de inibição de adesão, as células HEp-2 foram cultivadas conforme descrito no item 5.13 e incubadas em lâminas Chamber da Lab Tek nº177402 conforme descrito no item 5.14. As amostras 395, E7946, TCP2, 569B e AI1837 de *V. cholerae* foram cultivadas em 3mls de meio LB (18 horas a 37°C). Uma alíquota de 30µls destas bactérias e as células HEp-2, foram incubadas, separadamente, por 20 minutos à temperatura ambiente com os fragmentos F(ab)₂ do antissoro anti-OmpU nas concentrações de 8mg/ml, 3,2mg/ml e 1,6mg/ml em meio MEM+1% D-manose. As bactérias foram adicionadas às células e incubadas a 37°C por 3 horas, a lâmina foi lavada 6 vezes com tampão PBS, fixada com metanol 100% por 20 minutos à temperatura ambiente, o metanol removido, a lâmina corada com Giemsa por 20 minutos à temperatura ambiente e visualizada com o auxílio de um microscópio óptico.

5.18. Inibição de adesão de amostras de *V. cholerae* a células HEp-2 com fibronectina e RGD.

As células HEp-2 foram cultivadas conforme descrito no item 5.13 e incubadas em lâminas Chamber da Lab Tek nº177402 conforme descrito no item 5.14. As amostras 395, E7946, TCP2, 569B e AI1837 de *V. cholerae* foram crescidas em 3ml de meio LB por 18 horas a 37°C. Um volume de 30µl destas bactérias, e as células HEp-2, foram incubadas, separadamente, por 20 minutos à temperatura ambiente com fibronectina ou RGD nas diluições de 1:10, 1:25, 1:50 e 1:100 em meio MEM + 1% D-manose. As bactérias foram adicionadas às células e incubadas a 37°C por 3 horas, a lâmina lavada 6 vezes com PBS, fixada com metanol por 20 minutos à temperatura ambiente, o metanol removido, a lâmina corada com Giemsa por 20 minutos à temperatura ambiente e visualizada com o auxílio de um microscópio óptico.

5.19. Porcentagem de aderência de diferentes linhagens de *V. cholerae* a células HEp-2.

As células HEp-2 foram cultivadas em placas de cultura de tecidos Falcon com 24 canaletas até atingirem a densidade de 1×10^5 células/canaleta utilizando as condições de cultura de células descritas no item 3.13, as monocamadas celulares foram lavadas 3 vezes com PBS esterilizado e pré-incubadas em meio MEM/0,04% bicarbonato de sódio por 30 minutos a 37°C em CO₂ 5%.

As bactérias foram cultivadas em 2mls de meio LB por 18 horas a 37°C, o volume de bactérias com uma DO₆₀₀=1,5 foi centrifugado e suspenso em 100µls de MEM (DO₆₀₀=5 X 10⁷ cfu/ml). A cada canaleta foram adicionados 20µls da cultura de bactérias. Dois microlitros do restante da cultura foram diluídos serialmente e plaqueados em meio LA para determinar o número de cfus (unidades de formação de colônia) adicionados a cada canaleta (essas condições normalmente resultam em 1 X 10⁷ bactéria por 10⁵ células HEp-2).

Após incubação por 30 minutos a 37°C (5% CO₂) e lavagem das monocamadas 3 vezes com PBS esterilizado, foram adicionados 200µls de 1% Triton X100 em PBS a cada canaleta para lisar as células epiteliais e agitado à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Foram adicionados 800µls de meio LB para suspender a mistura de bactérias e células HEp-2 lisadas e 20µls dessa suspensão foram diluídos serialmente e plaqueados em meio LA para determinar o número de cfus associados às células HEp-2.

A aderência é calculada através da porcentagem do inóculo recuperada das células HEp-2 após incubação por 30 minutos.

5.20. Teste de proteção passiva em camundongos recém-nascidos contra *V. cholerae* com o antissoro anti-OmpU e os fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU.

Foi utilizado o modelo de proteção passiva contra cólera em camundongos recém-nascidos descrito por Baselski *et al.* (1977) e Freter *et al.* (1981). As linhagens de *V. cholerae* clássica 395 e El Tor E7946 foram cultivadas em meio LB (18 horas, 150rpm, 37°C). As culturas foram centrifugadas a 8000g por 10 minutos a 4°C, lavadas com PBS e sua concentração ajustada para 10¹⁰ vibrios/ml (DO de 600nm). Foram centrifugadas a 13000g por 5 minutos e suspensas no mesmo volume com a preparação de antissoros (anti-OmpU, fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU, anti-TcpA e soro pré-imune de coelho) diluída de 1:25 em PBS. As suspensões foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente. Após este período, os camundongos foram inoculados oralmente com 50µl (5 X 10⁸) dessas culturas. Os camundongos foram observados quanto a presença diarreia e sobrevivência após 48 horas.

5.21. Teste de inibição de colonização intestinal de camundongos recém-nascidos por *V. cholerae* com antissoro anti-OmpU.

O preparo da suspensão de bactérias com os antissoros (anti-OmpU, anti-TcpA e soro pré-imune de coelho) foi realizada conforme descrito no item 3.20 com as linhagens clássica 395 e El Tor E7946 de *V. cholerae*.

Os camundongos, após serem inoculados, foram sacrificados (24 horas) e seus intestinos retirados e homogeneizados em solução salina 0,5M. Estes foram plaqueados em diferentes diluições em LA + Sm para a linhagem 395 e LA para a linhagem E7946 e os cfu (unidades de formação de colônias) determinados.

5.22.Extração de DNA genômico.

O DNA genômico foi extraído conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). Inoculou-se a amostra 395 de *Vibrio cholerae* em 200mls de meio LB e incubou-se a 37°C por 18 horas a 150rpm. Após este período, esta foi centrifugada a 10000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 45mls de tampão TES (4.2.16). A esta suspensão, adicionaram-se 5ml de tampão de lise (4.2.23) e 200µls de proteinase K (20mg/ml) e a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos a 150rpm. A seguir, adicionou-se igual volume de fenol, previamente equilibrado com TES, centrifugou-se a 10000g por 10 minutos a 4°C, recuperou-se a fase aquosa e a esta adicionou-se igual volume de clorofórmio. Esta mistura foi homogeneizada, centrifugada a 10000g por 10 minutos a 4°C, repetindo-se este procedimento mais uma vez. À fase aquosa, adicionaram-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol 100% gelado, mantendo 10 minutos no gelo. Esta mistura de reação foi passada por um tubo "sieve", o qual retém somente o DNA, e o mesmo lavado com etanol 100% e suspenso em 9,5mls de dH₂O. A esta solução adicionaram-se 0,5mls de TES e 0,1ml de RNase (10mg/ml), incubou-se a 60°C por 1 hora e repetiu-se a extração com fenol e clorofórmio, conforme descrito anteriormente por várias vezes até que a interface quase desaparecesse. A seguir, adicionaram-se 0,1 volume de acetato de sódio e 0,6 volumes de isopropanol gelado enquanto enrolava-se o DNA com um bastão de vidro. Este bastão foi lavado com etanol 95% e seco à temperatura ambiente, o DNA foi suspenso em dH₂O por 18 horas a 4°C.

5.23.Extração de DNA genômico por colunas de QUIAGEN.

A extração de DNA genômico por colunas QUIAGEN foi realizada conforme especificações do fabricante.

5.24. Extração de plasmídios em larga escala.

A extração de plasmídios em larga escala foi realizada conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). As amostras bacterianas foram crescida em 250mls de meio LB (37°C por 18 horas a 150rpm) e centrifugadas a 5000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em 5mls de solução I (4.2.11.1) e esta suspensão mantida em gelo por 30 minutos. A seguir, adicionaram-se 10mls de solução II (4.2.11.2), misturou-se por inversão e deixou-se no gelo por 5 minutos. Após este período de tempo, adicionaram-se 7,5mls de solução III (4.2.11.3), deixou-se no gelo por 30 minutos e centrifugou-se por 15 minutos a 12000rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a este adicionaram-se 0,6 volumes de isopropanol gelado. Após 10 minutos no gelo, sedimentou-se o DNA por centrifugação (10 minutos a 10000rpm a 4°C). A seguir, o sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com 25ml de etanol 80%. Por centrifugação (10 minutos a 10000rpm a 4°C) sedimentou-se o DNA, e este, a seguir, foi seco a vácuo e suspenso em 4mls de tampão TE (4.2.15).

5.25. Purificação plasmidial por gradiente de Cloreto de Césio.

A purificação de DNA por gradiente de cloreto de césio foi realizada conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). Para a purificação de DNA plasmidial por cloreto de césio, adicionaram-se 4g de CsCl aos 4mls de DNA em tampão TE (5.24), mediu-se a densidade óptica que deve ser de 1,386. A esta suspensão adicionaram-se, a seguir, 0,8mls de brometo de etídio (10mg/ml) para cada 10mls de solução e a mesma foi colocada em um tubo plástico para centrífuga. A centrifugação foi realizada no rotor Vti80 por 79000rpm por três horas, e, a seguir, com o auxílio de uma luz ultravioleta longa a banda de DNA plasmidial foi extraída com uma seringa. Para extrair o brometo de etídio, um volume igual de isopropanol, equilibrado com TE e CsCl, foi adicionado sobre a solução de DNA, e após homogeneização, desprezou-se a fase rosa. Este procedimento foi repetido até que todo o brometo tivesse sido retirado. A solução final foi

transferida para um saco de diálise e este foi dializado por 18 horas contra tampão TES (4.2.16). O DNA assim purificado foi utilizado nas diversas reações de digestão com endonucleases e sequenciamento.

5.26.Extração de plasmídios em pequena escala.

Esta extração foi realizada conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). Para extração de plasmídios em pequena escala utilizaram-se culturas bacterianas crescidas em 3mls de meio LB acrescido de antibiótico por 18 horas a 37°C. Estas culturas foram centrifugadas a 12000g por 1 minuto, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 100µls de solução I (4.2.11.1), mantido no gelo por 1 minuto. A seguir, adicionaram-se 200µls de solução II (4.2.11.2) e após homogeneização por inversão esta suspensão foi mantida em gelo por 5 minutos. Após este período de tempo, adicionaram-se 150µls de solução III (4.2.11.3) e a mistura resultante foi mantida em gelo por 15 minutos. A seguir, centrifugou-se a 12000g por 5 minutos e transferiu-se 400µls do sobrenadante para outro tubo eppendorf, a este tubo foi adicionado 1ml de etanol 100% gelado o qual foi mantido em gelo por 10 minutos. Para precipitar o DNA, o tubo foi centrifugado por 6 minutos a 12000g descartando-se o sobrenadante. O sedimento obtido foi seco a vácuo e suspenso em 50µls de solução I.

5.27.Extração de plasmídios por coluna de QUIAGEN.

A extração de plasmídios por colunas QUIAGEN foi realizada conforme as especificações do fabricante.

5.28. Obtenção de peptídios internos de OmpU.

Realizou-se a eletroforese das OMPs da amostra de *V. cholerae* CVD101 (Tab.1) em gel SDS-page 12,5%, conforme descrito no item 5.3, este foi corado com Coomassie blue conforme descrito no item 5.4 e a banda correspondente a OmpU excisada do gel. OmpU foi digerida com papaína. Os peptídios internos foram separados por HPLC e sequenciados por James Kenny na Protein and Nucleic Acid Facility, Beckman Center, Stanford University, Stanford, CA 94305.

5.29. Reação de PCR.

A reação de PCR foi realizada conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). O primeiro ciclo foi de 94°C por 4 minutos, o segundo de 65°C por 1 minuto, o terceiro de 72°C por 3 minutos, o quarto de 94°C por 1 minuto, o quinto de 65°C por 1 minuto, o sexto de 72°C por 3 minutos, repetiu-se 30 ciclos a partir do ciclo 4 e manteve-se a reação a 4°C.

5.30. Purificação dos fragmentos de PCR por coluna ultra free MC (Millipore).

Realizou-se a purificação de fragmentos de PCR por coluna ultra free MC (Millipore) conforme especificações do fabricante.

5.31. Purificação de fragmentos de PCR por colunas Wizard™ PCR (PROMEGA).

A purificação de fragmentos de PCR por colunas WIZARD™ PCR (PROMEGA) foi realizada conforme especificações do fabricante.

5.32. Reparo de 3' "overhang" do produto de PCR para gerar extremidades "blunt".

Para gerar extremidades "blunt" no fragmento de PCR, foi necessário retirar o nucleotídeo A ("overhang") adicionado pela *Taq polimerase*. Para este fim, realizou-se a digestão deste A pela atividade 3'-5' exonuclease da T4 DNA polimerase, através da seguinte reação: 2μg de DNA, 50mM Tris-Cl pH8,0, 5mM MgCl₂, 5mM DTT, 100μM dNTP mix, 50μg/ml BSA, 10U T4 DNA polimerase.

Esta reação foi incubada por 5 minutos a 0°C e parada adicionando-se 2μl de EDTA 0,5M.

5.33. Southern-blot.

Realizou-se a eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TBE (4.2.13) a 100V, e o mesmo foi corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta curta. Este foi, então, incubado por 25 minutos sob lenta agitação em solução de denaturação (4.2.20), incubado em tampão de neutralização (4.2.19) por mais 25 minutos sob agitação lenta, e, então, incubado por cinco minutos em SSC2X. Após este procedimento, montou-se o sistema de Southern-blot conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989), realizando-se a transferência por 18 horas, sendo, a seguir, o filtro de nitrocelulose incubado a 80°C por 2 horas com vácuo e hibridizado.

5.34. Marcação radioativa de fragmento de DNA por extensão através de "primer" aleatório.

A marcação radioativa com 1α-³²P/dATP de fragmentos de DNA a serem utilizados como sondas moleculares foi realizada através de extensão através de "primer"

aleatório com o "kit Stratagene Blue". Foram aquecidos 100ng (10µls) de DNA (fragmento) por 5 minutos a 100°C em banho maria para denaturar o DNA, este foi colocado em gelo e imediatamente e adicionaram-se 2µls do tampão 10X, 1µl de dGTP, 1µl de dCTP, 1µl de dTTP, 5µl de $1\alpha^{32}\text{P}/\text{dATP}$ e 1µl do fragmento grande da Klenow polimerase. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora, e foi purificada por coluna de sephadex G50 (médio). Antes de adicionar a sonda à solução de hibridização esta foi aquecida por 5 minutos em banho maria a 100°C.

5.35. Hibridização com sondas moleculares marcadas por extensão através de "primer" aleatório.

Os filtros foram colocados para a pré-hibridização na solução de hibridização (4.2.20) por 2 horas a 37°C. A sonda foi incubada em banho maria fervente por 5 minutos a 100°C e adicionada à solução de hibridização para uma contagem final de $3 \times 10^6 \text{cpm}$. O conjunto de filtros e sonda foi incubado a 37°C por 18 horas sob leve agitação. Após este período, os filtros foram lavados com a solução de lavagem 4.2.21 por 1 hora a 65°C sob agitação, e em seguida, lavados rapidamente com SSC 2X, secos ao ar livre e expostos por 18 horas com chapa fotográfica Kodak a -70°C.

5.36. Sequenciamento de DNA.

O sequenciamento de DNA foi realizado conforme descrito por Sanger *et al.* (1977).

Secou-se 5µg de DNA a ser sequenciado numa centrífuga de concentração a vácuo, este foi suspenso em 20µls de solução de denaturação (4.2.25.1) e incubado a 37°C por 5 minutos. Foram adicionados 4,5µls da solução de neutralização (4.2.25.2) e checkou-se o pH (este deve ser entre 4,5-5,5). O DNA foi, então, precipitado com 100µls de etanol 100% em gelo por 5 minutos e centrifugado a 12000g por 15 minutos, foi lavado com etanol 80% e seco a

vácuo. O DNA foi suspenso em 18µls de água destilada e para cada reação de sequenciamento utilizaram-se 9µls deste DNA. Aos 9µls de DNA foram adicionados de 30 a 60ng de "primer" e este foi anelado ao DNA por 5 minutos a 65°C.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit "sequenase 2.0" (U.S.B). A reação de sequenciamento foi a seguinte: 10µls do DNA (molde e "primer"), 1µl de DTT 0,1M, 2µls da Lab Mix diluída de 1:5 ou 1:15, 2µls do tampão de reação, 1µl de S³⁵-dATP e 2µls da enzima sequenase diluída de 1:8. A reação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em tubos eppendorfs distintos adicionaram-se 3,5µls da reação a 2,5µls de cada um dos ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP), estes foram, então, incubados por 10 minutos a 37°C, adicionaram-se 4µls da solução de STOP e o DNA foi denaturado por 2 minutos a 75°C. Realizou-se a eletroforese em gel de sequenciamento 7,2% (4.2.25.3) por 2 e 4 horas sob uma potência de 50 Watts.

5.37. Transformação.

Os experimentos de transformação foram realizados conforme anteriormente descrito por Bullock *et al.* (1987).

5.37.1. Preparo de células competentes.

As amostras de *E. coli* DH5α, HB101 e PAP702 (Tab.1) foram cultivadas a 37°C em 5mls de meio LB até atingirem uma DO₅₅₀ de 0,3. Estes 5 mls de cultura foram inoculados em 100mls de meio LB e incubados a 37°C até atingirem uma DO₅₅₀ de 0,48. A cultura foi mantida no gelo por 15 minutos, centrifugada a 2000rpm por 10 minutos a 4°C (divididos em 4 tubos Falcon de 50ml), os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos suspensos em 10mls de tampão TfbI (4.2.24.1), misturou-se com vortex gentilmente, incubou-se no gelo por 15 minutos, centrifugou-se a 2000rpm por 5 minutos a 4°C, suspendeu-se o sedimento em 1ml (por tubo) de

tampão TfbII (4.2.24.2) com gentil vortex, incubou-se no gelo por 15 minutos, dividiu-se 200µls por tubo eppendorf e congelou-se a -70°C.

5.37.2. Transformação.

Inocularam-se 3µls de DNA a 200µls de células competentes e incubou-se no gelo por 45 minutos, incubou-se por 10 minutos a 42°C, adicionou-se 1ml de meio SOC (4.1.4), incubou-se a 37°C por 1 hora e inoculou-se em meio LA com os antimicrobianos seletivos.

5.38. Mutagênese por inserção

A mutagênese por inserção foi realizada utilizando-se o sistema descrito por Miller e Mekalanos (1988). O fragmento a ser inserido foi clonado no plasmídio pGP704 (Apr, RP4-2, R6K) que é um vetor suicida que possui origem de replicação R6K a qual necessita da proteína π codificada pelo gene *pir* do fago λ para replicação. O plasmídio pGP704 contendo o fragmento a ser inserido foi mobilizado por transformação em *E. coli* SY327 λ pir, a qual possui o fago λ lisogenizado em seu cromossomo e produz a proteína Pir necessária para a replicação do plasmídio pGP704, esta amostra apresenta ótimo crescimento e é utilizada como hospedeira intermediária de pGP704, mas não produz a proteína RP4-2 necessária para a mobilização deste plasmídio. Este plasmídio foi, então, mobilizado por transformação em *E. coli* SM10 λ pir que produz a proteína Pir e também a proteína RP4-2 que permite a mobilização do plasmídio pGP704. *E. coli* SM10 λ pir contendo pGP704 recombinante foi conjugada com a amostra de bactéria a ser mutagenizada, a qual não produz a proteína Pir e não consegue replicar o pGP704. Aplicando-se seleção para o antimicrobiano ampicilina, o plasmídio pGP704 insere-se no cromossomo através de recombinação homóloga entre a sequência inserida nele e o gene alvo no cromossomo da bactéria hospedeira, os conjugantes obtidos, são cultivados, por várias passagens

em meio LB sem antimicrobianos e posteriormente selecionados para a perda do plasmídeo pGP704. Desta forma, ocorrendo uma mutação por inserção que deverá desativar o gene alvo.

5.39. Mutagênese através da inserção do transposon *TnphoA*.

A mutagênese através da inserção do transposon *TnphoA* foi realizada conforme descrito por Taylor *et al.* (1989). O plasmídeo pRT291 (Tc^r, Km^r) (Tab.2) encontra-se na amostra de *E. coli* SM10 (Tab.2), este plasmídeo contém o transposon *TnphoA*, que é um transposon derivado do transposon Tn5 possuindo o gene para a resistência a kanamicina deste transposon e o gene para a fosfatase alcalina. Quando este transposon insere-se em frame num gene que codifica uma proteína exportada ou secretada para a membrana ou o espaço periplasmático da bactéria, o gene da fosfatase alcalina é expresso e na presença do substrato BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) no meio de cultura as colônias expressando este gene tornam-se azuis.

A amostra de *E. coli* SM10 (pRT291) (Km^r, Tet^r) foi conjugada com a amostra e ser mutagenizada (*V.cholerae* 395, que é resistente a Polimixina B), e as conjugantes foram selecionadas em meio LA + Tet + Polimixina B.

As amostras de *V.cholerae* selecionadas acima, as quais contém o plasmídeo pRT291 foram conjugadas com a *E. coli* mm294 (pPH1JI) (Tab.2) (Gen^r). O plasmídeo pPh1JI possui a mesma origem de replicação que o plasmídeo pRT291, sendo ambos incompatíveis. As colônias foram, então, selecionadas para a perda do plasmídeo pRT291, visando a mobilização do transposon *TnphoA* para regiões cromossômicas do *V.cholerae* 395, em meio LA + Kan(100mg/ml) + Gen(30mg/ml) + PolimixinaB + BCIP(200ng/ml) + 20% de glicose. Coletou-se as colônias azuis e estas foram testadas para mutações em *ompU* por western-blots com o antissoro anti-OmpU.

5.40. Triagem de banco genômico em λ ZAP.

O banco genômico de *V.cholerae* 395 em λ ZAP foi doado pelo Dr. James B. Kaper do Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, MD, USA.

A triagem de banco genômico em λ ZAP foi realizada conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). A amostra de *E. coli* XL1-Blue foi cultivada por 18 horas a 300rpm em 50mls de meio LBM (4.1.6) com 0,2% de maltose a 37°C, centrifugada a 4000g por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 15mls de uma solução de MgSO_4 0,01M. Em 4 tubos foram infectados 300 μ l desta suspensão bacteriana com 3×10^6 fagos do banco genômico por tubo e estes foram incubados a 37°C por 20 minutos. Foram adicionados 8ml de top agarose (agarose 0,7% em MgSO_4 0,01M) previamente liquefeita (50°C) a cada tubo e o conteúdo de cada um deles foi derramado sobre placas de LA. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 8 horas, até o aparecimento de placas de lise e deixadas a 4°C durante a noite.

As placas foram cobertas com filtros de Nylon por 1 minuto, estes filtros foram incubados em uma solução de 1,5M NaCl / 0,5M NaOH por 2 minutos, transferidos para uma solução de 1,5M NaCl/ 1mM EDTA/ 0,5M Tris-HCl pH7,4 por 5 minutos, lavados com 2X SSC, secos e queimados a 80°C por duas horas.

Estes filtros foram hibridizados com a sonda do gene alvo conforme descrito nos itens 5.34 e 5.35 e expostos por 72 horas com chapa fotográfica Kodak a -70°C. As placas de lise que hibridizaram com a sonda foram retiradas com uma ponteira de micropipeta cortada e colocadas em tubos eppendorfs com 1ml de solução SM (4.2.29) e uma gota de clorofórmio. Estes fagos foram triados mais duas vezes até que obteve-se placas de lise isoladas que hibridizavam com a sonda.

5.41. Extração de DNA de fagos em larga escala.

A extração de DNA de fagos em larga escala foi realizada conforme descrito em Sanbrook *et al.* (1989). Foram crescidos 100mls da bactéria XL1-Blue por 18 horas a 300rpm a 37°C em meio LBM (4.1.6) com 0,2% de manose. Uma alíquota contendo 10^{10} células bacterianas foi transferida para um tubo falcon e centrifugada a 4000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 3mls de solução SM (4.2.29), a esta suspensão foram adicionadas cerca de 5×10^7 pfu ("plaque forming units") partículas de fagos, esta foi, então, incubada a 37°C por 20 minutos, transferida para 500ml de meio LBM e incubada a 300rpm a 37°C, sendo sua DO_{600} medida a cada 1 hora. A queda da DO_{600} indica o momento da lise. Após a lise, foram adicionados 10mls de clorofórmio à cultura e esta incubada a 37°C a 300rpm por 10 minutos, a cultura foi mantida em gelo por 10 minutos, o sobrenadante transferido para frascos de centrifuga sem arrastar o clorofórmio e centrifugado por 10 minutos a 7000rpm a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e este foi incubado por 30 minutos a 37°C com 50 µl de RNase (10mg/ml) e 500µl de DNase (1mg/ml). Adicionaram-se 29,2g de NaCl ao sobrenadante e este foi mantido em gelo por 1 hora, foi centrifugado a 10000rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para outro frasco ao qual foram adicionados 50g de polietileno glicol (PEG 8.000) e a solução foi mantida a 4°C sob leve agitação durante a noite.

A solução foi centrifugada a 10000rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 8mls de SM, este foi transferido para tubo falcon, onde foram adicionados 8mls de clorofórmio e centrifugado por 10 minutos a 3000rpm a temperatura ambiente. A fase aquosa foi recolhida e a esta foi acrescentado CsCl na concentração de 0,5g/ml de solução. O gradiente recém formado de CsCl foi previamente preparado em tubo (Ultraclear) do rotor SW41 da Beckman adicionando-se 1ml da solução 1 (CsCl em SM com índice de refração de 1,3990) ao fundo do tubo, sobre esta foi adicionado 1,5ml da solução 2 (CsCl em SM com índice de refração de 1,3815), sobre esta adicionaram-se 1,5mls de solução 3 (CsCl em SM com índice de refração de 1,3768). A solução de fagos com CsCl foi adicionada ao

tubo com o gradiente descontínuo de CsCl e este foi centrifugado em um rotor SW41 da Beckman por 22000 rpm por 4 horas a 4°C. As partículas de fago foram retiradas com uma micropipeta de 1ml, retirando-se cuidadosamente parte da solução que recobre a banda das partículas virais e posteriormente com a micropipeta as próprias partículas virais foram retiradas, estas foram dialisadas 2 vezes por 1 hora cada contra 1000 volumes de 50mM Tris-HCl/ 10mM NaCl/ 10mM MgCl₂. Esta amostra dialisada foi transferida para um tubo eppendorf e a esta foram adicionados EDTA para uma concentração final de 20mM, pronase para uma concentração final de 0,5mg/ml e SDS para uma concentração final de 0,5%, esta foi incubada por 1 hora a 37°C, resfriada a temperatura ambiente e extraída com fenol:clorofórmio. A seguir, o DNA do fago foi precipitado com 0,1V de acetato de sódio 3M pH7,0 por 30 minutos a temperatura ambiente, centrifugados a 12000g por 15 minutos a temperatura ambiente, lavados com etanol 70%, secos e o sedimento suspenso em TE ou dH₂O.

6.RESULTADOS:

6.1.Perfil eletroforético das proteínas de membrana externa (OMPs) de diferentes amostras de *V. cholerae* e *E.coli*.

As proteínas de membrana externa das amostras CVD101, 395 ToxR⁻, CVD110, 569B, CVD103-HgR e AI1837 de *V. cholerae* e DH5 α e PAP702 (OmpA⁻) de *E.coli*, cultivadas a 37°C por 18 horas em meio CYE, foram extraídas conforme descrito no item 5.1. Sua concentração padronizada através da eletroforese de diferentes volumes destas OMPs em géis SDS-PAGE. E sua eletroforese foi realizada em gel SDS-PAGE 12,5% (5.3) corado com Coomassie blue (5.4).

Na figura 1a são observadas, entre as OMPs das amostras de *V.cholerae* duas subunidades protéicas de maior expressão em relação as outras OMPs. Estas subunidades possuem de pesos moleculares de 38kDa e 40kDa e foram descritas como OmpU e OmpT respectivamente por Miller e Mekalanos (1988). Nas amostras CVD101, CVD110 e AI1837 a subunidade protéica de 38kDa tem sua expressão ativada e a subunidade de 40kda tem sua expressão reprimida, mas ainda há expressão da amostra de 40kDa. Já nas amostras 395 ToxR⁻, 569B e CVD103-HgR a subunidade protéica de 38kDa tem sua expressão reprimida enquanto que a de 40kDa tem sua expressão ativada, ainda havendo expressão da subunidade de 38kDa. Na amostra CVD103-HgR não foi possível observar a subunidade protéica de 38kDa em gel SDS-PAGE.

Nas OMPs da amostra de *E. coli* DH5 α duas subunidades protéicas de 38kda e 34kDa possuem maior expressão em relação as outras OMPs, na amostra PAP702, que possui uma mutação no gene que codifica a proteína de membrana externa OmpA, a subunidade de 34kDa não pode ser observada, demonstrando que esta subunidade é a proteína OmpA de *E.coli* (Fig. 1a).

Na eletroforese das proteínas de membrana externa da amostra KB207 de *V.cholerae* (El Tor) cultivada a 15°C e 37°C por 18 horas em meio CYE (5.1), em gel SDS-PGE 12,5% (5.3) corado com Coomassie blue (5.4), foi observada a mesma quantidade da subunidade protéica de 38kDa nas OMPs desta amostra crescida em ambas as temperaturas (Fig. 2).

6.2. Especificidade do antissoro anti-OmpU.

O antissoro anti-OmpU em experimentos de ELISA (Fig. 3), para os quais as concentrações de OMPs das amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ foram anteriormente padronizadas, apresentou reatividade com as OMPs das amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ de *V. cholerae*, que produz menor quantidade de OmpU que CVD101. Demonstrando que o antissoro anti-OmpU reconhece, inclusive, quantidades menores de OmpU, como na amostra 395 ToxR⁻ (Fig. 3).

O Western-blot das amostras CVD101, 395 ToxR⁻, CVD110, 569B, CVD103-HgR e AI1837 de *V. cholerae* e DH5 α e PAP702 (OmpA⁻) de *E. coli* (Fig. 1b) foi realizado conforme descrito no item 5.7 contra o antissoro anti-OmpU, diluído de 1:100. O antissoro anti-OmpU foi preparado conforme descrito no item 5.8, excisando-se a subunidade protéica de 38kDa (Fig. 1a) do gel SDS-PAGE das OMPs da amostra CVD101 de *V.cholerae*.

Neste Western-blot (Fig. 1b) houve o somente o reconhecimento de uma subunidade protéica de 38kDa pelo antissoro anti-OmpU nas amostras CVD101, 395 ToxR⁻, CVD110, 569B, e AI1837 de *V.cholerae* e de uma subunidade protéica de 34kDa na amostra DH5 α (Fig. 1b). Esta subunidade protéica de 34Kda não foi reconhecida pelo antissoro anti-OmpU na amostra de *E. coli* PAP702 (OmpA⁻) demonstrando que OmpU de *V.cholerae* e OmpA de *E.coli* possuem epitopos em comum (Tab.1) (Fig. 1b). Na amostra de *V.cholerae* CVD103-HgR houve o reconhecimento de uma subunidade protéica de 38kDa que não era observada em gel SDS-PAGE (Fig. 1a), mostrando que esta subunidade está presente nesta amostra numa quantidade tão pequena que só pode ser detectada por Western-blot. Nesta mesma amostra, CVD103-HgR, também houve o reconhecimento de uma subunidade de protéica de 43kDa que

não é reconhecida nas outras amostras. Esta subunidade de 43kDa é uma forma não processada de OmpU presente na membrana interna, e o seu reconhecimento neste Western-blot é devido a contaminação da fração de OMPs da amostra CVD103-HgR com proteínas da fração de membrana interna (5.1) pois o antissoro anti-OmpU reconhece três formas peptídicas de 56kDa, 43kDa e 38kDa nos extratos de proteína totais (5.2), as formas peptídicas de 43kDa e 38kDa na frações de membranas interna e externa (5.1) e somente a subunidade protéica de 38kDa nas frações de proteína de membrana externa (5.2) de *V.cholerae* (dados não mostrados).

No Western-blot das proteínas de membrana externa (5.1) das amostras 395 de *V.cholerae* e DH5 α de *E. coli* aquecidas a 50°C ou 100°C por 5 minutos em banho maria contra o antissoro anti-OmpU na diluição de 1:100, OmpU de *V.cholerae* tem um peso molecular de 32kDa quando aquecida a 50°C e de 38kDa quando aquecida a 100°C, sendo modificável por temperatura como OmpA de *E. coli* (Reitmeier e Bragg, 1974) (Fig. 4).

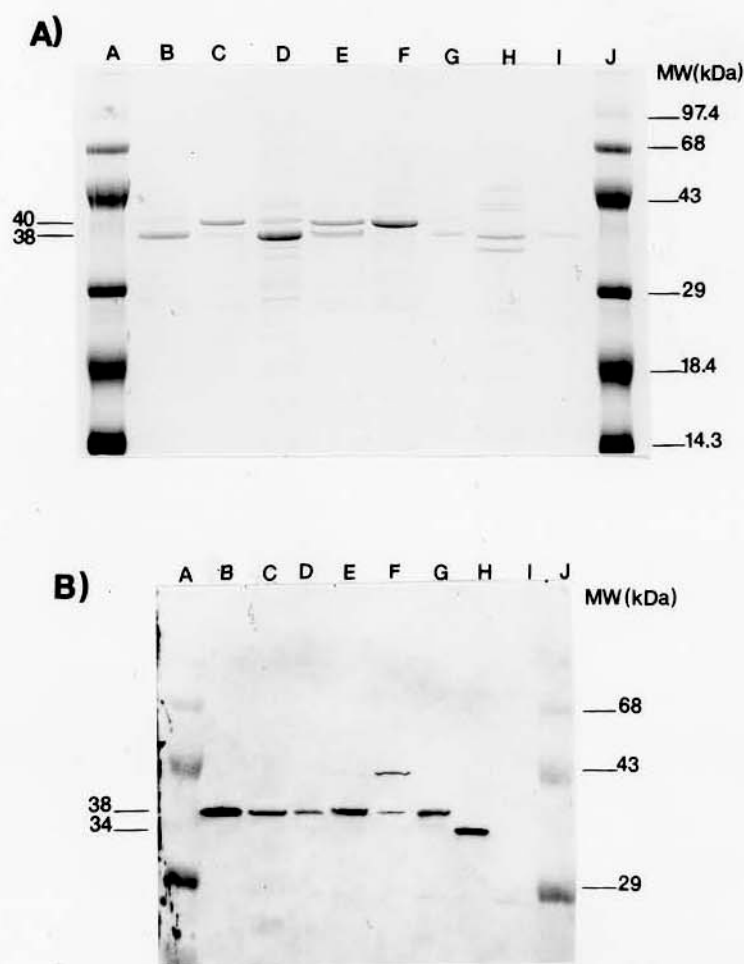


FIGURA 1. A) Perfil eletroforético das proteínas de membrana externa de amostras de *V. cholerae* e *E. coli* em gel SDS-page 12,5% corado com Coomassie blue. B) Western-blot de proteínas de membrana externa de *V. cholerae* e *E. coli* contra o antissoro anti-OmpU:

- a) Padrões de peso molecular pré corados (Gibco BRL)
- b) OMPs de *V. cholerae* CVD101
- c) OMPs de *V. cholerae* 395 ToxR⁻
- d) OMPs de *V. cholerae* CVD110
- e) OMPs de *V. cholerae* 569B
- f) OMPs de *V. cholerae* CVD103-HgR
- g) OMPs de *V. cholerae* AI1837
- h) OMPs de *E. coli* DH5 α
- i) OMPs de *E. coli* PAP702 (OmpA⁻)
- j) Padrões de peso molecular pré corados (Gibco BRL)

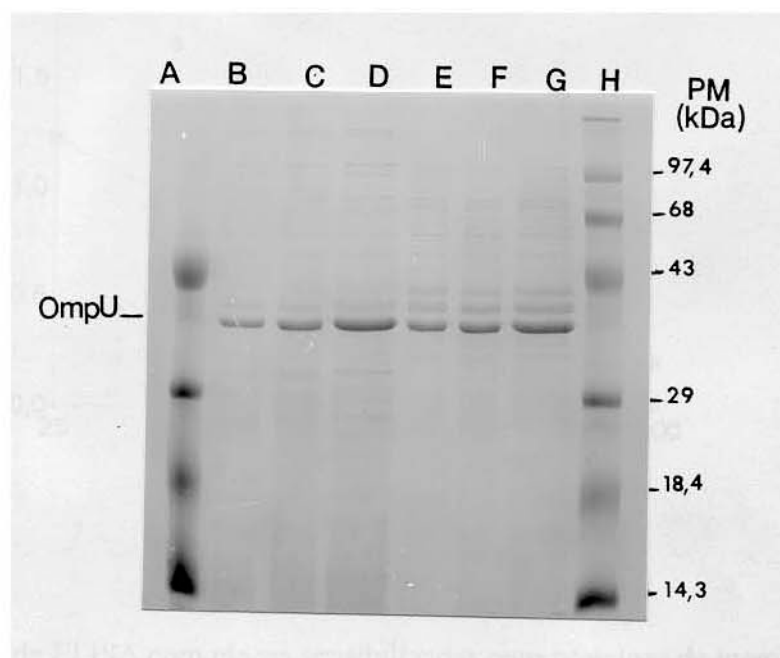


FIGURA 2. Eletroforese das proteínas de membrana externa da amostra de *V. cholerae* KB207 crescida a 15°C e 37°C por 18 horas em meio CYE, em gel SDS-page 12,5% corado com Coomassie blue.

A. Padrões de baixo peso molecular pré corados (Gibco BRL)

B. *V. cholerae* KB207 (15°C)

C. *V. cholerae* KB207 (15°C)

D. *V. cholerae* KB207 (15°C)

E. *V. cholerae* KB207 (37°C)

F. *V. cholerae* KB207 (37°C)

G. *V. cholerae* KB207 (37°C)

H. Padrões de alto peso molecular pré corados (Gibco BRL)

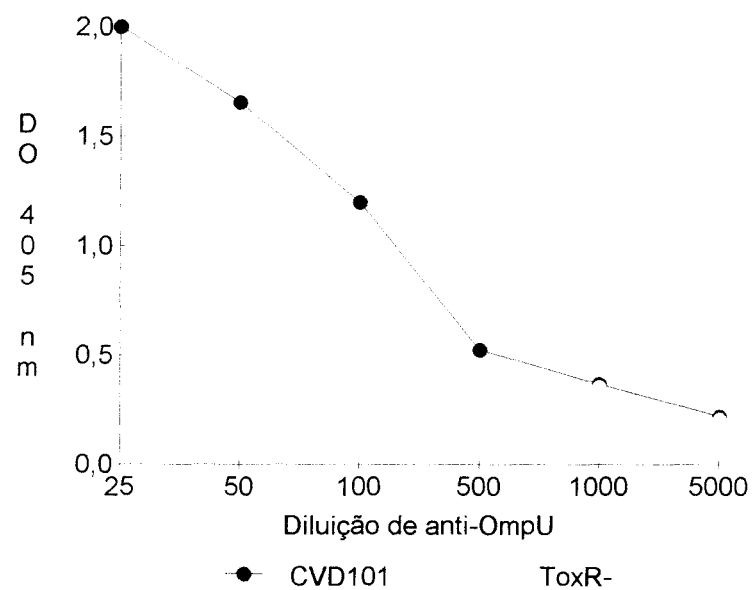


FIGURA 3. Provas de ELISA com placas sensibilizadas com proteínas de membrana externa das amostras de *V. cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻ contra o antissoro anti-OmpU.

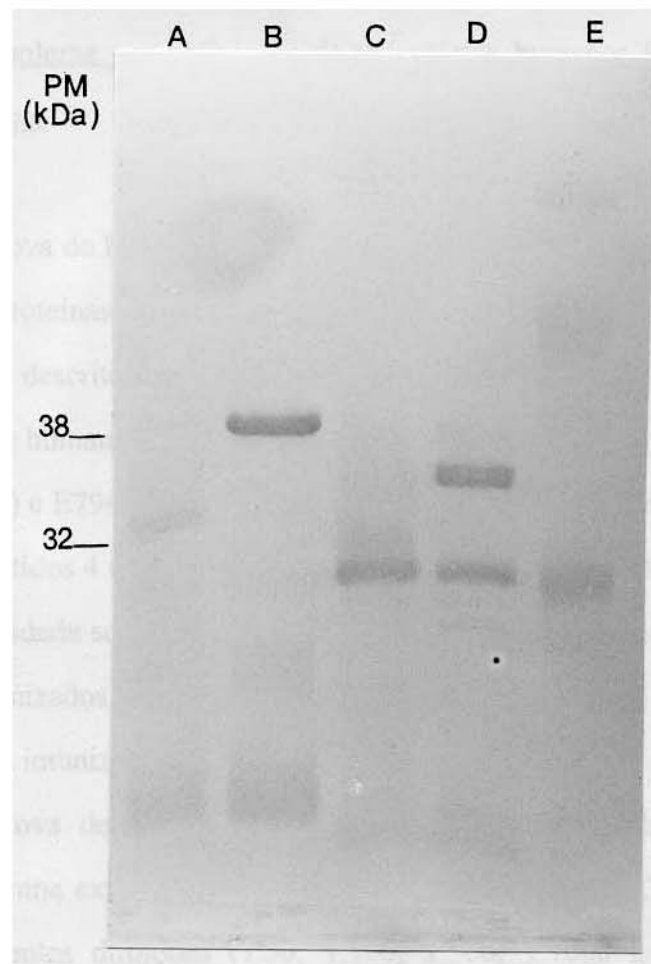


FIGURA 4. Western-blot das proteínas de membrana externa das amostras 395 de *V. cholerae* e DH5 α de *E. coli*, aquecidas em diferentes temperaturas por 5 minutos contra o antissoro anti-OmpU.

a) OMPs *V.cholerae* 395 aquecidas a 50°C

b) OMPs *V. cholerae* 395 aquecidas a 100°C

c) OMPs *E. coli* DH5 α aquecidas a 50°C

d) OMPs *E. coli* DH5 α aquecidas a 100°C

e) Padrões de peso molecular pré corados (Gibco BRL)

6.3. Reconhecimento das proteínas de membrana externa das amostras CVD101 e 395ToxR⁻ de *V. cholerae* por antissoros de voluntários humanos infectados as amostra 395 e E7946 de *V. cholerae*.

A prova de ELISA (Fig. 5) foi realizada com placas sensibilizadas com diferentes concentrações de proteínas de membrana externa (OMPs) da amostra CVD101 de *V. cholerae* extraídas conforme descrito no item 5.1 (diluídas de 1:50; 1:100; 1:1000 e 1:5000) contra os soros de voluntários humanos experimentalmente infectados com as amostras de *V. cholerae* 395 (Levine *et al.*, 1988) e E7946 (Tacket *et al.*, 1993) pré e pós imunização diluídos de 1:100. Estes ELISAS foram repetidos 4 vezes e a média dos resultados deles mostrada na figura 5 demonstrou que há maior reatividade sorológica das OMPs da amostra de *V. cholerae* CVD101 com os soros de voluntários imunizados com as amostras 395 e E7946 do que com os soros dos mesmos voluntários antes da imunização.

A prova de ELISA (Fig. 6) foi realizada com placas sensibilizadas com as proteínas de membrana externa das amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ *V. cholerae* na diluição de 1:100 contra diferentes diluições (1:50; 1:100; 1:500; 1:1000 e 1:5000) dos soros de um voluntário humano experimentalmente infectado com a amostra de *V. cholerae* 395 (Levine *et al.*, 1988) pré e pós imunização. Este ELISAS foram repetidos 4 vezes e a média de seus resultados demonstrou que há maior reatividade sorológica das OMPs das amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ com o soro do voluntários imunizados com a amostra 395 do que com o soro do mesmo voluntário antes da imunização.

O Western-blot da Fig. 7 foi realizado com as OMPs da amostra CVD101 de *V. cholerae* contra os soros de voluntários experimentalmente infectados com as amostras 395 (Levine *et al.*, 1988) e E7946 (Tacket *et al.*, 1993) pré e pós imunização na diluição de 1:100. Neste Western-blot houve o reconhecimento de cerca de 5 subunidades protéicas, sendo a subunidade protéica de 40kDa somente reconhecida pelos soros dos voluntários imunizados com

as amostras 395 e E7946. Ao passo que a subunidade protéica de 38kDa, também foi reconhecida pelos soros dos mesmos voluntários antes da imunização.

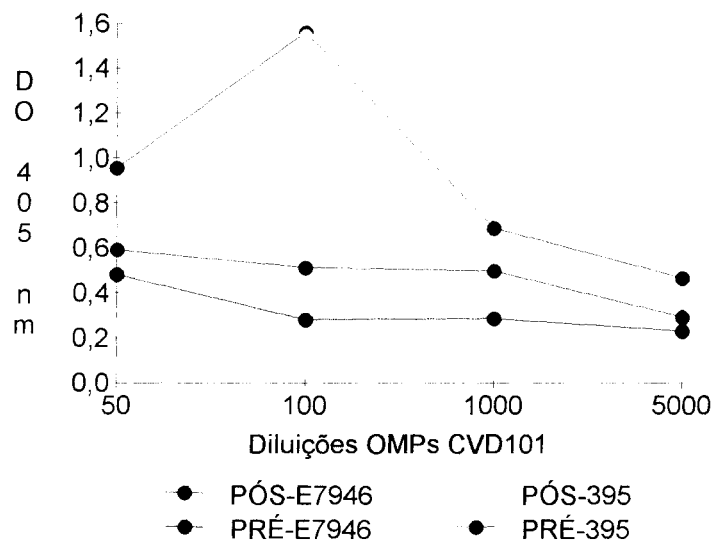


FIGURA 5. Prova de ELISA das placas sensibilizadas com as proteínas de membrana externa da amostra de *V. cholerae* CVD101 em diferentes diluições, contra os soros de voluntários humanos imunizados contra as linhagens de *V. cholerae* 395 e E7946, pré e pós imunização.

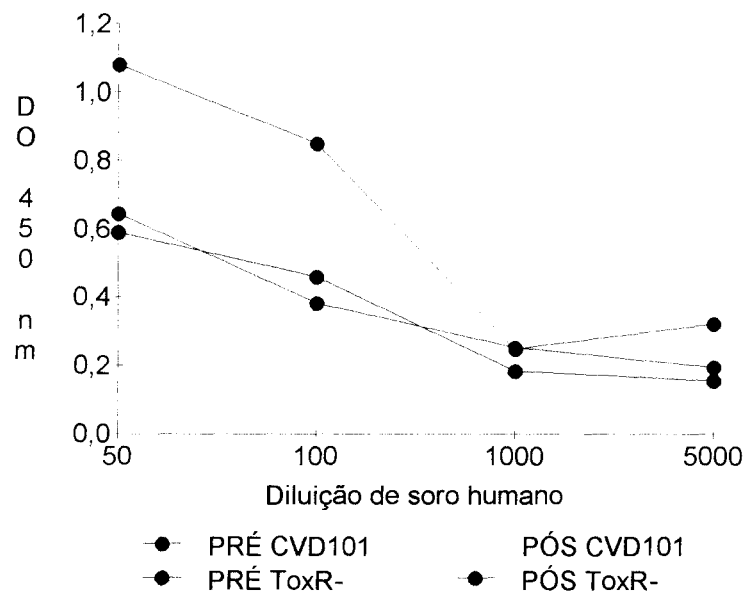


FIGURA 6. Prova de ELISA das placas sensibilizadas com as proteínas de membrana externa das amostras de *V. cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻, contra os soros de um voluntário humano imunizado contra a linhagem de *V. cholerae* 395 , pré e pós imunização.

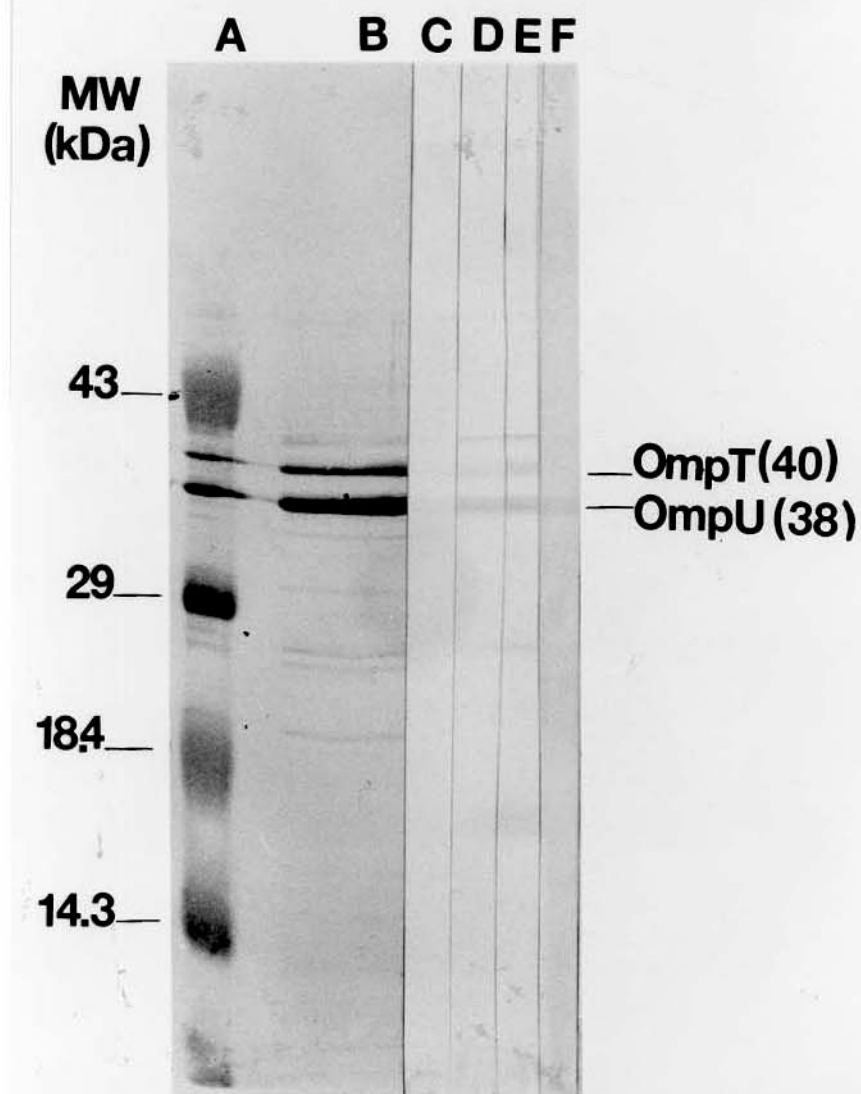


FIGURA 7. Western-blot das proteínas de membrana externa (OMPs) da amostra de *V. cholerae* CVD101 e contra os soros de voluntários humanos imunizados com as linhagens de *V. cholerae* 395 e E7946 , pré e pós imunização.

- A. Padrões de peso molecular pré corados (Gibco BRL)
- B. OMPs de *V. cholerae* CVD101 coradas com amido black
- C. western contra soro de voluntário pré-imunização com *V. cholerae* 395
- D. western contra soro de voluntário pós-imunização com *V. cholerae* 395
- E. western contra soro de voluntário pós-imunização com *V. cholerae* E7946
- F. western contra soro de voluntário pré-imunização com *V. cholerae* E7946

6.4. Análise amino-terminal da proteína de membrana externa OmpU.

A análise amino-terminal de OmpU foi realizada com OmpU purificada das amostras CVD101 (clássica) e CVD110 (El Tor) de *V. cholerae* conforme descrito nos itens 5.5 e 5.6 dos métodos, existindo diferença de apenas um aminoácido entre elas:

Asp, Gly, Ile, Asn, Gln, Ser, Gly, Asp, Lys, Ala, Gly, Ser, Thr, Val, Tyr (El Tor)

Asp, Gln, Ile, Asn, Gln, Ser, Gly, Asp, Lys, Ala, Gly, Ser, Thr, Val, Tyr (clássica)

Esta sequência amino terminal apresenta similaridade com as adesinas HMW1 e HMW2 de *Haemophilus influenza*.

OmpU		TQINQSGDKAGSTVYSAKGT	
		: :	
HMW1	404-	SADSVSKDKSGNIVLSAKEG	-423
HMW2	405-	SADSVSKDKSGNIVLSAKEG	-424

Obs: Onde | significa identidade e : significa similaridade

6.5. Western-blot das OMPs das amostras CVD101 de *V. cholerae*, DH5 α de *E. coli* e E2348 de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) contra o antissoro monoclonal anti-filamento hemaglutinina de *Bordetella pertussis*.

O Western-blot da figura 8 foi realizado, conforme descrito no item 5.7, com as OMPs das amostras de *V. cholerae* CVD101 e de *E. coli* DH5 α , extraídas conforme descrito no item 5.1, e com as proteínas totais da amostra de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) E2348/69, extraídas conforme descrito no item 5.2, contra o antissoro monoclonal X3C produzido contra o filamento hemaglutinina de *Bordetella pertussis* diluído de 1:500. O antissoro monoclonal anti-filamento hemaglutinina de *Bordetella pertussis* reconheceu uma subunidade protéica de 38kDa nas OMPs da amostra CVD101 de *V. cholerae*, uma subunidade protéica de 34kDa nas OMPs da

amostra DH5 α de *E. coli* e duas subunidades protéicas principais de 34kDa e de 66kDa nas proteínas totais da amostra E2348/69 de EPEC além de outras reconhecidas fracamente que podem ser consideradas como "background".

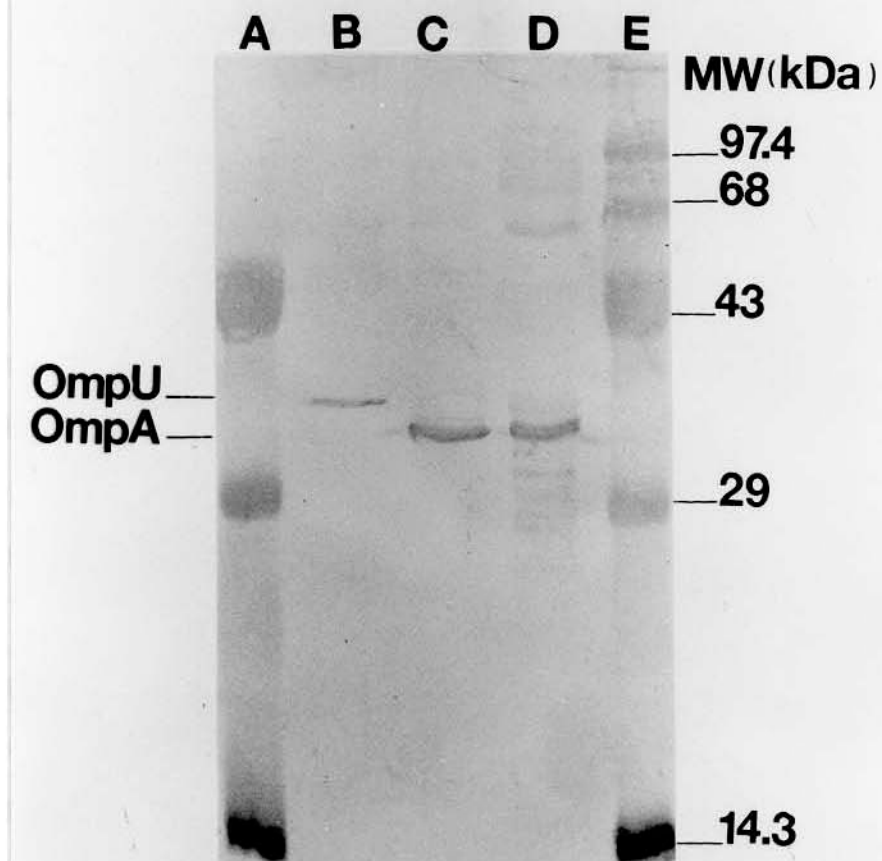


FIGURA 8. Western-blot das proteínas de membrana externa das amostras de *V. cholerae* CVD101 e *E. coli* DH5 α e das proteínas totais da amostra E2348/69 de EPEC contra o antissoro monoclonal X3C anti-filamento-hemaglutinina de *Bordetella pertussis*.

- A. Padrões de baixo peso molecular pré-corados (Gibco BRL)
- B. Proteínas de membrana externa de *V. cholerae* CVD101
- C. Proteínas de membrana externa de *E. coli* DH5 α
- D. Proteínas totais de EPEC E2348/69
- E. Padrões de alto peso molecular pré-corados (Gibco BRL)

6.6. Adesão de OmpU à fibronectina, colágeno, laminina e RGD.

Os testes de adesão à fibronectina, colágeno, laminina e RGD foram realizados conforme descrito no item 5.11 através de ELISAS, nos quais as placas foram sensibilizadas com diferentes diluições de fibronectina, laminina, colágeno ou RGD com as OMPs das amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ de *V. cholerae* e como controle negativo foram utilizadas as OMPs da amostra DH5 α de *E.coli*, nas quais OmpA reage com o antissoro anti-OmpU (Fig. 1). O antissoro anti-OmpU, na diluição de 1:100, foi utilizado para a detecção da ligação de OmpU a estas proteínas de matriz ou ao peptídeo RGD. Estes ELISAS foram repetidos 4 vezes e os resultados apresentados nas figuras 9, 10 e 11 são as médias entre os valores de densidade óptica observados nos 4 ELISAS.

Através destes testes, demonstrou-se que OmpU das amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ de *V.cholerae* adere-se à fibronectina mais fortemente quando esta está numa concentração de 1:2000, sendo esta adesão diminuída quando há maior ou menor concentração de fibronectina (Fig. 9). E ao tripeptídeo RGD (RGD é o tripeptídeo que se liga a proteína integrina celular de eucariotos) até a diluição deste de 1:1000 (Fig. 10).

OmpU da amostraes CVD101 *V.cholerae* adere-se mais fortemente a RGD, depois a fibronectina, e praticamente não se adere à laminina e colágeno (Fig. 11). A adesão de OmpU a fibronectina não foi inibida por RGD e a adesão de OmpU a RGD não foi inibida por fibronectina (dados não mostrados), demonstrando que o receptor de OmpU na fibronectina não é o mesmo que o de RGD, e levando-nos a propor o modelo da figura 12 para a ligação de OmpU a fibronectina e RGD.

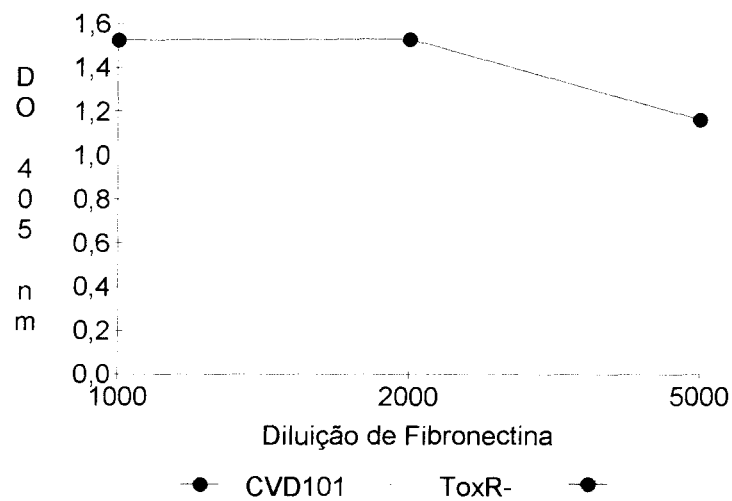


FIGURA 9. Provas de ELISA com placas sensibilizadas com fibronectina da adesão de OmpU das amostras de *V. cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻ à fibronectina.

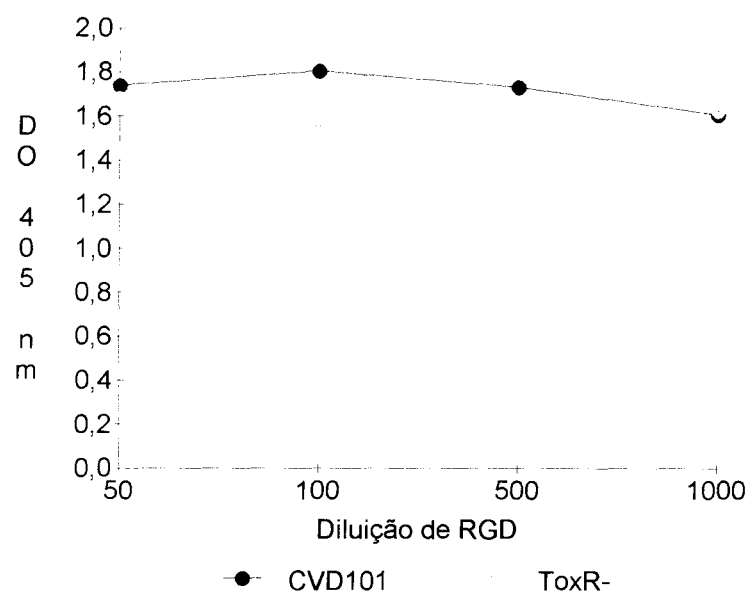


FIGURA 10. Provas de ELISA com placas sensibilizadas com RGD da adesão de OmpU das amostras de *V. cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻ a RGD.

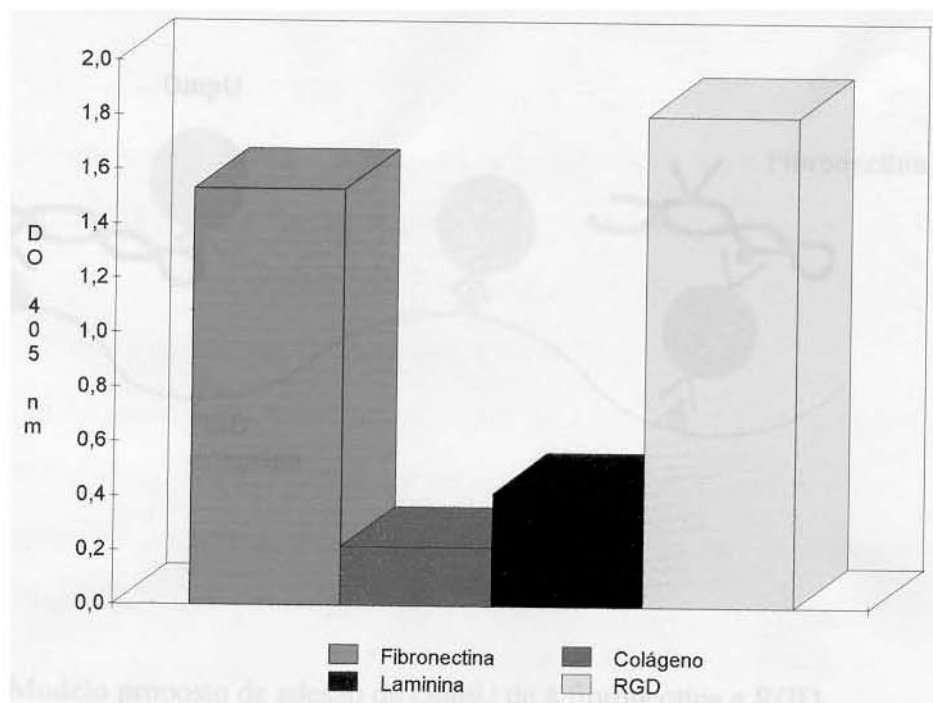


FIGURA 11. Adesão de OmpU da amostra de *V. cholerae* CVD101 a fibronectina, RGD, laminina e colágeno.

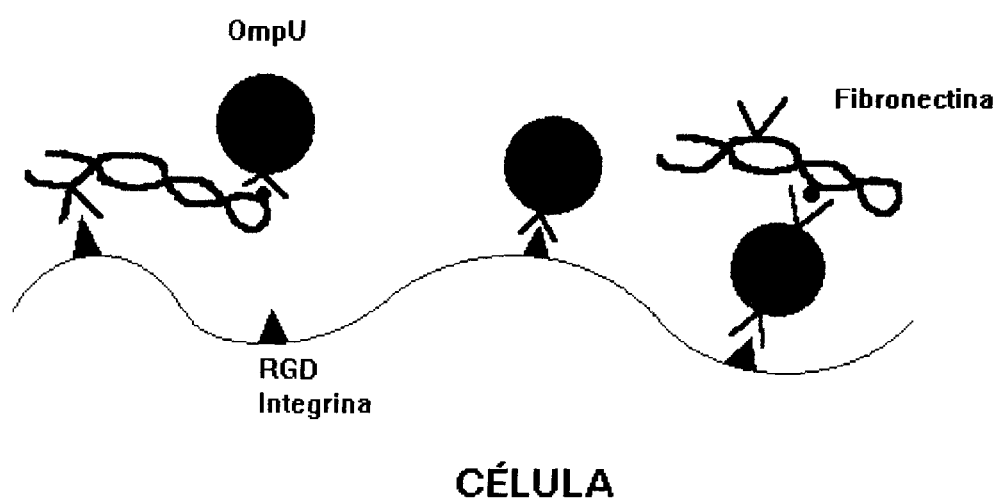


FIGURA 12. Modelo proposto de adesão de OmpU de à fibronectina e RGD.

6.7. Experimentos de adesão e inibição de adesão de amostras de *V. cholerae* a cultura de células epiteliais.

As amostras 395, E7946, TCP2 ($\Delta tcpA$), AI1837 (sorogrupo O139), 6A (mutante sem cápsula da amostra AI1837) e 1E (mutante sem cápsula da amostra AI1837) aderem-se às células HEp-2 a 37°C (Fig 13a e Tab.3). A amostra de *V.cholerae* 569B adere-se a células HEp-2 14 vezes menos que *V.cholerae* CVD101 (395 $\Delta ctxA$) e *V.cholerae* CVD103-HgR adere-se a células HEp-2 28 vezes menos que *V. cholerae* CVD101 (Tab. 4).

O antissoro anti-OmpU nas diluições de 1:10, 1:25 e 1:50 inibe 100% da adesão das amostras 395, E7946, TCP2, 569B, 6A e 1E as células HEp-2 (Fig. 13b e Tab. 3) e não inibe a adesão das amostras AI1837 de *V.cholerae* e E2348/69 de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) (Tab. 3). O antissoro pré-imunização de coelho não inibe a adesão de *V. cholerae* a células HEp-2 (dados não mostrados)

Os fragmentos F(ab)₂ do antissoro anti-OmpU nas concentrações de 8mg/ml, 3,2mg/ml e 1,6mg/ml inibem 100% a adesão das amostras de *V.cholerae* 395, E7946, TCP2, 569B, 6A e 1A as células HEp-2 e não inibe a adesão das amostra AI1837 de *V.cholerae* e 2348/69 de EPEC as células HEp-2 (Tab. 3).

Fibronectina e RGD nas diluições de 1:10, 1:25, 1:50 e 1:100 não inibem a adesão de *V. cholerae* as células HEp-2 (Tab. 3). Bem como o antissoro anti-TcpA (subunidade estrutural de TCP) nas diluições de 1:10 e 1:25 não inibiu a adesão das diferentes amostras de *V.cholerae* às células HEp-2 a 37°C (Tab. 3).

V. cholerae 395 e E7946 também aderem-se à células HeLa, Int-407 e Caco-2 e a aderência a estas células epiteliais é completamente inibida pelo antissoro anti-OmpU nas concentrações de 1:10, 1:25 e 1:50 (dados não mostrados).

Todos estes experimentos foram repetidos pelo menos três vezes para a confirmação dos resultados obtidos.

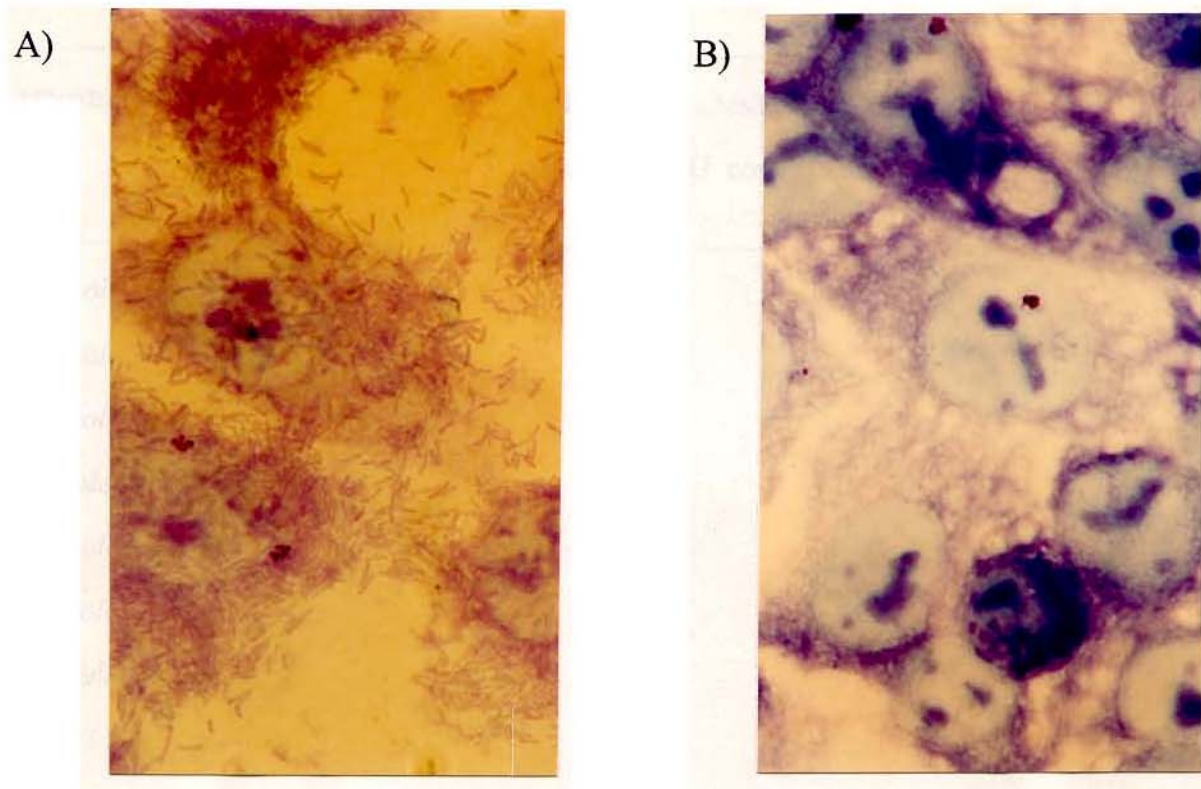


FIGURA 13. A) Adesão de *V. cholerae* 395 a células HEp2.

B) Inibição da adesão de *V. cholerae* 395 a células HEp2 pelo antissoro anti-OmpU.

TABELA 3. Adesão e inibição de adesão de diferentes amostras de *V. cholerae* e *E. coli* a células HEp2.

amostra	adesão HEp2				
		com anti-OmpU	com F(ab) ₂	com anti-TcpA	FN/RGD
<i>V. cholerae</i> 395	+	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i> E7946	+	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i> TCP2 ^a	+	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i> AI1837 ^b	+	+	+	+	+
<i>V. cholerae</i> 1A ^c	+	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i> E6 ^c	+	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i> 569B	+	-	-	+	+
<i>E. coli</i> EPEC 2348/69	+	+	+	+	+

(+)=adere-se a células HEp2; (-)=não adere-se a células HEp2

a) mutantes de deleção para *tcpA*.

b) *V. cholerae* não O1, sorogrupo O139, capsulado

c) mutantes não capsulados de *V. cholerae* AI1837

TABELA 4. Porcentagem de aderência do inóculo total de *V. cholerae* a células HEp2 após incubação por 30 minutos a 37°C.

amostra	porcentagem de adesão a células HEp2
CVD101	15,7%
CVD110	20%
569B	1,1%
CVD103-HgR	0,55%

a) Inóculo total de bactérias: 1×10^7 para 1×10^5 de células HEp2 .

6.8. Experimentos de proteção passiva em camundongos recém-nascidos a *V. cholerae* com antissoro anti-OmpU e fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU.

O antissoro anti-OmpU e os fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU conferem proteção contra *V. cholerae* clássico (395) e El Tor (E7946) em camundongos recém-nascidos (Tab. 5). De quatro camundongos inoculados com *V. cholerae* 395 com soro normal de coelho nenhum sobreviveu; ao passo que de 5 camundongos inoculados com *V. cholerae* 395 com antissoro anti-OmpU, os 5 sobreviveram e de 4 camundongos inoculados com *V. cholerae* 395 com fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU, 3 sobreviveram. De 10 camundongos inoculados com *V. cholerae* E7946 com soro normal de coelho, apenas 3 sobreviveram; de 9 camundongos inoculados com *V. cholerae* E7946 com antissoro anti-OmpU, 5 sobreviveram e de 10 camundongos inoculados com *V. cholerae* E7946 com fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU, 7 sobreviveram (Tab. 5).

TABELA 5. Teste de proteção contra *V. cholerae* em camundongos recém-nascidos com antissoro anti-OmpU e fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU.

linhagens e antissoros	sobreviventes/total ^{a)}
395 (clássica)	
soro normal de coelho	0/4
anti-OmpU F(ab) ₂	3/4
anti-OmpU	5/5
anti-TcpA	3/4
E7946 (El Tor)	
soro normal de coelho	3/10
anti-OmpU F(ab) ₂	7/10
anti-OmpU	5/9

a) número de camundongos recém-nascidos

6.9. Experimentos de inibição de aderência intestinal em camundongos recém-nascidos de *V. cholerae* com antissoro anti-OmpU.

Com a linhagem de *V. cholerae* clássica 395 previamente incubada com antissoro anti-OmpU a colonização intestinal em camundongos recém-nascidos foi 3 vezes menor que com *V. cholerae* 395 previamente incubado com soro normal de coelho (Tab. 6).

Com a linhagem de *V. cholerae* El Tor E7946 houve uma diminuição de 7 vezes na colonização intestinal com antissoro anti-OmpU, em relação a colonização observada com soro normal de coelho.

TABELA 6.Inibição da colonização intestinal em camundongos recém-nascidos por *V. cholerae* com antissoro anti-OmpU.

linhagens e antissoros	nº de cfu ^a recuperado
395 (clássica)	
soro normal de coelho	1,1 X 10 ⁶
anti-OmpU	0,35 X 10 ⁶
anti-TcpA	0,12 X 10 ⁶
E7946 (El Tor)	
soro normal de coelho	0,76 X 10 ⁶
anti-OmpU	0,13 X 10 ⁶

a) cfu= unidades de formação de colônias (cfu inoculado por camundongo foi de 1 X 10⁸)

6.10. Obtenção de peptídeos internos de OmpU.

Os peptídeos internos de OmpU de *V.cholerae* 395 foram obtidos e suas sequências amino terminais foram sequenciadas conforme descrito no item 5.28. Foram obtidos sete peptídeos internos obtidos de OmpU e suas sequências N-terminais são as seguintes:

Pep1-Val,Asp,Tyr,Thr,Gly,Glu,Leu,Ala,Ala,Gly,Tyr,Lys

Pep2-Thr,Tyr,Ala,Gly,Ile,Gly,Gly,Thr,Tyr,Gly,Glu,Val,Thr,Tyr,Gly,Lys

Pep3-Phe,Asn,Leu,Leu,Phe,Ser,Asp,Lys

Pep4-Met,Glu,Asn,Leu,Tyr,Phe,Ala,Gly,Leu,Phe,Thr,Asp,Gly,Glu,Leu,Ala,Phe

Pep5-Ile,Ala,Gly,Glu,Leu,Tyr,Thr,Val,Gly,Phe,Tyr,Ile,Met,Ser,Tyr

Pep6-Asn,Asp,Gly,Ala,Leu,Gly,Val,Ile,Thr,Asp,Phe,Thr,Asp,Ile,Met,Ser,Tyr,His,Gly,
Asn,X,Ala,Ala,Glu

Pep7-Ala,Glu,Ile,Asn,Asp,Phe,Leu,Tyr,Gly,Val,Gly,X,Tyr,Glu,Gly,His,Phe

6.11. Reação de PCR para a obtenção de uma sonda molecular para *ompU*

A reação de PCR foi realizada como descrito no item 5.29 utilizando como DNA molde o DNA genômico de *V.cholerae* 395 e como "primers" os oligonucleotídeos degenerados sintetizados a partir das sequências N-terminal (K227) (5'-GAC(T)GGC(T)ATC(T)AACCAGT (A)CC(T)GGT(C)GAC(T)AAA(G)GC-3') e do peptídeo interno Pep4 (K281) (5'-AACAGA(G) CCA(C,T)GCA(G)AAA(G)TACAGGTTC(T)TCCAT-3') de OmpU (Fig. 14).

A reação foi a seguinte: 55,5µls de dH₂O, 10µls do Tampão 10X, 16µls da mistura de dNTPs (200µM de cada um), 3µls do oligonucleotídeo K281 (Pep4) (400ng), 5µls do oligonucleotídeo K227 (N-terminal) diluído de 1:10 (400ng), 1µl de Taq DNA polimerase, 8µls de MgCl₂ 25mM (2mM) e 1,5µls do DNA molde (200ng).

Através desta reação de PCR foi amplificado um fragmento de cerca de 686pb a partir do DNA genômico de *V.cholerae* 395 (Figs. 14 e 15)

6.12. Clonagem do fragmento de PCR de 686pb em pBluescript e seu sequenciamento.

O fragmento de 686pb de *ompU* amplificado pela reação de PCR descrita no item 6.11 foi purificado conforme descrito no item 5.30, tratado com T4 polimerase para a remoção da base A "overhang" colocada pela Taq polimerase conforme descrito no item 5.32 e clonado no plasmídeo pBluescript digerido com *Sma* I conforme mostrado nas figuras 14 e 16 originando p plasmídeo pVS11 e sequenciado. Na sequência da proteína prevista para este fragmento encontrou-se as sequências N-terminal (6.4) e dos peptídeos 2, 4, 6 e 7 (6.10) de OmpU (Fig. 17).

6.13. Utilização do fragmento de *ompU* (6.11 e 6.12) como sonda molecular.

Este fragmento de PCR (6.11; 6.12; Fig. 15) foi utilizado como sonda molecular e foi hibridizado com o DNA genômico de *V. cholerae* 395 digerido com as seguintes enzimas de restrição: *Pst* I, *Bgl* II, *Cla* I, *Hind* III, *Pvu* II, *Ava* I, *Eco* RI, *Eco* RV, hibridizando com apenas uma banda em todas as digestões, com exceção da digestão com *EcoRV* onde hibridizou com duas bandas (Fig. 18).

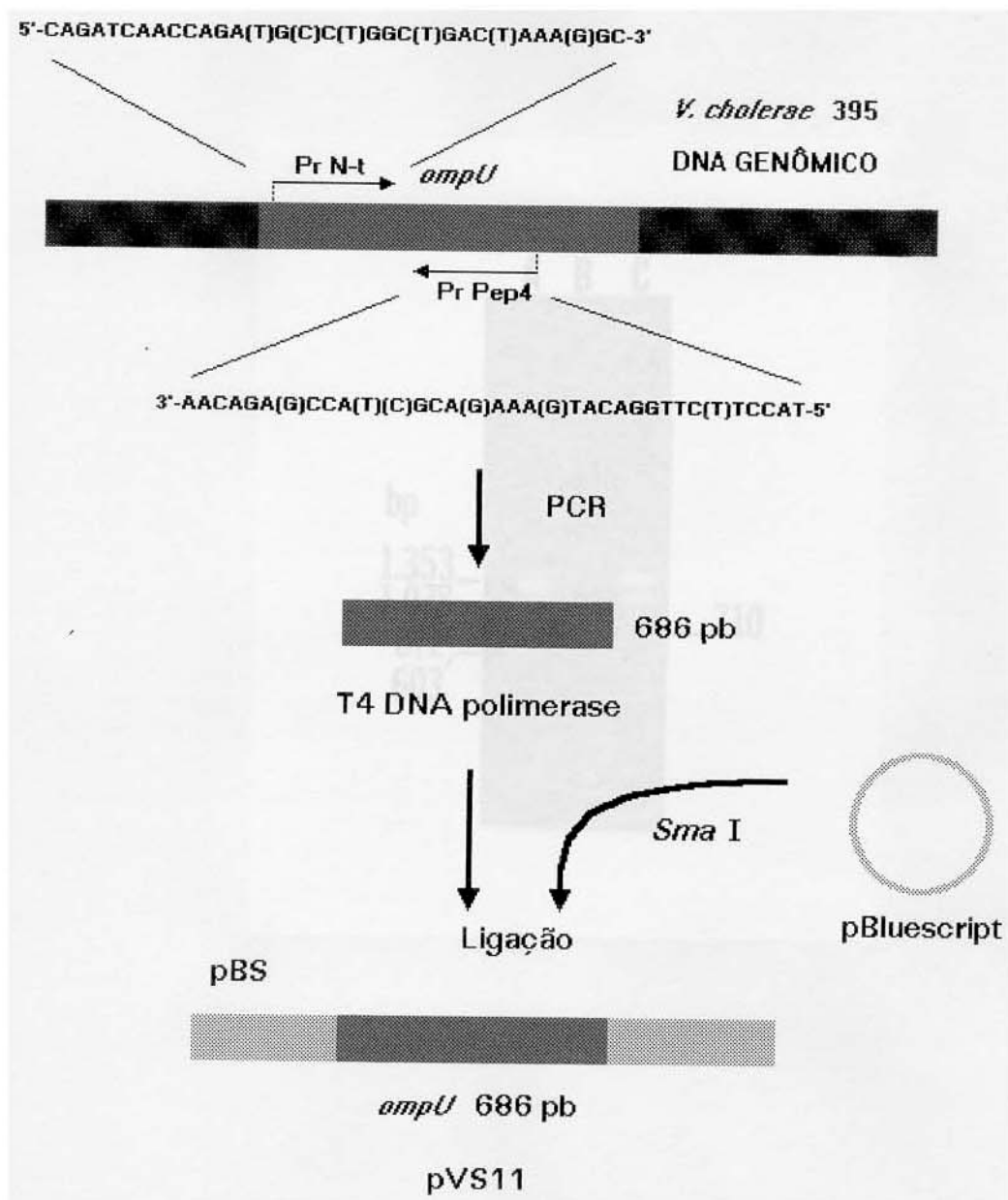


FIGURA 14. Reação de PCR para obtenção da sonda de *ompU* e a clonagem do fragmento amplificado em pBluescript.

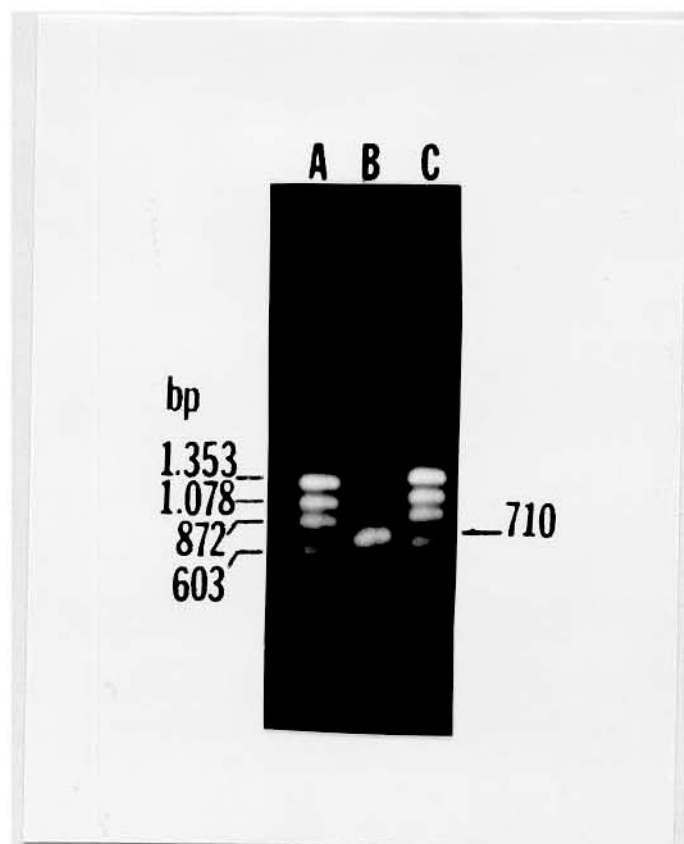


FIGURA 15. Produto da reação de PCR do DNA genômico da amostra de *V. cholerae* 395 utilizando como primers os oligonucleotídios da região N-terminal e pep4 de *ompU*.

A. Padrão de peso molecular; ϕ X174 *Hae* III

B. produto de PCR

C. padrão de peso molecular; ϕ X174 *Hae* III

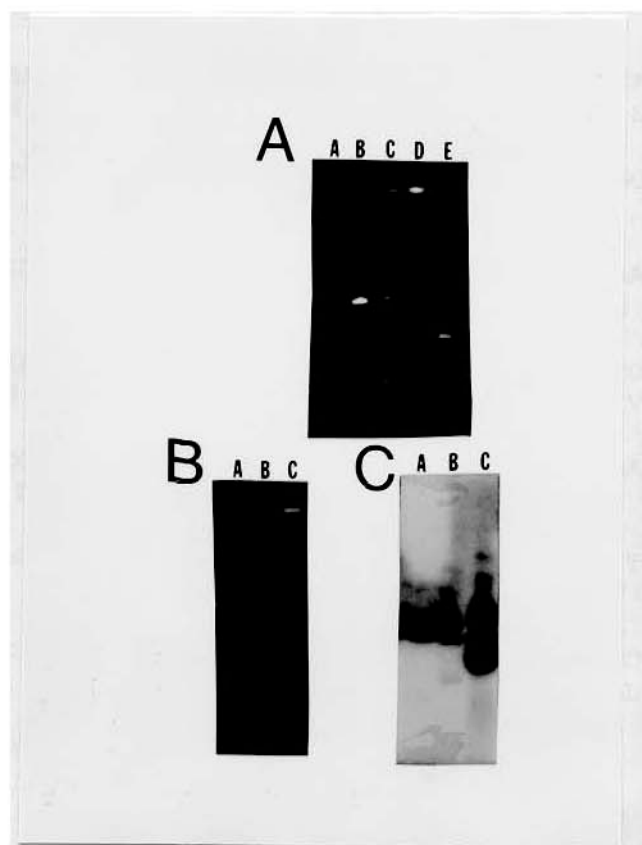


FIGURA 16. A) Gel de agarose 0,7% da ligação do produto de PCR com o plasmídeo pBluescript: a) 1Kb ladder; b) pBluescript; c) ligação produto PCR com pBluescript; d) ligação do produto de PCR com pBluescript; e) Φ X174(*Hae* III)
 B) Gel de agarose 0,7%: a) 1Kb ladder b) plasmídeo pBluescript; c) pVS11 (pBluescript com o produto de PCR inserido)
 C) Southern blot hibridizado com o produto de PCR (N-terminal-pep4): a) 1kb ladder; b) pBluescript; c) pVS11.

1 CAGATCAACCAGAGCGGTGATAAAGCAGGTTCAACCGTTTACAGCGCGAAAGGTACTTCTCTAGA 65
 Q I N Q S G D K A G S T V Y S A K G T S L E
 (sequência N-terminal)
 66 AGTTGGTGGCCGTGATGAAGCTCGCCTATCTCTGAAAGATGGTAAGGCACAAGACAACCTCTCGCG 130
 V G G R D E A R L S L K D G K A Q D N S R V
 131 TACGTCTAAACTTCTTGGGTAAAGCAGAAATCAATGACAGCCTATACGGTGTTGGTTTCTACGAA 195
 R L N F L G K A E I N D S L Y G V G F Y E
 (sequência Pep7)
 196 GGCGAGTTTACTACTAATGATCAAGGTAAAAACGCGTCTAACAACAGCCTAGACAACCGTTATAC 260
 G E F T T N D Q G K N A S N N S L D N R Y T
 261 CTACGCTGGTATCGGTGGCACTTACGGTGAAGTGACTTACGGTAAAAACGATGGCGCATTGGGCG 325
 Y A G I G G T Y G E V T Y G K N D G A L G V
 (Sequências Pep2 e Pep6)
 326 TAATCACTGACTTCACCGATATCATGTCTTACCACGGTAACACAGCCGCAGAAAAAATTGCTGTA 390
 I T D F T D I M S Y H G N T A A E K I A V
 391 GCAGACCGTGTTGACAACATGCTGGCTTACAAAGGCCAATTTGGTGACCTAGGCGTAAAAGCAAG 455
 A D R V D N M L A Y K G Q F G D L G V K A S
 456 CTACCGTTTTTGCTGACCGTAACGCTGTTGACGCAATGGGTAATGTTGTAAGTGAACAAACGCTG 520
 Y R F A D R N A V D A M G N V V T E T N A A
 521 CCAAGTACTCTGACAACGGTGAAGATGGTTACTCTCTGTCTGCTATCTACACTTTTCGGTGACACT 585
 K Y S D N G E D G Y S L S A I Y T F G D T
 586 GGCTTTAACGTAGGTGCTGCGTACGCAGATCAAGACGATCAAAACGAATACATGCTAGCCGCTTC 650
 G F N V G A A Y A D Q D D Q N E Y M L A A S
 651 TTACCGCATGGAGAACCTGTATTTTCGCGGGTCTGTT 686
 Y R M E N L Y F A G L
 (sequência Pep4)

FIGURA 17: Sequência de DNA de parte do gene *ompU* amplificado pela reação de PCR (item 5.29) e clonado em pBluescript. Os resíduos de aminoácidos em cor de rosa são derivados das sequências N-terminais de peptídeos internos de OmpU (5.28).

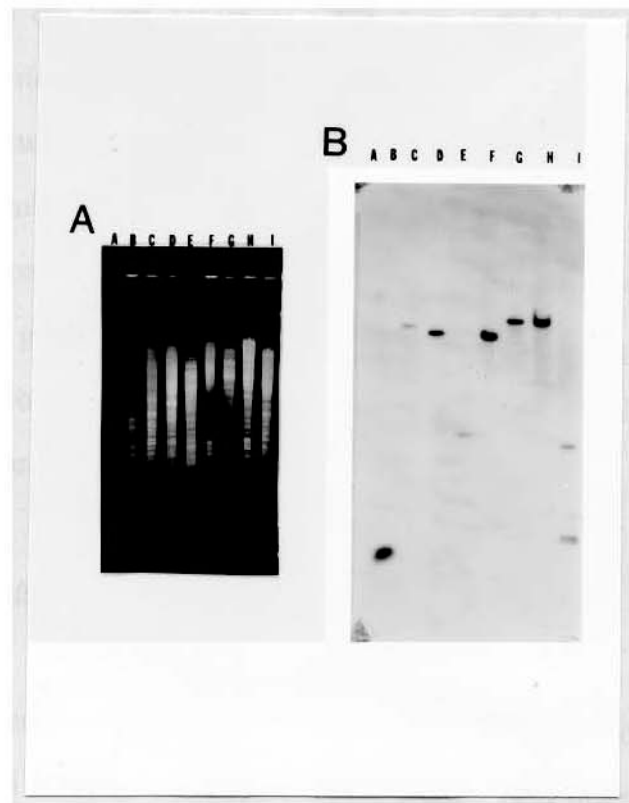


FIGURA 18. A)Gel de agarose do DNA genômico de *V. cholerae* 395 digerido com diferentes enzimas de restrição.
 B)Southern-blot do DNA genômico de *V. cholerae* 395 digerido com diferentes enzimas de restrição hibridizado com a sonda de PCR (N-terminal e pep4 de *ompU*:
 a)padrão de peso molecular, 1kb ladder; b)*Pst* I; c)*Bgl* II; d)*Cla* I; e)*Hind* III; f)*Pvu* II; g)*Ava* I; h)*Eco* RI; i)*Eco* RV.

6.14. Triagem do banco genômico de *V. cholerae* 395 em λ ZAPII com a sonda de *ompU*.

O banco genômico de *V. cholerae* 395 em λ ZAPII foi hibridizado com a sonda *ompU* (6.11) conforme descrito no item 5.40. E somente uma placa de lise hibridizou com *ompU*. Foi realizada a extração em larga escala do DNA fago que hibridizou com a sonda *ompU* (pVS12) conforme descrito no item 5.41, este DNA foi digerido com diferentes enzimas de restrição, foi realizada a sua eletroforese em gel de agarose, o DNA foi transferido por Southern-blot (5.33) para uma membrana de nitrocelulose e esta foi hibridizada com a sonda *ompU*. As hibridizações (Fig.19) mostraram um padrão de bandas semelhantes ao padrão encontrado na hibridização com o DNA genômico de *V. cholerae* 395 com *ompU* (Fig. 18), quando ambos os DNAs (pVS12 e genômico) foram digeridos com as enzimas *Hind* III, *Eco* RV e *Pst* I, embora tenha ocorrido digestão parcial de pVS12 com estas enzimas (Figs. 19).

6.15. Mutagênese com o transposon *TnphoA*.

A mutagênese de *V.cholerae* 395 por inserção do transposon *TnphoA* foi realizada conforme descrito no item 5.39. Foram obtidos 160 mutantes com inserções do transposon em locais diferentes de seu genoma (Observações realizadas através de Southern-blots do DNA genômico total digerido com *Hind* III e hibridizado com o gene que codifica resistência a kanamicina do *TnphoA*) e as proteínas totais destes foram testados por Western-blots contra o antissoro anti-OmpU e nenhum dos mutantes apresentou qualquer alteração na expressão de OmpU.

6.16. Mutação de *ompU* por inserção

A mutagênese de *ompU* por inserção foi realizada conforme descrito no item 5.38. O plasmídio pVS11 foi digerido com *Bam* HI e *Eco* RI e o fragmento de 686pb (fragmento de *ompU* foi purificado conforme descrito no item 5.30, digerido com *Eco*RV que digere no meio deste fragmento (Fig. 18) e clonado no plasmídio pGP704 digerido com *Bgl*III e *Eco* RV. Não se obteve sucesso, pois, após cinco repetições, não foi possível a recuperação de nenhuma colônia após a conjugação entre *E. coli* SM10λpir contendo pGP704 com o fragmento *Eco* RV-*Bam* HI de pVS11 e *V. cholerae* 395 Smr.

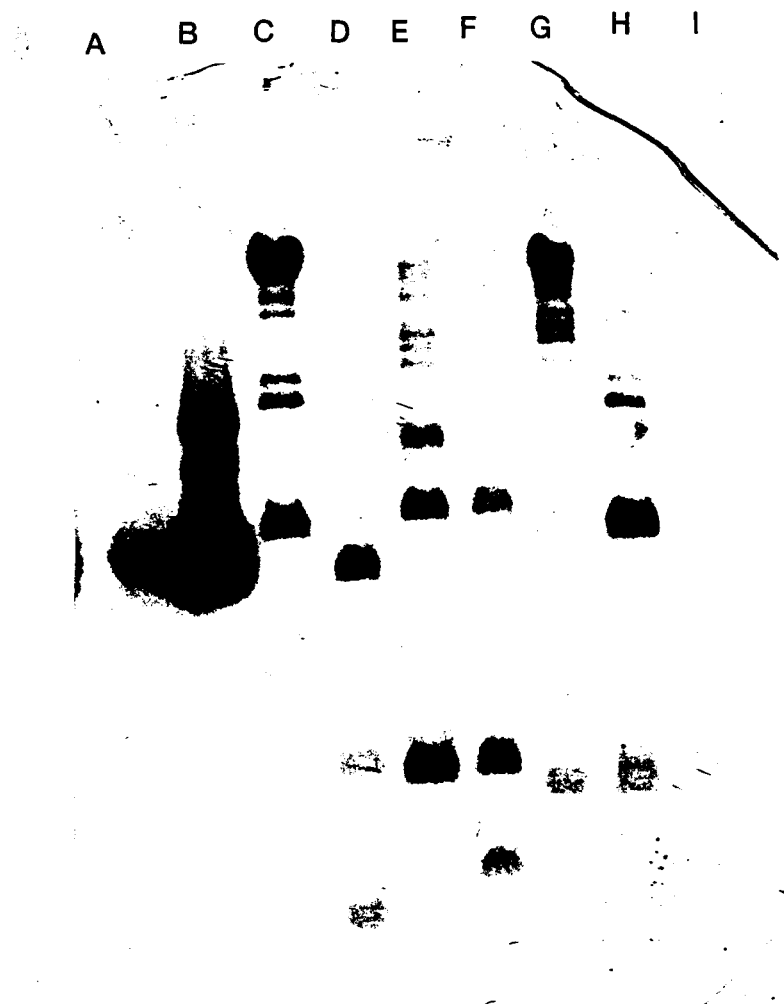


FIGURA 19. Southern blot de pVS12 digerido com diferentes enzimas de restrição hibridizado com a sonda *ompU*.

- A. Padrão de peso molecular λ *Hind* III
- B. pVS11
- C. pVS12 digerido com *Hind* III
- D. pVS12 digerido com *Hind* III e *Eco* RV
- E. pVS12 digerido com *Eco* RV
- F. pVS12 digerido com *Eco* RV e *Pst*I
- G. pVS12 digerido com *Pst* I
- H. pVS12 digerido com *Pst* I e *Hind* III
- I. Padrão de peso molecular λ *Hind* III

7.DISSCUSSÃO:

A doença cólera caracteriza-se por causar diarreia aquosa intensa que pode ocasionar a morte do hospedeiro em 4 ou 6 horas. A cólera ainda é um problema nos países do terceiro mundo onde não há saneamento básico, sendo que uma epidemia está em andamento na América do Sul (Lyke e Holmgren, 1989). A cólera é causada pela bactéria Gram-negativa *Vibrio cholerae*.

Este trabalho foi realizado com as amostras 395 e 569B (clássica), AI1837 (sorogrupo O139) e E7946 (El Tor) de *V. cholerae*, bem como com as mostras derivadas destas: CVD101 (395 $\Delta ctxA$), CVD110 (E7946 $\Delta ctxA$), CVD103-HgR (569B $\Delta ctxA$) e 395 ToxR⁻. Todas as amostras foram fornecidas pelo Prof. Dr. James B. Kaper do Center for Vaccine Development, da Universidade de Maryland.

O perfil eletroforético das proteínas de membrana externa (OMPs) das amostras CVD101, 395 ToxR⁻, CVD110, 569B, CVD103-HgR e AI1837 de *V. cholerae* crescidas a 37°C por 18 horas em meio CYE em gel SDS-page 12,5% corado com Coomassie blue, demonstrou a presença de duas subunidades protéicas de maior expressão em relação às outras OMPs (Fig. 1a). Estas subunidades possuem pesos moleculares de 38kDa e 40kDa (Figs. 1a) respectivamente e foram descritas por Miller e Mekalanos (1988) como sendo as proteínas de membrana externa OmpU (38kDa) e OmpT (40kDa).

O regulon de ToxR contém vários dos genes associados com a virulência de *V. cholerae* (Miller e Mekalanos, 1984; Miller *et al.*, 1987; Peterson e Mekalanos, 1988; Taylor *et al.*, 1987) como o operon *ctxAB* da toxina colérica, o pilus TCP (Taylor *et al.*, 1987) e o operon *acf* que provavelmente codifica um fator de colonização acessório (Peterson e Mekalanos, 1988).

Nas amostras CVD101, CVD110 e AI1837 OmpU tem sua expressão aumentada, enquanto que OmpT tem sua expressão diminuída (Fig. 1a). Já na amostra 395 ToxR⁻, OmpU tem sua expressão diminuída e OmpT tem sua expressão aumentada (Fig. 1a), confirmando,

assim, os resultados previamente obtidos por Miller e Mekalanos (1988) de que OmpU tem sua expressão ativada e OmpT tem sua expressão reprimida por ToxR. Entretanto, conforme demonstram as figuras 1a e 1b, OmpU continua a ter uma expressão basal no mutante 395 ToxR⁻. O fato de OmpU ser ativada por ToxR, torna-a interessante, pois o regulon ToxR está envolvido na regulação de vários genes de virulência de *V.cholerae* (Miller e Mekalanos, 1984; Miller *et al.*, 1987; Peterson e Mekalanos, 1988; Taylor *et al.*, 1987).

OmpU tem sua expressão diminuída nas amostras 569B (Fig. 1a) (Peterson e Mekalanos, 1988) e CVD103-HgR (569B Δ ctxA), sendo a expressão de OmpU nesta última, diminuída em relação a sua expressão na amostra 569B, sendo apenas detectável através de Western-blots com o antissoro anti-OmpU (Fig. 1). A amostra 569B apresenta uma deleção no gene que codifica ToxS (Miller e Mekalanos, 1985, Miller *et al.*, 1989) que é uma proteína transmembrânica responsável pela formação de dímeros de ToxR, tornando-o ativo (DiRita, 1992). Esta mutação em ToxS influencia na expressão de OmpU da amostra 569B, uma vez que ToxR nesta amostra não está sendo devidamente ativado. No caso da amostra CVD103-HgR, nos experimentos de inserção do gene que confere resistência ao mercúrio no gene da hemolisina, foram realizadas diversas passagens com plasmídios de incompatibilidade, o que ocasionou, de alguma forma, uma outra mutação que, por sua vez, afetou a expressão de OmpU.

A eletroforese das proteínas de membrana externa da amostra KB207 (El Tor) de *V. cholerae* crescida a 15°C e 37°C em meio CYE em gel SDS-page 12,5% corado com Coomassie blue, demonstrou a presença de OmpU, sendo esta igualmente expressa em ambas as temperaturas (Fig. 2). Este resultado indica que OmpU é expressa por ambos os biotipos de *V.cholerae* (clássico e El Tor), e que sua expressão não é regulada por temperatura. Miller e Mekalanos (1988) observaram que a adição de aminoácidos ao meio e modificação da osmolaridade causavam alterações na expressão de OmpU e OmpT, ao passo que modificações no pH do meio e na temperatura não causavam nenhum efeito na expressão destas proteínas.

O antissoro anti-OmpU demonstrou ser específico para OmpU e sensível a pequenas quantidades desta proteína em experimentos de Western-blot (Fig. 1b) e ELISAS (Fig.

3). O antissoro anti-OmpU reconheceu OmpU em ELISAS nas amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ (fig. 3) em um título quase idêntico, demonstrando que este antissoro consegue reconhecer OmpU mesmo quando esta proteína é expressa em pequena quantidade. Nos experimentos de Western-blot (Fig. 1) este antissoro reconheceu apenas a subunidade de 38kDa, descrita como sendo OmpU por Miller e Mekalanos (1988), nas amostras de *V. cholerae* CVD101, 395 ToxR⁻, CVD110, 569B e AI 1837. Na amostra CVD103-HgR houve o reconhecimento da subunidade de 38 kDa (OmpU) e de uma outra subunidade protéica de 43 kDa que não é reconhecida nas outras amostras. Esta subunidade de 43kDa é uma forma não processada de OmpU presente na membrana interna e seu reconhecimento neste Western-blot (Fig. 1b) é devido a contaminação da fração de OMPs da amostra CVD103-HgR com proteínas da fração de membrana externa (item 6.2). Este antissoro (anti-OmpU), reconheceu, entretanto, uma subunidade protéica de 34kDa (Fig. 1b) nas OMPs da amostra de *E. coli* DH5 α , indicando que OmpU possui epítomos em comum com esta Omp de 34kDa de *E. coli*. A amostra de *E. coli* PAP702 possui uma mutação no gene estrutural da proteína de membrana externa OmpA, não produzindo esta proteína (Manning *et al.*, 1977) e as OMPs desta amostra não são reconhecidas pelo antissoro anti-OmpU (Fig. 1b), indicando que a proteína de 34kDa de *E. coli* reconhecida pelo antissoro anti-OmpU é OmpA. OmpA está envolvida no transporte de aminoácidos, e os mutantes OmpA⁻, são defectivos para crescimento (Manning *et al.*, 1977).

A proteína OmpU assim como OmpA é modificável por temperatura, característica, esta, estabelecida para OmpA (Reitmeier e Bragg, 1974), tendo um peso molecular de 32kDa quando aquecida a 50°C e 38kDa a 100°C por 5 minutos (Fig. 4), sugerindo que OmpU pode ser uma proteína tipo-OmpA.

Através das provas de ELISA com placas sensibilizadas com OMPs da amostra de *V.cholerae* CVD101 (Fig. 5) e das amostras CVD101 e 395 ToxR⁻ (Fig. 6) contra soros de voluntários humanos experimentalmente infectados com as amostras de *V.cholerae* 395 (Levine *et al.*, 1988) e E7946 (Tacket *et al.*, 1993) pré e pós imunização, demonstrou-se que as OMPs destas amostras apresentam maior reatividade sorológica com soros de voluntários imunizados

contra cólera do que com os soros dos mesmos antes da imunização. O reconhecimento de OMPs de *V. cholerae* por antissoros de voluntários humanos havia sido inicialmente observado por Richardson *et al.* (1989). Indicando que as OMPs de *V. cholerae* são imunogênicas. O Western-blot da figura 7 realizado com OMPs da amostra CVD101 contra soros de voluntários humanos experimentalmente infectados com *V. cholerae* 395 (Levine *et al.*, 1988) e E7946 (Tacket *et al.*, 1993) pré e pós imunização, demonstrou que 5 OMPs de CVD101 São reconhecidas pelos soros dos voluntários imunizados contra cólera, e entre estas OMPs está a subunidade de 38kDa referente a OmpU. OmpU, entretanto, foi reconhecida também, embora mais fracamente, pelos soros dos mesmos voluntários antes da imunização, o que pode vir a ser explicado pelo fato de OmpU possuir epítomos em comum com OmpA de *E. coli* (Fig. 1), que é uma bactéria presente na flora normal do intestino humano.

A análise amino-terminal (item 6.4) de OmpU das amostras CVD101 (clássica) e CVD110 (El Tor) de *V. cholerae* demonstrou que as proteínas de ambas as amostras possuem sequências amino-terminais semelhantes, diferenciando-se apenas no segundo aminoácido desta, sendo este glicina no biotipo El Tor e glutamina no biotipo clássico. Essa sequência amino-terminal de OmpU possui similaridade com as adesinas HMW1 e HMW2 de *Haemophilus influenzae* (Barenkamp e Leininger, 1992) (6.4) e essas adesinas de *Haemophilus influenzae*, por sua vez, possuem similaridade com o filamento hemaglutinina (FHA) de *Bordetella pertussis*, sendo reconhecidas pelo antissoro monoclonal (X3C) deste (Barenkamp e Leininger, 1992). Através de experimentos de Western-blot (Fig. 8) demonstrou-se que OmpU é reconhecida pelo antissoro monoclonal (X3C) do filamento hemaglutinina de *Bordetella pertussis*, demonstrando que OmpU e Filamento hemaglutinina possuem epítomos em comum.

Como adesinas de vários microorganismos têm como receptores as proteínas da matriz celular (Patti *et al.*, 1994). Estudou-se a capacidade de OmpU em aderir-se a proteínas da matriz celular demonstrando-se que OmpU das amostras de *V. cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻ adere-se à fibronectina (Fig. 9). A adesão à fibronectina foi pronunciada quando a diluição desta foi de 1:2000, a queda da adesão quando a concentração de fibronectina era superior pode ser

explicada pelo fato do excesso de fibronectina diminuir a exposição dos possíveis receptores de OmpU. As proteínas OmpU das amostras de *V. cholerae* CVD101 e 395 ToxR⁻ adere-se fortemente ao RGD (Fig. 10), RGD é um tripeptídeo (arginina, glicina e ácido aspártico) encontrado em adesinas de vários microorganismos que reconhecem a proteína integrina (Patti *et al.*, 1994). A proteína OmpU da amostra CVD101 não se adere à laminina e colágeno (Fig. 11). O tripeptídeo RGD não inibe a adesão de OmpU a fibronectina e fibronectina não inibe a adesão de OmpU a RGD, e uma vez que RGD se liga a fibronectina (Patti *et al.*, 1994), estes resultados indicam que OmpU se adere à fibronectina através de um receptor diferente do de RGD. Baseados nestes resultados, esquematizou-se um modelo (Fig. 12) de adesão de OmpU a fibronectina e RGD. O fato de OmpU possuir capacidade de adesão a proteínas de matriz celular e ao tripeptídeo RGD é uma indicação de que OmpU possui capacidade de aderência e pode, provavelmente, funcionar como uma adesina de *V. cholerae*.

Os experimentos de adesão a células HeLa, HEp-2, Int-407 (intestinais) e Caco-2 demonstraram que as amostras 395 e E7946 de *V. cholerae* aderem-se a estas células (dados não mostrados) e baseados neste fato, padronizamos os experimentos com células HEp-2.

As linhagens de *V. cholerae* 395, E7946, TCP2, AI1837, 1A e E6 aderem-se a células HEp-2 (Fig. 13; Tab. 3). Sendo a amostra TCP2 (395 *tcpA*⁻) mutante para o gene que codifica a proteína estrutural do fator de colonização TCP de *V. cholerae* e esta continua a aderir-se a células HEp-2 a 37°C (Tab. 3). A amostra 569B apresenta diminuição de sua adesão a células HEp-2 em relação à amostra CVD101 de cerca de 14 vezes e a amostra CVD103-HgR tem sua adesão diminuída cerca de 28 vezes em relação à amostra CVD101 (Tab. 4). A amostra 569B tem a expressão de OmpU diminuída (Fig. 1a) (Miller e Mekalanos, 1988) e CVD103-HgR (569B Δ *ctxA*) expressa ainda menos OmpU que a amostra 569B, sendo que OmpU só pode ser detectada nesta amostra através de Western-blots contra o antissoro anti-OmpU (Fig. 1a). A amostra 569B demonstrou não ser tão eficiente na colonização do intestino humano quanto as linhagens 395 e E7946 de *V. cholerae* (Levine *et al.*, 1988) e a amostra CVD103-HgR é muito pouco eficiente na colonização do intestino humano, sendo sua colonização 10 vezes menor que

a de 569B (Ketley *et al.*, 1993). Estas são indicações indiretas de um possível envolvimento de OmpU na colonização intestinal por *V.cholerae*.

Realizou-se, então, o teste de inibição de adesão das amostras de *V.cholerae* 395, E7946 a células HeLa, HEp-2, Int-407 e Caco-2 com o antissoro anti-OmpU e demonstrou-se que o antissoro anti-OmpU inibe 100% a adesão dessas amostras a estas células (dados não mostrados). Como este resultado foi o mesmo com todas as linhagens de células, padronizou-se estes experimentos com células HEp-2.

Verificou-se que as linhagens de *V. cholerae* 395, E7946, TCP2, 569B, 1A e E6 tiveram sua adesão a células HEp-2 inibida 100% pelo antissoro anti-OmpU (Tab. 3). A amostra de *V. cholerae* AI1837 (sorogrupo O139) foi a única amostra de *V.cholerae* a não ter sua adesão inibida pelo antissoro anti-OmpU. Esta amostra, porém, é a responsável por uma nova epidemia de cólera em Bangladesh e apresenta características diversas das amostras de cólera patogênicas até hoje estudadas, pois ela pertence a um novo sorogrupo O139 e nas sete pandemias já registradas, apenas amostras do sorogrupo O1 de *V.cholerae* foram encontradas, sendo que este sorogrupo possui uma cápsula de lipopolissacarídeos (Ramamurthy *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1993). A adesão e a colonização de amostras do sorogrupo O139 parece realizar-se, também, por aglutinação entre as bactérias (Yamamoto *et al.*, 1994) mediada pela própria cápsula. A presença desta cápsula também pode impedir o reconhecimento de OmpU pelo antissoro. Um reforço para esta hipótese, é o fato de mutantes acapsulados de AI1837, 1A e E6, terem sua adesão a células HEp-2 completamente inibida pelo antissoro anti-OmpU (Tab. 3).

Para testar a especificidade de inibição do antissoro anti-OmpU, fez-se o teste de inibição de adesão de EPEC E2348/69, que possui a proteína OmpA a qual reage com anti-OmpU (fig.1), com este antissoro (Tab. 3) e não houve inibição da adesão desta amostra, demonstrando que o antissoro anti-OmpU só inibe a adesão de *V. cholerae*. Para testar se o antissoro anti-OmpU era bacteriocida, *V. cholerae* 395 foi incubado em meio MEM com e sem o antissoro anti-OmpU, as bactérias foram plaqueadas em meio LA e crescidas por 18 horas a 37°C, havendo o mesmo número de colônias de bactérias entre as amostras tratadas ou não com o

antissoro anti-OmpU, indicando que o antissoro não é bacteriocida e que a ausência de bactérias nas células epiteliais tratadas com antissoro anti-OmpU é realmente devida a inibição da adesão destas bactérias às células. Realizou-se o teste de inibição de adesão de *V. cholerae* 395 com soro normal de coelho para ver se a inibição observada com o antissoro anti-OmpU não era ao complemento, e verificou-se que não houve inibição nenhuma da adesão (dados não mostrados), indicando que a inibição de adesão pelo antissoro anti-OmpU deve ser devida ao bloqueio dos receptores celulares de OmpU e pela opsonização de OmpU pelo seu antissoro.

Fragmentos F(ab)₂ do antissoro anti-OmpU foram preparados e obteve-se o mesmo resultado em termos de inibição completa da adesão de *V. cholerae* a células HEP-2 (Tab. 3), demonstrando-se assim que a inibição da adesão é específica e devida a opsonização de OmpU pelo seu antissoro, e não é devida a inespecificidade de inibição por fragmentos Fc dos anticorpos IgG que podem ligar-se às células (Abbas *et al.*, 1991). Já havia sido descrito por Sengupta *et al.* (1989) e Sengupta *et al.* (1992) a inibição da adesão *in vitro* de *V. cholerae* à células intestinais com um antissoro contra OMPs de *V. cholerae*, mas não se sabia qual destas OMPs era a responsável pela adesão. O antissoro anti-fator de colonização TCP só apresenta inibição de 57% da adesão de *V. cholerae* a células epiteliais de coelho (Sun *et al.*, 1990) e o antissoro anti-TcpA não inibiu a adesão *in vitro* a células HEP-2 das amostras de *V. cholerae* 395 e E7946 a 37°C (Tab. 3), demonstrando que a inibição observada por anti-OmpU não tem nada a ver com TCP e que a adesão de *V. cholerae* às células epiteliais é devida multifatorial, sendo OmpU uma provável adesina envolvida neste fenótipo.

O antissoro anti-OmpU e os fragmentos F(ab)₂ de anti-OmpU conferem proteção contra *V. cholerae* dos biotipos clássico e El Tor em camundongos recém-nascidos (Tab. 5), ao passo que TCP só oferece proteção contra o biotipo clássico (Sun *et al.*, 1990). O antissoro anti-OmpU inibe a colonização intestinal de camundongos recém-nascidos por *V. cholerae* clássico e El Tor (Tab. 6). Demonstrando que OmpU pode vir a ser uma adesina igualmente importante nos dois biotipos de *V. cholerae*, sendo que TCP foi demonstrada ser somente importante na adesão

do biotipo clássico (Sun *et al.*, 1990) e a adesina MSHA (hemaglutinina manose sensível) é expressa principalmente em linhagens do biotipo El Tor (Jonson *et al.*, 1991).

Na tentativa de localização do gene responsável pela codificação de *ompU*, foi sintetizado um oligonucleotídeo degenerado contendo todas as combinações possíveis a partir da sequência amino-terminal de OmpU (6.11). Contudo, este oligonucleotídeo era muito degenerado e não era específico para *ompU* conforme demonstrado por experimentos de hibridizações com "colony e Southern-blots" (dados não mostrados).

Como o oligonucleotídeo da região N-terminal de OmpU demonstrou não ser útil como sonda molecular para *ompU*, a proteína OmpU purificada foi enviada para a Universidade de Stanford, onde foi digerida com proteases, os peptídeos obtidos purificados por HPLC e sequenciados. Foram obtidos desta forma, 7 peptídeos internos de OmpU (6.10). Foi realizada a tradução reversa destes 7 peptídeos e o menos degenerado mostrou-se ser o peptídeo 4. A partir deste peptídeo sintetizou-se, então, um oligonucleotídeo no sentido 3'-5' (6.11) para ser utilizado como primer na reação de PCR descrita no item 6.11 e na Fig. 14, sendo o outro primer o oligonucleotídeo da região N-terminal de OmpU. Obteve-se como produto uma única banda de cerca de 686pb (Fig. 15), esta banda deveria ser parte do gene de *ompU*, pois a primeira combinação de primers a se anelar deve ser a mais específica, este anelamento foi realizado a 65°C (5.29) que é uma condição altamente estrigente e como produto obteve-se apenas uma banda (Fig. 15).

O produto de PCR foi clonado no plasmídeo pBluescript (6.12) e sequenciado. Encontrou-se na sequência de aminoácidos da proteína prevista para a sequência de DNA deste fragmento as sequências de aminoácidos da região N-terminal, e dos peptídeos 2, 4, 6 e 7 de OmpU (Fig. 17). Este fragmento foi utilizado como sonda molecular e hibridizado com o DNA genômico de *V. cholerae* 395 digerido com diferentes enzimas de restrição (Fig. 18). Houve hibridização com apenas uma banda com todas as enzimas utilizadas com exceção da enzima *Eco* RV com a qual houve hibridização com duas bandas, indicando a presença de um sítio de

Eco RV dentro desta região do gene de *ompU*, demonstrando assim, que este fragmento de PCR pode ser utilizado como uma sonda molecular específica para *ompU*.

Três bancos genômicos de *V. cholerae* em cosmídio foram hibridizados com a sonda *ompU* visando-se a clonagem do gene completo de *ompU*, porém nenhum clone nestas três bibliotecas hibridizou com OmpU.

Como a sonda de *ompU* hibridiza com um fragmento de *Hind* III de cerca de 3kb no DNA genômico de *V.cholerae* (Fig. 18), tentou-se clonar *ompU* diretamente a partir do cromossomo de *V. cholerae*. Cerca de 20µgs de DNA genômico de *V.cholerae* 395 foram digeridos com *Hind* III, realizou-se sua eletroforese em um gel de agarose 0,7% e os fragmentos entre 2,5 e 3,5 kb (dentro dos quais está o fragmento que contém *ompU*) foram excisados do gel, purificados por eletroeluição, clonados em diferentes vetores com número de cópias variável (alto, médio e poucos por célula) e transformados em *E. coli* DH5α. Realizou-se a hibridização dos colony-blots destes clones para localização do clone de *ompU* e diversas colônias hibridizaram com a sonda, entretanto, esses clones começaram a deixar de crescer já na primeira passagem por meio líquido, indicando que o gene *ompU* deve estar sendo expresso nestes clones e que a produção de OmpU, independentemente da sua quantidade, pode vir a desestabilizar a membrana celular de *E. coli*, sendo letal para esta bactéria. Tentou-se a clonagem de *ompU*, desta forma, em *Bacillus subtilis*, com um vetor de *B. subtilis* (pPL708), que é uma bactéria gram-positiva, e possui uma estrutura de membrana completamente diferente de *V.cholerae* e *E.coli* que são gram-negativas. Contudo, o plasmídio contendo *ompU* começou a segregar até ser completamente abortado de *B. subtilis*. Estes resultados sugerem que a expressão de OmpU pode ser tóxica para estas bactérias e que a clonagem do seu gene completo em plasmídios ou cosmídios não é possível.

Baseando-se nos resultados acima, um banco de *V. cholerae* 395 no fago λZAP II foi, então, hibridizado com a sonda de *ompU* (6.14), e obteve-se um clone de *ompU* (pVS12). Este clone foi confirmado pela reação de PCR do item 6.1, sequenciamento e Southern-blot (Fig. 19) e parece conter o gene *ompU* completo. Este clone está sendo sequenciado a partir de

oligonucleotídeos que se estendem para fora da região da sonda de *ompU*. Visto que a subclonagem deste em vetores plasmidiais demonstrou não ser possível. Já, este gene inserido em fago pode ser isolado, pois quando há a infecção da bactéria pelo fago, este entra diretamente em ciclo lítico não havendo, desta forma, a expressão de OmpU. .

Tentou-se realizar a mutagênese de *ompU* com o transposon *TnphoA* e não se obteve nenhuma mutação em *ompU* (6.15), o que pode ser uma indicação de que OmpU seja uma proteína essencial para a sobrevivência de *V. cholerae* e que uma mutação nesta proteína pode ser letal. A tentativa de mutagênese por inserção (6.16) também foi fracassada, confirmando a hipótese anterior.

Neste trabalho caracterizou-se OmpU, apontando-a como uma possível adesina de *V. cholerae* igualmente importante nos dois biotipos. Foi realizada a clonagem e o sequenciamento parcial do gene que codifica esta proteína, que demonstrou ser uma sonda molecular específica para *ompU* e através deste, isolou-se um clone de *ompU* em fago λ que, através de experimentos de Southern-blot, parece possuir o gene *ompU* completo. Não foi possível a obtenção de um mutante para OmpU, que parece ser um gene essencial para *V.cholerae*.

8. RESUMO:

A proteína de membrana externa OmpU de *V. cholerae* foi descrita, anteriormente, como sendo positivamente regulada por ToxR, que é o regulador de vários outros genes associados à virulência como CT, TCP e ACF. Neste trabalho, além da purificação de OmpU e o sequenciamento amino-terminal da mesma, foi verificada a ação desta proteína como uma provável adesina com papel na patogenicidade de *V. cholerae* e também apresentou-se um possível mecanismo de ação para OmpU. A sequência amino terminal mostrou possuir homologia com sequências das adesinas HMW1 e HMW2 de *Haemophilus influenzae*, que, por sua vez, possuem homologia com o Filamento Hemaglutinina (FHA) de *Bordetella pertussis*. O antissoro monoclonal X3C anti-FHA reconheceu OmpU e o antissoro policlonal anti-OmpU reconheceu FHA em Western blots. OmpU adere-se à proteína de matriz fibronectina e ao tripeptídeo RGD (domínio de ligação de várias adesinas de microorganismos a integrina). Tanto o antissoro anti-OmpU como os fragmentos F(ab)₂ deste antissoro inibem completamente a adesão de diversas linhagens de *V. cholerae* a diferentes células epiteliais; conferem proteção em camundongos recém-nascidos contra *V. cholerae* de ambos biotipos (clássico e El Tor) e inibem a adesão intestinal de *V. cholerae* dos biotipos El Tor e clássico ao intestino de camundongos recém-nascidos.

OmpU é reconhecida por soro de voluntários humanos experimentalmente infectados com *V. cholerae*, mostrando que OmpU é expressa "in vivo". OmpU também possui epitopos em comum com OmpA de *E. coli* e também é modificável por temperatura, podendo ter uma estrutura semelhante a OmpA.

Estes resultados indicam que OmpU deve ser um fator de aderência de *V. cholerae* às células epiteliais importante em ambos os biotipos El Tor e Clássico.

Uma sonda molecular foi desenvolvida para *ompU* através de uma reação de PCR nas quais utilizou-se como "primers" os oligonucleotídeos degenerados correspondentes a sequência N-terminal e de um peptídeo (Pep4) interno de OmpU. Através desta sonda, localizou-

se um clone de *ompU* em um banco genômico de *V. cholerae* 395 em λ ZAPII que parece conter o gene completo de OmpU.

9.SUMMARY:

The outer membrane protein OmpU of *V.cholerae* has previously been described as being positively regulated by ToxR, which is the regulator of several other genes related to virulence factors such as CT, TCP and ACF. In this project, besides the purification of OmpU and the sequencing of its N-terminal, the action of this protein as a probable adhesin which play a role in the pathogenicity of *V.cholerae* was verified, and it was also presented a probable action mechanism for OmpU. The N-terminal sequence showed homology with the sequences of the HMW1 and HMW2 adhesins of *Haemophilus influenzae*, which share homology with *Bordetella pertussis* Filamentous hemagglutinin (FHA). The FHA monoclonal antiserum X3C recognized OmpU, and polyclonal antiserum anti-OmpU recognized FHA in Western-blot. OmpU binds to fibronectin and to the tripeptide RGD (the binding domain of many adhesins of microorganism to integrin). Both the anti-OmpU antiserum and the F(ab)₂ fragments of these antiserum completely inhibit the adhesion of several strains of *V. cholerae* to different epithelial cells; confer protection in newborn mice against *V.cholerae* from both byotypes (classical and El Tor) and inhibit intestinal colonization in neobron mice by *V.cholerae* from byotypes classical and El Tor.

OmpU is recognized by serum of human volunteers experimentally infected with *V.cholerae*, showing that OmpU is expressed "in vivo". OmpU also shares epitopes with *E.coli* OmpA, and is also heat modifiable, indicating that OmpU may have structural similarities with OmpA.

These results indicate that OmpU may be an important adhesion factor to the epithelial cells for *V.cholerae* from both biotypes El Tor.

A molecular probe was developed for *ompU* with a PCR reaction, in which the primers were degenerate oligonucleotides correspondent to the N-terminal and an internal peptide (Pep4) sequences of OmpU. With this probe a clone was found in a genomic bank of *V.cholerae* 395 in λ ZAP II which seems to have the complete gene for OmpU.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A. and POBER, J. (1991). Cellular and Molecular Immunology. The W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- ALBERT, M.J., SIDDIQUE, A.K., ISLAM, M.S., FARUQUE, A. S. G., ANSARUZZAMAN, M., FARUQUE, S.M. and SACK, R.B. (1993). Large outbreak of clinical cholerae due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. **Lancet** **341**:704.
- ALM, R.A., BRAUN, G., MORONA, R. and MANNING, P.A. (1986). Detection of an OmpA-like protein in *Vibrio cholerae*. **FEMS Microbiol. Lett.** **37**: 99-104.
- ALM, R.A. and MANNING, P.A. (1990). Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup O1. **J. Clin Microbiol.** **28**: 823-824.
- ALM, R.A., STROEHER, U.H. and MANNING, P.A. (1988). Extracellular proteins of *Vibrio cholerae*: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) for the haemolysin of the haemolytic El Tor strain O17 and characterization of the *hlyA* mutation in the non-haemolytic classical strain 569B. **Mol. Microbiol.** **2**: 481-488.
- ALMEIDA, R.J., HICKMAN-BRENER, F.W., SOWERS, E.G., PUHR, N.D., FARMER, J.J. III and Wachsmuth, I.K. (1990). Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholerae toxin. **J. Clin. Microbiol.** **28**: 128-130.
- ATTRIDGE, S.R., DEARLOVE, C., BEYER, L., van den BOSH, L., HOWLES, A., HACKETT, J., MORONA, R., LaBROOY, J. and ROWLEY, D. (1991). Characterization and immunogenicity of EX880, a *Salmonella typhi* Ty21a-based clone which produces *Vibrio cholerae* O1 antigen. **Infect. Immun.** **59**: 2279-2284.
- ATTRIDGE, S.R. and ROWLEY, D. (1983). The specificity of *Vibrio cholerae* adherence and the significance of the slime agglutinin as a second mediator of in vitro attachment. **J. Infect. Dis.** **147**: 873-881.
- BARENKAMP, S.J. and LEININGER, E. (1992). Cloning, Expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous-hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun.** **60**(4): 1302-1313.
- BARRET, T.J. and BLAKE, P.A. (1981). Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seventh pandemic. **J. Clin. Microbiol.** **13**: 126-129.

- BARTOWSKY, E.J., ATTRIDGE, S.R., THOMAS, C.J., MAYRHOFFER, G. and MANNING, P.A. (1990). Role of the P plasmid in attenuation of *Vibrio cholerae* O1. **Infect. Immun.** **58**: 3129-3134.
- BARUA, D. (1988). Cholera during the last hundred years (1884-1983), p.9-32. In TAKEDA, Y and KUWAHARA, S. (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. **KTK Scientific Publishers**. Tokyo. Japan.
- BASELSKI, V., BRIGGS, R. and PARKER, C. (1977). Intestinal fluid accumulation induced by oral challenge with *Vibrio cholerae* or cholera toxin in infant mice. **Infect. Immun.** **15**: 704-712.
- BAUDRY, B., FASANO, A., KETLEY, J. and KAPER, J.B. (1992). Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **60**: 428-434.
- BAUMANN, P., FURNISS, A.L. and LEE, J.V. (1984). Genus I. *Vibrio*, p.518-538. In KRIEG, N.R. and HOLT, J.G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- BEAR, C.E., LI, C., KARTNER, N., BRIDGES, R.J., JENSEN, T.J., RAMJEESINGH, M. and RIORDAN, J.R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). **Cell** **68**: 809-818.
- BENNET, A. (1971). Cholerae and prostaglandins. **Nature** **231**: 536.
- BERSCHNEIDER, H.M., KNOWLES, M.R., AZIZKHAN, R.G., BOUCHER, R.C., TOBEY, N.A., ORLANDO, R.C. and POWELL, D.W. (1988). Altered intestinal chloride transport in cystic fibrosis. **FASEB J.** **2**: 2625-2629.
- BEUBLER, E., KOLLAR, G., SARIA, A., BUKHAVE, K. and RASK-MADSEN, J. (1989). Involvement of 5-hydroxytryptamine, prostaglandin E₂, and cyclic adenosine monophosphate in cholerae toxin-induced fluid secretion in the small intestine of the rat in vivo. **Gastroenterol.** **96**: 368-376.
- BLUM, M.H., BIER, H. and GROSS, H.J. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**:93.
- BORNSIDE, G.H. (1981). Jaime Ferran and preventive inoculation against cholerae. **Bull. Hist. Med.** **55**: 516-532.
- BROMANDER, A., HOLMGREN J. and LYCKE, N. (1991). Cholerae toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro. **J. Immunol.** **146**: 2908-2914.

- BROWN, M. H. and MANNING, P.A. (1985). Haemolysin genes of *Vibrio cholerae*: presence of homologous DNA in non-haemolytic O1 and non-haemolytic non-O1 strains. **FEMS Microbiol. Lett.** **30**: 197-201.
- BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M. and SHORT, J.M. (1987). **Biotechniques** **5**: 376.
- BURNETTE, W.N. (1981). "WESTERN BLOTTING": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.** **112**:195.
- BUTTERTON, J.R., STOEGBNER, S.M., PAYNE, S.M. and Calderwood, S.B. (1992). Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of *viuA*, the gene encoding the ferric vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **174**: 3729-3738.
- CALDERWOOD, S.B. and MEKALANOS, J.J. (1987). Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. **J. Bacteriol** **169**: 4759-4764.
- CARPENTER, C.C.J. (1992). The treatment of cholera: clinical science at the bedside. **J. Infect. Dis.** **166**: 2-14.
- CASH, R.A., MUSIC, S.I., LIBONATI, J.P., SNYDER, M.J., WENZEL, R.P. and HORNIK, R.B. (1974). Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I, Clinical, serologic and bacteriologic responses to a known inoculum. **J. Infect. Dis.** **129**: 45-52.
- CASSEL, D., PFEUFFER, T. (1978). Mechanism of cholerae toxin action: covalent modification of the guanyl-binding protein of the adenylate cyclase system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **75**:2669.
- CASSUTO, J., FAHRENKRUG, J., JODAL, M., TUTTLE, R. and LUNDGREN, O. (1981). The release of vasoactive intestinal polypeptide from the cat small intestine exposed to cholerae toxin. **Gut** **22**: 958-963.
- CASSUTO, J., JODAL, M. and LUNDGREN, O. (1982). The effect of nicotinic and muscarinic receptor blockade on cholerae toxin induced intestinal secretion in rats and cats. **Acta. Physiol. Scand.** **114**: 573-577.
- CASSUTO, J., JODAL, M., TUTTLE, R. and LUNDGREN, O. (1981). On the role of intramural nerves in the pathogenesis of cholerae toxin-induced intestinal secretion. **Scand. J. Gastroenterol.** **16**: 377-384.
- CASSUTO, J., SIEWERT, A., JODAL, M. and LUNDGREN, O. (1983). The involvement of intramural nerves in the pathogenesis of cholerae toxin-induced intestinal secretion. **Acta. Physiol. Scand.** **117**: 195-202.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. (1993). Imported cholerae associated with a newly described toxigenic *Vibrio cholerae* O139 strain - California, 1993. **Morbid. Mort. Wkly. Rep.** **42**: 501-503.
- CHANG, E.B. and RAO, M.C. (1991). Intracellular mediators of intestinal electrolyte transport, p. 49-72. In FIELD, M. (ed.), *Diarrheal diseases*, Elsevier, New York.
- CHITNIS, D.S., SHARMA, K.D. and KAMAT, R.S. (1982). Role of somatic antigen of *Vibrio cholerae* in adhesion to intestinal mucosa. **J. Med. Microbiol.** **5**: 53-61.
- CHOLERA WORKING GROUP. (1993). Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. **Lancet** **342**: 387-390.
- COOKE, H.J. (1991). Hormones and neurotransmitters regulating intestinal ion transport, p. 23-48. In FIELD, M. (ed.), *Diarrheal diseases*. Elsevier, New York.
- CZERKINSKY, C., RUSSELL, M.W., LYCKE, N., LINDBLAD, M. and OLMGREN, J. (1989). Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholerae toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. **Infect. Immun.** **57**: 1072-1077.
- CUATRECASAS, P. (1973). *Vibrio cholerae* cholera toxin: mechanism of inhibition of cholera toxin action. **Biochemistry** **2**:3577.
- de JONGE, H.R. (1991). Intracellular mechanisms regulating intestinal secretion, p. 107-114. In WADSTRÖM, T., MÄKELÄ, P.H., SVENNERHOLM, A.M. and WOLF-WATZ, H. (eds.), *Molecular Pathogenesis of gastrointestinal Infections*, Plenum Press, New York.
- DE, S.N. (1959). Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. **Nature (London)** **183**:1533.
- DEBBAUGH, M.T., PETERSON, D.L. and MACRINA, F.L. (1990). Cholera toxin B-subunit gene fusion: structural and functional analysis of the chimeric protein. **Infect. Immun.** **58**: 70-79.
- DIAMOND, J.M. (1977). The epithelial junction: bridge, gate and fence. **Physiologist**, **20**: 10-18.
- DIRITA, V.J. (1992). Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**. **6**:451-458.
- DIRITA, V.J. and MEKALANOS, J.J. (1989). Genetic regulation of bacterial virulence. **Annu. Rev. Genet.** **23**:455.
- DIRITA, V.J., PARSOT, C., JANDER, C. and MEKALANOS, J.J. (1991). Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **88**:5403-5407.

- DONTA, S.T. (1974). Differentiation between the steroidogenic effects of cholerae enterotoxin and adrenocorticotropin through use of a mutant adrenal cell line. **J. Infect. Dis.** **129**: 728-731.
- DONTA, S.T., BERISTAIN, S. and TOMICIC, T.K. (1993). Inhibition of heat-labile cholera and *Escherichia coli* enterotoxins by brefeldin A. **Infect. Immun.** **61**: 3282-3286.
- DUBEY, R.S., LINDBLAD, M. and HOLMGREN, J. (1990). Purification of El Tor cholera enterotoxins and comparisons with classical toxin. **J. Gen. Microbiol.** **136**: 1839-1847.
- DUTTA, N.K., PANSE, M.W., KULKARMI, D.R. (1959). Role of cholera toxin in experimental cholera. **J. Bacteriol.** **78**:594.
- EHARA, M., ISHIBASHI, M., ICHINOSE, Y., IWANAGA, M., SHIMOTORI, S. and NAITO, T. (1987). Purification and partial characterization of fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. **Vaccine** **5**: 283-288.
- EVERISS, K., HARKEY, C., HUGHES, K., KOVACH, M. and PETERSON, K. (1992). Molecular analysis of the accessory colonization factor gene cluster of *Vibrio cholerae*. **Abstracts Gen. Mtg. Amer. Soc. Microbiol.** **92**: 26. (Abstract)
- FARQUES, S.M., KAPER, J.B. and ALBERT, M.J. (1993). Manuscript in preparation. (UnPub)
- FASANO, A., BAUDRY, B., PUMPLIN, D.W., WASSERMAN, S.S., TALL, B.D., KETLEY, J.M. and KAPER, J.B. (1991). *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 5242-5246.
- FIELD, M. (1980). Intestinal secretion and its stimulation by enterotoxin. In OUCHTCHERLONY, O., HOLMGREN, J. (eds.). Cholera and related diarrheas. Karger, Basel p46.
- FIELD, M. (1971). Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. **N. Engl. J. Med.** **284**:1137-1144.
- FIELD, M. (1981). Secretion of electrolytes and water by mammalian small intestine, p 963-982. In JOHNSON, L.R. (ed.), Physiology of the Gastrointestinal Tract. Raven Press, New York.
- FIELD, M., FROMM, D., AL-AWQATI, Q. and GREENOUGH, W.B. III. (1972). Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. **J. Clin. Invest.** **51**: 796-804.

- FIELD, M., FROMM, D., WALLACE, C.K. and GREENOUGH, W.B. III. (1969). Stimulation of active chloride secretion in small intestine by cholera exotoxin. **J. Clin. Invest.** **48**: 24a. (Abstract).
- FIELDS, P.I., CAMERON, D.N. and MANNING, P. (1993). The molecular basis for Ogawa-Inaba serotype shift in *Vibrio cholerae* O1. Abstr. 28th Joint US-Japan cooperative Medical Science Program, Cholera Panel 63-65.
- FIELDS, P.I., POPOVIC, T., WACHSMUTH, K. and OLSVIK, O. (1992). Use of polimerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the latin American cholera epidemic. **J. Clin. Microbiol.** **30**: 2118-2121.
- FINKELSTEIN, R.A. (1988). Cholera-the grat teacher: 100 years since Koch's postulates, pp 57-77. In TAKEDA, Y and KUWAHARA, S (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. **KTK Scientific Publishers**, Tokyo, Japan.
- FINKELSTEIN, R.A. (1992). Cholera enterotoxin (choleragen)- A historical perspective, p. 155-187. In BARUA, D. and GREENOUGH, III, W.B. (eds.), *Cholera*, Plenum Medical Book Co., New York.
- FINKELSTEIN, R.A., BOESMAN-FINKELSTEIN, M., CHANG, Y. and Háse, C.C. (1992). *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. **Infect. Immun.** **60**: 472-478.
- FINKELSTEIN, R.A., BOESMAN-FINKELSTEIN, M. and HOLT, P. (1983). *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyses fibronectin and ovomucin: F.M. Burnet revisited. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **80**: 1092-1095.
- FINKELSTEIN, R.A. and LaBREC, E.H. (1959). Rapid identification of cholera vibrios with fluorescent antibody. **J. Bacteriol.** **78**: 886-891.
- FINKELSTEIN, R.A. and LoSPALLUTO, J.J. (1969). pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of choleragen and choleragenoid. **J. Exp. Med.** **130**: 185-202.
- FINKELSTEIN, R.A., NORRIS, H.T. and DUTTA, N.K. (1964). Pathogenesis of experimental cholera in infant rabbits. 1.Observation on the intrainstestinal infection and experimental cholera produced with cell-free products. **J. Infect. Dis.** **144**:203.
- FINN, T.M., REISER, J., GERMANIER, R. and CRYZ, Jr., S.J. (1987). Cell-associated hemagglutinin-deficient mutant of *Vibrio cholerae*. **Infect. immun.** **55**: 942-946.
- FOLLET, E.A.C. and GORDON, J. (1963). An electron microscope study of vibrio flagella. **J. Gen. Microbiol.** **32**: 235-239.

- FORREST, B.D., LaBROOY, J.T., ATTRIDGE, S.R., BHOEM, G., BEYER, L., MORONA, R., SHEARMAN, D.J.C. and ROWLEY. (1989). Immunogenicity of a candidate live oral typhoid vaccine in humans. **J. Infect. Dis.** **159**: 145-146.
- FRANCIS, M.L., RYAN, J., JOBLING, M.G., HOLMES, R.K., MOSS, J. and MOND, J.J. (1992). Cyclic AMP-independent effects of cholerae toxin on B cell activation. II. Binding of ganglioside G_{M1} induces B cell activation. **J. Immunol.** **148**: 1999-2005.
- FRANZON, V.L., BARKER, A. and MANNING, P.A. (1993). Nucleotide sequence encoding the mannose-fucose-resistant hemagglutinin of *Vibrio cholerae* O1 and construction of a mutant. **Infect. Immun.** **61**:3032-3037.
- FRANZON, V.L. and MANNING, P.A. (1986). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* K12 of the gene hemagglutinin from *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **52**: 279-284.
- FREER, J.H. and BIRKBECK, T.H. (1982). Possible conformation of delta lysis, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*. **J. Theor. Biol.** **94**: 535-540.
- FRETER, R. and JONES, G.W. (1976). Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with mucosal surfaces. **Infect. Immun.** **14**: 246-256.
- FRETER, R., O'BRIEN, P.C.M. and MACSAI, M.S. (1981). Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo Studies. **Infect. Immun.** **34**: 234-240.
- FROMAN, G., SWITALSKI, L.M., FARIS, A., WADSTROM, T. and HOOK, M. (1984). Binding of *Escherichia coli* to fibronectin. **J. Biol. Chem.** **259**:14899-14905.
- FUERST, J.A. and PERRY, J.W. (1988). Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy. **J. Bacteriol.** **170**: 1488-1494.
- GAGINELLA, T.S. (1990). Eicosanoid-mediated intestinal secretion, p. 15-30. In LEBENTHAL, E. and DUFFEY, M.E. (eds.), Textbook of secretory Diarrhea. **Raven Press**, New York.
- GALEN, J.E., KETLEY, J.M., FASANO, A., RICHARDSON, S.H., WASSERMAN, S.S. and KAPER, J.B. (1992). Role of *Vibrio cholerae* neuroaminidase in the function of cholerae toxin. **Infect. Immun.** **60**: 406-415.
- GALLUT, J. (1974). Bacteriology, p. 17-40. In BARUA, D. and BURROWS, W. (eds.), Cholera. **W.B. Saunders Co.**, Philadelphia.
- GENNARO, M.L., GREENAWAY, P.J. and BROADBENT, D.A. (1982). The expression of biological active cholera toxin in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids res.** **10**: 4883-4890.

- GILL, D.M. (1976). The arrangements of subunits in cholera toxin. **Biochemistry** **15**:1242.
- GILL, D.M. (1982). Cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation of membrane proteins, p.593-621. In HAYASHI, O. and UEDA, K. (ed.), ADP-ribosylations in biology and medicine. **academic. Press. Inc.** New York.
- GILL, D.M. and KING, C.A. (1975). The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocytes lysates. **J. Biol. Chem.** **250**:6224.
- GILL, D.M. and MEREN, R. (1978). ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **75**:3050.
- GILL, D.M. and RAPPAPORT, R.S. (1977). The origin of A1. In the 12th joint conference on cholera. US-Japan cooperative medical science program, Japan. National institute of Health, Bethesda, MD.
- GLASS, R.I., CLAESON, M., BLAKE, P.A., WALDMAN, J. and PIERCE, N.F. (1991). Cholera in Africa: Lessons of transmission and control for Latin America. **Lancet** **338**: 791-795.
- GOLDBERG, I. and MEKALANOS, J.J. (1986). Effect of *recA* mutation on cholera toxin amplification and deletion events. **J. Bacteriol.** **165**: 723-731.
- GOLDBERG, M.B., BOYKO, S.A. and CALDERWOOD, S.B. (1990). Transcriptional regulation by iron of a *Vibrio cholerae* virulence gene and homology of the gene to the *Escherichia coli* Fur system. **J. Bacteriol.** **172**: 6863-6870.
- GOLDBERG, M.B., BOYKO, S.A. and CALDERWOOD, S.B. (1991). Positive transcriptional regulation of an iron regulated virulence gene in *Vibrio cholerae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 1125-1129.
- GOLDBERG, M.B., DiRITA, V.J. and CALDERWOOD, S.B. (1990). Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using Tn*PhoA* mutagenesis. **Infect. Immun.** **58**: 55-60.
- GOULD, S.J., SUBRAMANI, S. and SCHEFFLER, I.E. (1989). Use of DNA polymerase chain reaction for homology probing: isolation of partial cDNA or genomic clones encoding the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase from several species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **86**:1934-1938.
- GREENOUGH, W., III, BENESON, A.S. and ISLAM, M.R. (1965). Experience of darkfield examination of stools from diarrheal patients, p. 56-58. In Proceedings of the cholera research Symposium (Jan. 24-29, 1965, Honolulu). US Government Printing Office, Washington, D.C.

- GREENOUGH, W.B., III, and KHIN-MAUNG, U. (1991). Oral rehydration therapy, p485-499. In M. Field (ed.), Diarrheal diseases. Elsevier/North Holland Science Publishing, Amsterdam.
- GRIFFITHS, G.L., SIGEL, S.P., PAYNE, S.M. and NEILANDS, J.B. (1984). Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. **J. Biol. Chem.** **259**: 383-385.
- GRIFFITHS, G.L., FINKELSTEIN, R.A. and CRITHLEY, D.R. (1986). Characterization of the receptor for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin in rabbit intestinal brush borders. **Biochem. J.** **238**: 313-322.
- GUERRANT, R.L., BRUNTON, L.L., SCHNAITMAN, T.C., REBHUN, L.I. and GILMAN, A.G. (1974). Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **10**: 320-327.
- GUSTAFSSON, B. and HOLME, T. (1985). Rapid detection of *Vibrio cholerae* O:1 by motility inhibition and immunofluorescence with monoclonal antibodies. **Eur. J. Clin. Microbiol.** **4**: 291-294.
- HALL, R.F., KHAMBATY, F.M., KOTHARY, M. and KEASLER, S.P. (1993). Non-O1 *Vibrio cholerae*. **Lancet.** **342**: 430.
- HALL, R.H., LOSONSKY, G., SILVEIRA, A.P., TAYLOR, R.K., MEKALANOS, J.J., WITHAM, N.D. and LEVINE, M.M. (1991). Immunogenicity of *Vibrio cholerae* O1 toxin-correlated pili in experimental and clinical cholera. **Infect. Immun.** **59**: 2508-2512.
- HALL, R.H., VIAL, P.A., KAPER, J.B., MEKALANOS, J.J. and LEVINE, M.M. (1988). Morphological studies on fimbriae expressed by *Vibrio cholerae* O1. **Microb. Pathog.** **4**: 257-265.
- HANNE, L.F. and FINKELSTEIN, R.A. (1982). Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **36**: 209-214.
- HARLOW, A. and LANE, R. (1989). Antibodies. Second Edition.
- HASAN, J.A.K., HUQ, A., TAMPLIN, M.L., SIEBELING, R., and COLWELL, R.R. (1994). A novel kit for detection of *Vibrio cholerae* O1. **J. Clin. Microbiol.** **32**: 249-252.
- HÄSE, C.C., BAUER, M.E. and FINKELSTEIN, R.A. (1993). Genetic characterization of MSHA-negative mutants of *Vibrio cholerae* derived by Tn5 mutagenesis. **Abstr. annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.** **1993. 93**: 84. (Abstract)

- HÄSE, C.C. and FINKELSTEIN, R.A. (1991). Cloning and nucleotide sequence of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. **J. Bacteriol.** **173**: 3311-3317.
- HECHT, G., POTHOUKAKIS, C., LaMONT, J.T. and MADARA, J.L. (1988). *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of the cultured human. **J. Clin. Invest.** **82**: 1516-1524.
- HEIBERG, B. (1936). The biochemical reaction of vibrios. **J. Hyg.** **36**: 114-117.
- HENDERSON, D.P. and PAYNE, S.M. (1993). Cloning and characterization of *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. **Mol. Microbiol.** **7**: 461-469.
- HEPLER, J.R. and GILMAN, A.G. (1992). G proteins. **Trends. Biochem. Sci.** **17**: 383-387.
- HERRINGTON, D.A., HALL, R.H., LOSONSKY, G., MEKALANOS, J.J., TAYLOR, R.K. and LEVINE, M.M. (1988). Toxin, toxin-correlated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. **J. Exp. Med.** **168**: 1487-1492.
- HIGGINS, D.E., NAZARENO, E. and DiRITA, V.J. (1992). The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators. **J. Bacteriol.** **174**: 6974-6980.
- HIRST, T.R. (1991). Assembly and secretion of oligomeric toxins by Gram-negative bacteria, p. 75-100. In ALOUF, J.E. and FREER, J.H. (eds.), Sourcebook of bacterial protein toxins. Academic Press, Ltd., London.
- HOLMGREN, J. (1992). Pathogenesis, p. 199-208. In BARUA, D. and GREENOUGH, W.B., III (eds.), Cholera. Plenum Medical Book Company, New York.
- HOLMGREN, J., LONNROTH, I., MANSSON, J. and SVENNERHOLM, L. (1975). Interaction of cholera toxin and membrane G_{M1} ganglioside of small intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**: 2520-2524.
- HONDA, T. and FINKELSTEIN, R.A. (1979). Selection and characteristics of a *Vibrio cholerae* mutant lacking the A (ADP-ribosylating) portion of the cholera enterotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 2052-2056.
- HONDA, T. and FINKELSTEIN, R.A. (1979). Purification and characterization of a hemolysis produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. **Infect. Immun.** **26**: 1020-1027.

- HONDA, T., NISHIBUCHI, M., MIWATANI, T. and KAPER, J.B. (1986) Demonstration of a plasmid-borne gene encoding a thermostable direct hemolysis in *Vibrio cholerae* non-O1 strains. **Appl. Environ. Microbiol.** **52**: 1218-1220.
- HOWARD, B.D. (1971). a prototype live oral cholera vaccine. **Nature** **230**:97.
- HOWARD-JONES, N. (1972). Choleranomalies: the unhistory of medicine as exemplified by cholera. **Perspect. Biol. Med.** **15**:422.
- HRANITSKY, K.W., MULHOLLAND, A., LARSON, A.D., EUBANKS, E.R. and HART, L.T. (1980). Characterization of a flagellar sheath protein of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **27**: 597-603.
- HUGHES, J.M., HOLLIS, D.G., GANGAROSA, E.J. and WEAVER, R.E. (1978). Non-cholera vibrio infections in the United States. **Ann. Intern. Med.** **88**: 602-606.
- ICHINOSE, Y. YAMAMOTO, K., NAKASOME, N., TANABE, M.J., TAKEDA, T., MIWATANI, T. and IWANAGA, M. (1987). Enterotoxicity of El Tor-like hemolysis of non-O1 *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **55**: 1090-1093.
- ITO, T., HIRAMATSU, K., OHSHITA, Y. and YOKOTA, T. (1993). Mutations in the *rfbT* gene are responsible for the Ogawa to Inaba serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. **Microbiol. Immunol.** **37**: 281-288.
- JACOB, A., SINHA, V.B., SAHIB, M.K., SRIVASTAVA, R., KAPER, J.B. and SRIVASTAVA, B.S.. (1993). Identification of a 33KDa antigen associated with an adhesive and colonizing strain of *Vibrio cholerae* El Tor and its role in protection. **Vaccine** **11**: 376-382.
- JALAJAKUMARI, M.B. and MANNING, P.A. (1990). Nucleotide sequence of the gene, *ompW*, encoding a 22 kDa immunogenic outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. **Nucleic. Acids. Res.** **18**: 2180.
- JESUDASON, M.V., CHERIAN, A.M. and JOHN, T.J. (1993). Blood stream invasion by *Vibrio cholerae* O139. **Lancet** **342**: 431.
- JESUDASON, M.V., THANGAVELU, C.P. and LALITHA, M.K. (1984). Rapis screening of fecal samples for *Vibrio cholerae* by a coagglutination technique. **J. Clin. Microbiol.** **19**: 712-713.
- JOHNSON, J.A., ALBERT, M.J., PANIGRAHI, P., WRIGHT, A.C., JOSEPH, A., COMSTOCK, L., TRUCKSIS, M., MICHALSKI, J., JOHNSON, R.J., KAPER, J.B. and MORRIS, J.G., Jr. (1993). Non-O1 *Vibrio cholerae* O139 (synonym Bengal) from the India/bangladesh epidemic are encapsulated. **Abstr. Twenty-ninth Joint Conference on Cholera and Related Diarrheal Diseases** 35-38. (Abstract).

- JOHNSON, J.A., HOPKINS, R.J., PANIGRAHI, P. and MORRIS, J.G., Jr. (1993). Evidence that the polysaccharide capsule of the non-O1 *Vibrio cholerae* NRT-36S mediates attachment to epithelial cells. **Abstracts. Gen. Meet. Amer. Soc. Microbiol. 83.** (Abstract).
- JOHNSON, J.A., MORRIS, J.G., Jr. and KAPER, J.B. (1993). Gene encoding zonula occludens toxin (*zot*) does not occur independently from cholera enterotoxin genes (*ctx*) in *Vibrio cholerae*. **J. Clin. Microbiol. 31:** 732-733.
- JOHNSON, J.A., PANIGRAHI, P. and MORRIS, J.G., Jr. (1992). Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. **Infect. Immun. 60:** 864-869.
- JOHNSON, J.A., SALLES, C.A., PANIGRAHI, P., ALBERT, M.J., WRIGHT, A.C., JOHNSON, R.J. and MORRIS, J.G., Jr. (1994). *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal is closely related to *Vibrio cholerae* El Tor but has important differences. **Infect. Immun. 62:** 2108-2110.
- JONES, G.W. and FRETER, R. (1976). Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. **Infect. Immun 14:** 240-245.
- JONSON, G., HOLMGREN, J. and SVENNERHOLM, A.-M. (1991). Identification of a mannose-binding pilus on *Vibrio cholerae* El Tor. **Microb. Pathog. 11:** 433-441.
- JONSON, G., HOLMGREN, J. and SVENNERHOLM, A.-M. (1991). Epitope differences in toxin-coregulated pili produced by classical and El Tor *Vibrio cholerae* O1. **Microb Pathog. 11:** 179-188.
- JONSON, G., HOLMGREN, J. and SVENNERHOLM, A.-M. (1992). Analysis of expression of toxin-coregulated pili in classical and El Tor *Vibrio cholerae* O1 in vitro and in vivo. **Infect. Immun. 60:** 4278-4284.
- JONSON, G., LEBENS, M. and HOLMGREN, J. (1994). Cloning and sequencing of *Vibrio cholerae* mannose-sensitive haemagglutinin pilin gene: localization of *mshA* within a cluster of type 4 pilin genes. **Molec. Microbiol. 13(1):** 109-118.
- JONSON, G., SVENNERHOLM, A.-M and HOLMGREN, J. (1989). *Vibrio cholerae* expresses cell surface antigens during infection which are not expressed during in vitro culture. **Infect. Immun. 57:** 1809-1815.
- JONSON, G., SVENNERHOLM, A.-M and HOLMGREN, J. (1990). Expression of virulence factors by classical and El Tor *Vibrio cholerae* in vivo and in vitro. **FEMS Microbiol. Ecol. 74:** 221-228.

- KAHN, R.A. and GILMAN, A.G. (1984). ADP-ribosylation and G_s promotes dissociation of its a and b subunits. **J. Biol. Chem.** **259**: 6235-6240.
- KAPER, J.B., BRADFORD, H.B., ROBERTS, N.C. and FALKOW, S. (1982). Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the U.S. Gulf Coast. **J. Clin. Microbiol.** **16**: 129-134.
- KAPER, J.B., FASANO, A. and TRUCSIS. (1994). Toxins of *Vibrio cholerae*, p. 145-176. In WACHSMUTH, I.K., BLAKE, P. and OLSVIK, O (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global perspectives. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.
- KAPER, J.B. and LEVINE, M.M. (1981). Cloned cholera enterotoxin genes in study and prevention of cholera. **Lancet** **2**: 1162-1163.
- KAPER, J.B., LOCKMAN, H., BALDINI, M.M. and LEVINE, M.M. (1984a). A recombinant live oral cholera vaccine. **Bio/Technology** **2**: 345-349.
- KAPER, J.B., LOCKMAN, H., BALDINI, M. and LEVINE, M.M. (1984b). Recombinant non toxigenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccines candidates. **Nature (London)** **308**:655.
- KAPER, J.B., MOBLEY, H.L.T., MICHALSKI, J., HERRINGTON, D.A. and LEVINE, M.M. (1988). Recent advances in developing a safe and effective live oral attenuated *Vibrio cholerae* vaccine, p. 161-167. In OHTOMO, N. and SACK, R.B. (eds.), *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*, vol. 6. **KTK Scientific Publishers**, Tokyo.
- KAPER, J.B., MOSELEY, S.L., FALKOW, S. (1981). molecular characterization of enviromental and non toxigenic strains of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **32**:661.
- KAPER, J.B., NATARO, J.P., ROBERTS, N.C., SIEBELING, R.J. and BRADFORD, H.B. (1986). Molecular epidemiology of non-O1 *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* in the U.S. Gulf Coast region. **J. Clin. Microbiol.** **23**: 652-654.
- KAPRAL, F.A., O'BRIEN, A.D., RUFF, P.D. and DRUGAN, W.J., Jr. (1976). Inhibition of water absorption in the intestine by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. **Infect. Immun.** **13**: 140-145.
- KARASAWA, T., MIHARA, T., KURAZONO, H., NAIR, G.B., GARG, S., RAMAMURTHY, T. and TAKEDA, Y. (1993). Distribution of the *zot* (zonula occludens toxin) gene among strains of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1. **FEMS** **106**: 143-146.
- KAUFMAN, M.R., SHAW, C.E., JONES, I.D. and TAYLOR, R.K. (1993). Biogenesis and regulation of the *Vibrio cholerae* toxin-corregulated pilus: Analogies to other virulence factor secretory systems. **Gene** **126**: 43-49

- KEASLER, S.P. and HALL, R.H. (1993). Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. **Lancet** **341**: 1661.
- KELLY, M.T., HICKMAN-BRENNER, F.W. and FARMER, J.J., III. (1991). *Vibrio*, p. 384-395. In BALOWS, A., HAUSLER, W.J., Jr., HERRMANN, K.O., ISENBERG, H.D. and SHADOMY, H.J. (eds.), Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.
- KENNE, L., LINDBERG, B., UNGER, P., GUSTAFSSON, B. and HOLME, T. (1982). Structural studies of the *Vibrio cholerae* O-antigen. **Carbohydr. Res.** **100**: 341-349.
- KENNETH, H.R. and PUSHPARANI, D. (1990). A strategy for single site PCR amplification of dsDNA: priming digested cloned or genomic DNA from an anchor-modified restriction site and a short internal sequence. **Biotechniques** **8**(1):48-57.
- KETLEY, J.M., KAPER, J.B., HERRINGTON, D.A., LOSONSKY, G. and LEVINE, M.M. (1990). Diminished immunogenicity of a recombinant-deficient derivative of *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD103. **Infect. Immun.** **58**: 1481-1484.
- KETLEY, J.M., MICHALSKI, J., GALEN, J., LEVINE, M.M. and KAPER, J.B. (1993). Construction of genetically-marked *Vibrio cholerae* O1 vaccine strains. **FEMS Microbiol. Lett.** **111**: 15-22.
- KIMBERG, D.K., FIELD, M., JOHNSON, J., HENDERSON, E. and GERSHON, E. (1971). Stimulation of intestinal mucosal adenylyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. **J. Clin. Invest.** **50**: 1218-1230.
- KING, C.A. and van HEYNINGEN, W.E. (1973). Deactivation of cholera toxin by a sialidase-resistant monosialosylganglioside. **J. Infect. Dis.** **127**: 639-647.
- KOBLAVI, S., GRIMONT, F. and GRIMONT, P.A.D. (1990). Clonal diversity of *Vibrio cholerae* O1 evidenced by rRNA gene restriction patterns. **Res. Microbiol.** **141**: 645-657.
- KOCH, R. (1883). Der seitens des Geh. Reg. Rath Dr. R. Koch an den Staatssekretär des innern. Herrn Staatsminister v. Betticher Excellenz erstattete bericht. **Dtsche. Med. Wschr** **9**: 615-617.
- KOCH, R. (1884). An address on cholera and its bacillus. **Dtsch. Med. Wochenschr.** **10**:111. (Translated in **Br. Med. J.** **ii**:403-407, 453-459, 1884).
- KOCH, R. (1884). Weiters uber de Cholera-bacillen. **Wein Med. Bl.** **vii**:464.
- KOCH, R. (1886). Further researches on cholerae. **B. Med. J.** **I**: 62-66.

- KOCH, W.H., PAYNE, W.L., WENTZ, B.A., and CEBULA, T.A. (1993). Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. **Appl. Environ. Microbiol.** **59**: 556-560
- KOLVIN, J.L. and ROBERTS, D. (1982). Studies on the growth of *Vibrio cholerae* biotype El Tor and biotype classical in foods. **J. Hyg. (Cambridge)** **89**: 243-252.
- KONNIN, E.V. (1992). The second cholera toxin, Zot, and its plasmid-encoded and phage-encoded homologues constitute a group of putative ATPases with an altered purine NTP-binding motif. **FEBS Lett.** **312**: 3-6.
- KRAUSE, M., ROUDIER, C., FIERER, J., HARWOOD, J. and GUINEY, D. (1991). Molecular analysis of the virulence of the *Salmonella dublin* plasmid pSDL2. **Mol. Microbiol.** **5**: 307-316.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685
- LANG, H.A. and PALVA, E.T. (1987). A major outer membrane protein in *Vibrio cholerae* is maltose-inducible. **Microb. Pathog.** **3**: 143-147.
- LAVAL, E. (1989). El cólera en Chile (1886-1888). **Revista Chilena de Infectologia** **6**: 96-99.
- LANG, H. and PALVA, E.T. (1993). The *ompS* gene of *Vibrio cholerae* encodes a growth-phase-dependent maltoporin. **Mol. Microbiol.** **10**: 891-901
- LEININGER, E., EWANOWICH, C.A., BHARGAWA, A., MARK, S.P., KENIMER, J.G. and BRENNAN, M. (1992). Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. **Infect. Immun.** **60**: 2380-2385
- LEININGER, E., ROBERTS, M., KENIMER, J.G., CHARLES, I.G., FAIRWEATHER, N., NOVOTNY, P. and BRENNAN, M.J. (1991). Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. **proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 345-349.
- LENCER, W.I., ALMEIDA, J.B., MOE, S., STOW, J.L., AUSIELLO, D.A. and MADARA, J.L. (1993). Entry of cholera toxin into polarized human epithelial cells: identification of an early brefeldin-A sensitive event required for A₁ peptide generation. **J. Clin. Invest.** **92**: 2941-2951.
- LENCER, W.I., DELP, C., NEUTRA, M.R. and MADARA, J.L. (1992). Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: Role of vesicular traffic. **J. Cell. Biol.** **117**: 1197-1209.

- LEVINE, M.M. (1980). Immunity to cholera as evaluated in volunteers, p. 195-203. In OUCHTERLONY, O. and HOLMGREN, J. (eds.), *Cholera and related diarrheas*. Karger, Basel.
- LEVINE, M.M., BLACK, R.E., CLEMENTS, M.L., LANATA, C., SEARS, S., HONDA, T., YOUNG, C.R. and FINKELSTEIN, R.A. (1984). Evaluation in humans of attenuated *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa strain Texas Star-SR as a live oral vaccine. **Infect. Immun.** **43**: 515-522.
- LEVINE, M.M., BLACK, R.E., CLEMENTS, M.L., NALIN, D.R., CISNEROS, L. and FINKELSTEIN, R.A. (1981). Volunteer studies in development of vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli*: A review, p. 443-459. In HOLME, T., HOLMGREN, J., MERSON, M.H. and MOLLBY, R. (eds.), *Acute enteric infections in children. New prospects for treatment and prevention*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- LEVINE, M.M., KAPER, J.B. and CLEMENTS, M.L. (1983). New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiol. Rev.** **47**: 510-550.
- LEVINE, M.M., KAPER, J.B., HERRINGTON, D., KETLEY, J., LOSONSKY, G., TACKET, C.O., TALL, B. and CRYZ, S. (1988a). Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral vaccines, CVD103 and CVD103-HgR. **Lancet** **2**: 467-470.
- LEVINE, M.M., KAPER, J.B., HERRINGTON, D., LOSONSKY, G., MORRIS, J.G., CLEMENTS, M.L., BLACK, R.E., TALL, B. and HALL, R. (1988). Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. **Infect. Immun.** **56**: 161-167.
- LEVINE, M.M. and PIERCE, N.F. (1992). Immunity and vaccine development, p. 285-327. In BARUA, D. and GREENOUGH, W.B., III (eds.), *Cholera*. Plenum Medical Book Co., New York.
- LOCKMAN, H. and KAPER, J.B. (1983). Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. **J. Biol. Chem.** **258**: 13722-13726.
- LOCKMAN, H., GALEN, J. and KAPER, J.B. (1984). *Vibrio cholerae* enterotoxin genes: nucleotide sequence analysis of DNA encoding ADP-ribosyltransferase. **J. Bacteriol.** **159**: 1986-1989.
- LUNDGREN, O. (1988). Factors controlling absorption and secretion in the small intestine, p. 97-112. In DONACHIE, W., GRIFFITHS, E. and STEPHEN, J. (eds.), *Bacterial Infections of Respiratory and Gastrointestinal Mucosae*. IRL Press, Oxford.

- LYCKE, N. and HOLMGREN, J. (1986). Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. **Immunology** **59**: 301-308.
- LYCKE, N. and HOLMGREN, J. (1989). Adaptative transfer of gut mucosal antitoxin memory by isolated B cells 1 year after oral immunization with cholera toxin. **Infect. Immun.** **57**:1137.
- LYCKE, N., KARLSSON, U., SJÖLANDER, A. and MAGNUSSON, K.-E. (1991). The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. **Scand. J. Immunol.** **33**: 691-698.
- LYCKE, N. and STROEBER, W. (1989). Cholera toxin promotes B cell isotype differentiation. **J. Immunol.** **142**: 3781-3787.
- LYCKE, N., TSUJI, T. and HOLMGREN, J. (1992). The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. **Eur. J. Immunol.** **2**: 2277-2281.
- LYCKE, N.Y. and SVENNERHOLM, A. -M. (1990). Presentation of immunogens at the gut and other mucosal surfaces, p. 207-227. In WOODROW, G.C. and LEVINE, M.M. (eds.), New Generation Vaccines. **Marcel Dekker, Inc**, New York.
- MADARA, J.L. (1989). Loosening tight junctions-lessons from the intestine. **J. Clin. Invest.** **83**: 1089-1094.
- MANNING, P.A., PUGSLEY, A.P. and REEVES, P. (1977). Defective growth functions in mutants of *Escherichia coli* lacking a major outer membrane protein. **J. Mol. Biol.** **116**:285-300.
- MANNING, P.A., STROEHER, U.H., and MORONA, R. (1994). Molecular basis for O-antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba switching, p. 77-94. In WACHSMUT, I.K., BLAKE, P. and OLSVIK, O (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.
- MANOIL, C. and BECKWITH, J. (1985). *TnphoA*: a transposon probe for the protein export signals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**: 8129-8133.
- MARCHLEWICZ, B.A. and FINKELSTEIN, R.A. (1983). Immunologic differences among the cholera/coli family of enterotoxins. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** **1**:129.
- MATHIAS, J.R., CARLSON, G.M., DiMARIANO, A.J., BERTIGER, G., MORTON, H.E. and COHEN, S. (1976). Intestinal myoelectric activity in response to live *Vibrio cholerae* and cholera enterotoxin. **J. Clin. Invest.** **58**: 91-96.

- McCARDELLI, B., MADDEN, J.M. and SHAH, D.B. (1985). Isolation and characterization of a cytotoxicity produced by *Vibrio cholerae* serogroup non-O1. **Can. J. Microbiol.** **31**: 711-720.
- McNEILL, W.H. (1976). Plagues and people, p.261-267. **Anchor Press/Doubleday**, Garden City, N.Y.
- MEKALANOS, J.J. (1983). Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. **Cell** **35**: 253-263.
- MEKALANOS, J.J. (1985). Cholera toxin: genetic analysis, regulation, and role in pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **118**: 97-118.
- MEKALANOS, J.J., COLLIER, R.J., ROMIG, W.R. (1979). The enzymatic activity of cholera toxin. I. New method of assay and the mechanism of ADP-ribosyl transfer. **J. Biol. Chem.** **254**:5849.
- MEKALANOS, J.J., COLLIER, R.J., ROMIG, W.R. (1979). the enzymatic activity of cholera toxin. II. Relationships to proteolytic processing, disulfide bond reduction, and subunits composition. **J. Biol. Chem.** **254**:5855.
- MEKALANOS, J.J., SUBLETT, R., ROMIG, W.R. (1979). genetic mapping of toxin regulatory mutations in *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **139**:859.
- MEKALANOS, J.J., SWARTZ, D.J., PEARSON, G.D.N., HARFORD, N., GROVNE, F. and de WILDE, M. (1983). Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. **Nature** **306**:551.
- MEKALANOS, J.J., MURPHY, J.R. (1980). Regulation of cholera toxin production in *Vibrio cholerae*: Genetic analysis of phenotypic instability in hypervirulent mutants. **J. Bacteriol.** **141**:570.
- MICHALSKI, J., GALEN, J., FASANO, A. and KAPER, J.B. (1993). *Vibrio cholerae* CVD110: a live oral attenuated El Tor vaccine strain. **Infect. Immun.** **61**: 4462-4468.
- MICHALSKI, J. and KAPER, J.B. (1993). Unpublished data. (UnPub).
- MILLER, J.F., MEKALANOS, J.J. and FALKOW, S. (1989). Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. **Science** **243**: 916-922.
- MILLER, V.L. and MEKALANOS, J.J. (1984). Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **81**:3471.
- MILLER, V.L. and MEKALANOS, J.J. (1985). Genetic analysis of the cholera toxin-positive regulatory gene *toxR*. **J. Bacteriol.** **163**(2): 580-585

- MILLER, V.L. and MEKALANOS, J.J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. **J. Bacteriol.** **170**(6):2575-2583.
- MILLER, V.L., TAYLOR, R.K., MEKALANOS, J.J. (1987). Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. **Cell** **48**:271.
- MILLER-PODRAZA, H., BRADLEY, R.M. and FISHMAN. (1982). Biosynthesis and localization of gangliosides in cultured cells. **Biochemistry** **21**: 3260-3265.
- MOMEN, H. and SALLES, C.A. (1985). Enzyme markers for *Vibrio cholerae*: identification of classical, El Tor and enviromental strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **79**: 773-776
- MORRIS, J.G. and BLACK, R.E. (1985). Cholera and other vibrioses in the United States. **N. Engl. J. med.** **312**: 343-350.
- MORRIS, J.G., Jr. (1990). Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an ocasional pathogen. **Epidemiol. Rev.** **12**: 179-191.
- MORRIS, J.G., Jr., WILSON, R., DAVIS, B.R., WACHSMUTH, I.K., RIDDLE, C.F., WATHEN, H.G., POLLARD, R.A. and BLAKE, P.A. (1981). Non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in the United States. **Ann. Intern. Med.** **94**: 656-658.
- MOSELEY, S.L. and FALKOW, S. (1980). Nucleotide sequence homology between the heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **144**: 444-446.
- MOSS, J. and VAUGHAN, M. (1977). Mechanism of action of choleraen. Evidence for DP-ribosyl transferase activity with arginine as an acceptor. **J. biol. Chem.** **252**:2455.
- MOSS, J. and VAUGHAN, M. (1991). Activation of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins by ADP-ribosylation factors, a family of 20-kDa guanine nucleotide-binding proteins. **Mol. Microbiol.** **5**: 2621-2627.
- MUKERJEE, S. (1963). Bacteriophage typing of cholera. **Bull. W. H. O.** **28**: 337-345.
- MUNOZ, E., ZUBIAGA, A.M., MERROW, M., SAUTER, N.P., and HUBER, B.T. (1990). Cholera toxin discriminates between T helper 1 and T helper 2 cells in T cell receptor mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. **J. Exp. Med.** **172**: 95-103.
- NÁKASONE, N., and IWANAGA, M. (1990). Pili of *Vibrio cholerae* non-O1. **Infect. Immun.** **58**: 1640-1646.

- NAMBIAR, M.P., ODA, T., CHEN, C., KUWARUZU, Y. and WU, H.C. (1993). Involvement of the Golgi region in the intracellular trafficking of cholera toxin. **J. Cell. Physiol.** **154**: 222-228.
- NATH, G. and SANYAL, S.C. (1992). Emergence of *Vibrio cholerae* O1 resistant to vibriostatic agent 0/129. **Lancet** **340**: 366-367.
- NILSSON, O., CASSUTO, J., -P., LARSSON, A., JODAL, M., LIDBERG, P., AHLMAN, H., DAHLSTRÖM, A., and LUNDGREN, O. (1983). 5-Hydroxytryptamine and cholera secretion: a histochemical and physiological study in cats. **Gut** **24**: 542-548.
- NISHIBUCHI, M., FASANO, A., RUSSELL, R.G. and KAPER, J.B. (1992). Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. **Infect. Immun.** **60**: 3539-3545.
- O'BRIEN, A.D., CHEN, M.E., HOLMES, R.K., KAPER, J., and LEVINE, M.M. (1984). Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. **Lancet** **i**: 77-78.
- O'BRIEN, A.D. and KAPRAL, F.A. (1976). Increased cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content in guinea pig ileum after exposure to *Staphylococcus aureus* delta-toxin. **Infect. Immun.** **13**: 152-162.
- OGAWA, A., KATO, J-I., WATANABE, H., NAIR, B.G. and TAKEDA, T. (1990). Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from a patient with traveler's diarrhea. **Infect. Immun.** **58**: 3325-3329.
- OGIERMAN, M.A. and MANNING, P.A. (1992). Homology of TcpN, a putative regulatory protein of *Vibrio cholerae*, to the AraC family of transcriptional activators. **Gene** **116**: 93-97.
- OGIERMAN, M.A. and MANNING, P.A. (1992). TCP pilus biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Gene sequence of *tcpC* encoding an outer membrane lipoprotein. **FEMS Microbiol. Lett.** **97**: 179-184.
- OGIERMAN, M.A., ZABIHI, S., MOURTZIOS, L. and MANNING, P.A. (1993). Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae*. **Gene** **126**: 51-60.
- OSEK, J., SVENNERHOLM, A.-M., and HOLMGREN, J. (1992). Protection against *Vibrio cholerae* El Tor infection by specific antibodies against mannose-binding hemmagglutinin pili. **Infect. Immun.** **60**: 4961-4964.

- OWEN, R.L., PIERCE, N.F., APPLE, R.T. and CRAY, W.C., Jr. (1986). M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: A mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. **J. Infect. Dis.** **153**: 1108-1118.
- PACINI, F. (1854). Del processo morboso del colera asiatica. Firenze. *Cited in* N. oward-jones, 1972. Choleranomalies: the unhistory of medicine as exemplified by cholera. **Perspect. biol. Med.** **15**:422.
- PAL, S.C. (1992). Laboratory diagnosis, p. 229-251. In BARUA, D. and GREENOUGH, W.B., III (eds.), Cholera. Plenum Medical Book Co., New York.
- PARSOT, C. and MEKALANOS, J.J. (1990). Expression of ToxR, the transcriptional activator of the virulence factors in *Vibrio cholerae*, is modulated by the heat shock response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **87**: 9898-9902.
- PARSOT, C., TAXMAN, E. and MEKALANOS, J.J. (1991). ToxR regulates the production of lipoproteins and the expression of serum resistance in *Vibrio cholerae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **88**: 1641-1645.
- PATTI, M.J., ALLEN, B.L., MCGAVIN, M.J. and HÖÖK, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol.** **48**: 585-617.
- PEARSON, G.D., DIRITA, V.J., GOLDBERG, M.B., BOYKO, S.A., CALDERWOOD, S.B. and MEKALANOS, J.J. (1990). New attenuated derivatives of *Vibrio cholerae*. **Res. Microbiol.** **141**: 893-899.
- PEARSON, G.D. and MEKALANOS. 1982. Molecular cloning of *Vibrio cholerae* enterotoxin genes in *Escherichia coli* K12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **79**: 2976-2980.
- PEARSON, G.D.N., WOODS, A., CHIANG, S.L. and MEKALANOS, J.J. (1993). CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **90**: 3750-3754.
- PEEK, J.A. and TAYLOR, R.K. (1992). Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors in *Vibrio cholerae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 6210-6214.
- PETERSON, J.W., HEJTMANCIK, K.E., MARKEL, D.E., CRAIG, J.P. and KUROSKY, A. (1979). Antigenic specificity of neutralizing antibody to cholerae toxin. **Infect. Immun.** **24**: 774-779.
- PETERSON, J.W. and OCHOA, L.G. (1989). Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. **Science** **245**: 857-859.

- PETERSON, J.W., REITMEYER, J.C., JACKSON, C.A. and ANSARI, A.S. (1991). Protein synthesis is required for cholera toxin-induced stimulation of arachidonic acid metabolism. **Biochim. Biophys. Acta** **1092**: 79-84.
- PETERSON, K.M., MEKALANOS, J.J. (1988). Characterization of the *Vibrio cholerae* *toxR* regulon: Identification of novel genes involved in intestinal colonization. **Infect. Immun.** **56**:2822.
- PIERCE, N.F. (1973). Differential inhibitory effects of cholera toxoids and ganglioside on the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **J. Exp. Med.** **137**: 1009-1023.
- PIERCE, N.F., KAPER, J.B., MEKALANOS, J.J. and CRAY, W.C. (1985). Role of cholera toxin in enteric colonization by *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. **Infect. Immun.** **50**: 813-816.
- POHLNER, J., MEYER, T.F., JALAJAKUMARI, M.B. and MANNING, P.A. (1986). Nucleotide sequence of *ompV*, the gene for a major *Vibrio cholerae* outer membrane protein. **Mol. Gen. Genet.** **205**: 494-500.
- POLITZER, R. (1959). Cholera. **World Health Organization**, Geneva.
- POPOVIC, T., BOPP, C., OLSVIK, O. and WACHSMUTH, K. 1993. Epidemiologic application of a standardized ribotype for *Vibrio cholerae* O1. **J. Clin. Microbiol.** **31**: 2472-2482.
- POPOVIC, T., FIELDS, P.I. and OLSVIK, O. (1994). Detection of cholera toxin genes, p. 41-52. In WACHSMUTH, I.K., BLAKE, P.A. and OLSVIK, O. (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.
- PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE. (1993). *Vibrio cholerae* O139 and epidemic cholera. **Commun. Dis. Rep. Wkly.** **38**.
- RABBANI, G.H. (1986). Cholera. **Clin Gastroenterol.** **15**: 507-528.
- RAHMAN, M., SACK, D.A., WADOOD, A., YASMIN, M. and LATIF, A. (1989). Rapid identification of *Vibrio cholerae* serotype O1 from primary isolation plates by a coagglutination test. **J. Med. Microbiol.** **28**: 39-41
- RAMAMURTHY, T., BHATTACHARYA, S.K., UESAKA, Y., PAUL, M., SEN, D., PAL, S.C., TAKEDA, T. and NAIR, G.B. (1992). Evaluation of the bead enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cholera toxin directly from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.** **30**: 1783-1786.

- RAMAMURTHY, T., GARG, S., SHARMA, R., BHATTACHARYA, S.K., BALAKRISHN, G., NAIR, G.B., SHIMADA, T., TAKEDA, T., KARASAWA, T., KURAZANO, H., PAL, A. and TAKEDA, Y. (1993). Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. **Lancet** **341**: 703-704.
- RAMAMURTHY, T., PAL, A., BAG, P.K., BHATTACHARYA, S.K., NAIR, G.B., KUROZANO, H., YAMASAKI, S., SHIRAI, H., TAKEDA, T., UESAKA, Y., HORIGOME, K. and TAKEDA, Y. (1993). Detection of cholerae toxin gene in stool specimens by polymerase chain reaction: Comparison with bead enzyme-linked immunosorbent assay and culture method for laboratory diagnosis of cholera. **J. Clin. Microbiol.** **31**: 3068-3070.
- RAMAMURTHY, T., PAL, A., PAL, S.C. and BALAKRISHN NAIR, G. (1992). Taxonomical implications of the emergence of high frequency of occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine-resistant strains of *Vibrio cholerae* from clinical cases of cholera in Calcutta, India. **J. Clin. Microbiol.** **30**: 742-743.
- REDMOND, J.W. (1979). The structure of the O-antigenic side chain of the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* 569B (Inaba). **Biochim. Biophys. Acta.** **584**: 346-352.
- REITMEIER, R.A. and BRAGG, P.D. (1974). Purification and characterization of a heat-modifiable protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** **41**:195-198.
- REITMEYER, J.C. and PETERSON, J.W. (1990). Stimulatory effects of cholera toxin on arachidonic acid metabolism in Chinese hamster ovary cells. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med.** **193**: 181-184.
- RHINE, J.A. and TAYLOR, R.K. (1994). TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae*. **Molec. Microbiol.** in press
- RICHARDSON, K., KAPER, J.B. and LEVINE, M.M. (1989). Human immune response to *Vibrio cholerae* O1 whole cells and isolated outer membrane antigens. **Infect. Immun.** **57**(2):496-501.
- RICHARDSON, K., MICHALSKI, J. and KAPER, J.B. (1986). Hemolysin production and cloning of two hemolysin determinants from classical *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **54**: 415-420.
- RICHARDSON, K. and PARKER, C.D. (1985). Identification and occurrence of *Vibrio cholerae* flagellar proteins in isolated outer membrane. **Infect. Immun.** **47**: 674-679.
- RICHARDSON, S.H. (1969). Factors influencing in vitro skin permeability factor production by *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **100**: 27-34.

- RODMAN, D.M. and ZAMUDIO, S. (1991). The cystic fibrosis heterozygote-advantage in surviving cholera? **Med. Hypoth.** **36**: 253-258.
- ROSENBERG, C.E. (1962). The cholera years. The University of Chicago. Chicago. IL, USA.
- SACK, R.B. and BARUA, D. (1965). The fluorescent antibody technique in the direct examination of cholera stool, p. 50-56. In Proceedings of the Cholera Research Symposium (Jan 24-29, 1965, Honolulu). US Government Printing Office, Washington, D.C.
- SACK, R.B. and MILLER, C.E. (1969). Progressive changes of vibrio serotypes in germ-free mice infected with *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **99**: 688-695.
- SAHA, S. and SANYAL, S.C. (1988). Cholera toxin-gene positive *Vibrio cholerae* O1 Ogawa and Inaba strains produce the new cholera toxin. **FEMS Microbiol. Lett.** **50**: 113-116.
- SAHA, S. and SANYAL, S.C. (1990). Immunobiological relationships of the enterotoxins produced by cholera toxin gene-positive (CT⁺) and -negative (CT⁻) strains of *Vibrio cholerae* O1. **J. Med. Microbiol.** **32**: 33-37.
- SAKAZAKI, R. (1992). Bacteriology of *Vibrio* and related organisms, p. 37-55. In BARUA, D. and GREENOUGH, W.B., III (eds.), Cholera Plenum Medical Book Co., New York.
- SAKAZAKI, R. and SHIMADA, T. (1977). Serovars of *Vibrio cholerae*. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.** **30**: 279-282.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F. and MANIATIS, J. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, Second edition.
- SACHEZ, J., JOHANSSON, S., LOWENADLER, B., SVENNERHOLM, A.M. and HOLMGREN, J. (1990). Recombinant cholera Toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. **Res. Microbiol.** **141**: 971-979.
- SANGER, F.S., NICKECEN, S. and COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **74**:5463
- SANYAL, S.C., ALAM, K., NEOGI, P.K.B., HUQ, M.I. and AL-MAHMUD, K.A. (1983). A new cholera toxin. **Lancet** **i**: 1337.
- SCHÖDEL, F., WILL, H., JOHANSSON, S. and HOLMGREN, J. (1991). Synthesis in *Vibrio cholerae* and secretion of hepatitis B virus antigens fused to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin subunit B. **Gene** **99**: 255-259.
- SCIORTINO, C.V. and FINKELSTEIN, R.A. (1983). *Vibrio cholerae* expresses iron-regulated outer membrane proteins in vivo. **Infect. Immun.** **42**: 990-996.

- SEARS, S.D., RICHARDSON, K., YOUNG, C., PARKER, C.D. and LEVINE, M.M. (1984). Evaluation of the human immune response to outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. **Infect. immun.** **44(2)**:439-444.
- SELANDER, R.K., CAUGANT, D.A., OCHMAN, H., MUSSER, J.M., GILMOUR, M.N. and WHITTAM, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.** **51**: 873-884.
- SENGUPTA, D., DATTA-ROY, K., BANERJEE, K. and GHOSE, A.C. (1989). Identification of some antigenically related outer membrane proteins of strains of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 serovars involved in intestinal adhesion and the protective role of antibodies to them. **J. Med. Microbiol.** **29**:33-39.
- SENGUPTA, D.K., SENGUPTA, T.K. and GHOSE, A.S. (1992). Major outer membrane proteins of *vibrio cholerae* and their role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization. **Infect. Immun.** **60(11)**:4848-4855.
- SHAW, C.E. and TAYLOR, R.K. (1990). *Vibrio cholerae* O395 *tcpA* pilin gene sequence and comparison of predicted structural features to those of type 4 pilins. **Infect. Immun.** **58**: 3042-3049.
- SHIMADA, T., NAIR, G.B., DEB, B.C., ALBERT, M.J., SACK, R.B. and TAKEDA, Y. (1993). Outbreak of *Vibrio cholera* non-O1 in India and Bangladesh. **Lancet** **341**: 1347.
- SHIMADA, T. and SAKAZAKI, R. (1973). R antigen of *Vibrio cholerae*. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.** **26**: 155-160.
- SHINODA, S., KARIYAMA, R., OGAWA, M., TAKEDA, Y. and MIWATANI, T. (1976). Flagellar antigens of various species of the genus *Vibrio* and related genera. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **26**: 97-101.
- SHIRAI, H., NISHIBUCHI, M., RAMAMURTHY, T., BHATTACHARYA, S.K., PAL, S.C. and TAKEDA, Y. (1991). Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. **J. Clin. Microbiol.** **29**: 2517-2521.
- SIDDIQUE, A.K., BAQUI, A.H., EUSOF, A., HAIDER, K., HOSSAIN, M.A., BASHIR, I. and ZAMAN, K. (1991). Survival of classic cholera in Bangladesh. **Lancet** **337**: 1125-1127.
- SIGEL, S.P. and PAYNE, S.M. (1982). Effect of iron limitation on growth, siderophore production, and expression of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **150**: 148-155.
- SIGEL, S.P., STOEBNER, J.A. and PAYNE, S.M. (1985). Iron-vibriobactin transport system is not required for virulence of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun** **47**: 360-362.

- SIMONSON, J.G. and SIEBELING, R.J. (1988). Coagglutination of *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio vulnificus* with anti-flagellar monoclonal antibody. **J. Clin. Microbiol.** **26**: 1962-1966.
- SINHA, V.B., JACOB, A., SRIVASTAVA, R., KAPER, J.B. and SRIVASTAVA, B.S. (1993). Identification of the flagellar antigens of *Vibrio cholerae* El Tor and their role in protection. **Vaccine** **11**: 372-375.
- SIXMA, T.K., PRONK, S.E., KALK, K.H., WARTNA, E.S., van ZANTEN, B.A.M., WITHOLT, B. and HOL, W.G.J. (1991). Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. **Nature** **351**: 371-377.
- SJÖQVIST, A., CASSUTO, J., JODAL, M. and LUNDGREN, O. (1992). Actions of serotonin antagonism on cholera-toxin-induced intestinal fluid secretion. **Acta. Physiol. Scand.** **145**: 229-237.
- SNOW, J. (1855). On the mode of communication of cholera. 2nd edn. London, UK.
- SPANGLER, B.D. (1992). Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.** **56**: 622-647.
- SPEELMAN, P., RABBANI, G.H., BUKHAVE, K. and RASK-MADEN, J. (1985). Increased jejunal prostaglandin E₂ concentrations in patients with acute cholera. **Gut** **26**: 188-193.
- SPIRA, W.M., SACK, D.A., FEDORKA-CRAY, P.J., SANYAL, S., MADDEN, J. and McCARDELL, B. (1986). Description of a possible new extracellular virulence factor in non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1, p. 263-270. In KUWAHARA, S. and PIERCE, N.F. (eds.), *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*, vol. 3. KTK. **Scientific Publishers**, Tokyo.
- ST.GEME, J.W., III. (1994). The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. **Infect. Immun.** **62** (9): 3881-1889.
- STAERK, J., RONNEBERGER, H.J. and WIEGANDT, H. (1974). Neuraminidase, a virulence factor in *Vibrio cholerae* infection? **Behring Inst. Mitt.** **55**: 145-146.
- STOEBNER, J.A., BUTTERTON, J.R., CALDERWOOD, S.B. and PAYNE, S.M. (1992). Identification of the vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **174**: 3270-3274.
- STOEBNER, J.A. and PAYNE, S.M. (1988). Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** **56**: 2891-2895.

- STROEHER, U.H., KARAGEORGOS, L.E., MORONA, R. and MANNING, P.A. (1992). Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 2566-2570.
- SUN, D., MEKALANOS, J.J. and TAYLOR, R.K. (1990). Antibodies directed against the toxin-coregulated pilus isolated from *Vibrio cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. **J. Infect. Immun.** **161**:1231-1236.
- SUN, D., TILLMAN, M., MARION, T.N. and TAYLOR, R.K. (1990). Production and characterization of monoclonal antibodies to the toxin-coregulated pilus (TCP) of *Vibrio cholerae* that protect against experimental cholerae in infant mice. **Serodiag. Immunother. Infect. Dis.** **4**: 73-81.
- SVENNERHOLM, A. -M, and HOLMGREN, J. (1978). Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (G_{M1}-ELISA) procedure. **Current. Microbiol.** **1**: 19-23.
- SVENNERHOLM, A.-M and HOLMGREN, J. (1986). Oral combined B subunit-whole cell cholera vaccine, p. 33-43. In HOLMGREN, J., LINDBERG, A. and MÖLBY, R (eds.), Development of Vaccines and Drugs against Diarrhea. 11th Nobel Conf., Stockholm 1985. Studentlitteratur, Lund, Sweden.
- SVENNERHOLM, A.-M, STROMBERG, G.J. and HOLMGREN, J. (1983). Purification of *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin and development of enzyme-linked immunosorbent assays for antigen and antibody quantitations. **Infect. Immun.** **41**: 237-243.
- SWEDLOW, D.L. and RIES, A.A. (1993). *Vibrio cholerae* non-O1-The eight pandemic? **Lancet** **342**: 382-383.
- TACKET, C.O., CLEMENTS, J. and KAPER, J.B. (1992). Cholera vaccines, p. 53-68. In ELLIS, R.W. (ed.), Vaccines: New Approaches to Immunological Problems. **Butterworth**, Boston.
- TACKET, C.O., FORREST, B., MORONA, R., ATTRIDGE, S.R., LaBROOY, J., TALL, B.D., REYMANN, M., ROWLEY, D. and LEVINE, M.M. (1990). Safety, immunogenicity, and efficacy against cholera challenge in humans of a typhoid-cholera hybrid vaccine derived from *Salmonella typhi* Ty21a. **Infect. Immun.** **58**: 1620-1627.
- TACKET, C.O., LOSONSKY, G., NATARO, J.P., CRYZ, S.J., EDELMAN, R., FASANO, A., MICHALSKY, J., KAPER, J.B. and LEVINE, M.M. (1993). Safety, immunogenicity, and transmissibility of live oral cholera vaccine candidate CVD110, a δ tactxA δ ta α ot δ taace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. **J. Infect. Dis.** **168**: 1536-1540.
- TACKEYA, K.T., OTOHUI, T. and TOKIWA, H. (1981). FK phage for differentiating the classical and El Tor groups of *Vibrio cholerae*. **J. Clin. Microbiol.** **14**: 222-224.

- TAMPLIN, M.L., COWELL, R.R., HALL, S., KOGURE, K. and STRICHARTZ, G.R. (1987). Sodium-channel inhibitors produced by enteropathogenic *Vibrio cholerae* and *Aeromonas hydrophila*. **Lancet** **i**: 975.
- TAYLOR, R.K. (1989). Genetic studies of enterotoxin and other potential virulence factors of *Vibrio cholerae*. In HOPWOOD, D.A. and CHATER, K.F. (eds.), Genetics of Bacterial Diversity, **Academy Press**, London, pp309-329.
- TAYLOR, R.C., MANOIL, C. and MEKALANOS, J.J. (1989). Broad-Host-Range vectors for delivery of *TnphoA*: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **171**: 1870-1878.
- TAYLOR, R.C., MILLER, V.L., FURLONG, D.B., MEKALANOS, J.J. (1987). Use of *phoA* gene fusion to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**:2833.
- TAYLOR, R., SHAW, C., PETERSON, K. SPEARS, P. and MEKALANOS, J.J. (1988). Safe, live *Vibrio cholerae* vaccines? **Vaccine** **6**: 151-154.
- TERAI, A., BABA, K., SHIRAI, H., YOSHIDA, O., TAKEDA, Y. and NISHIBUSHI, M. (1991). Evidence for insertion-sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysis gene among *Vibrio* species. **J. Bacteriol.** **173**: 5036-5046.
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T. and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **76**:4350.
- TRUCKSIS, M., GALEN, J.E., MICHALSKI, J., FASANO, A. and KAPER, J. (1993). Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third member of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**.
- TWEEDY, J.M., PARK, R.W.A. and HODGKISS, W. (1968). Evidence for the presence of fimbriae (pili) on *Vibrio cholerae* species. **J. Gen. Microbiol.** **51**: 235-244.
- VAN HEYNINGEN, W.E., CARPENTER, C.C.J., PIERCE, N.F., GREENOUGH, W.B. (1971). Deactivation of cholera toxin by ganglioside. **J. Infect. Dis.** **124**:415.
- VARELA, P., RIVAS, M., BINZTEIN, N., CREMONA, M.L., HERRMANN, P., BURRONE, O., UGALDE, R.A. and FRASH, A.C.C. (1993). Identification of toxigenic *Vibrio cholerae* from the Argentine outbreak by PCR for *ctx A1* and *ctx A2-B*. **FEBS. Lett.** **315**: 74-76.
- VOSS, E. and ATTRIDGE, S.R. (1993). *In vitro* production of toxin-correlated pili by *Vibrio cholerae* El Tor. **Microbial Pathogen.** **15**: 255-268.

- WACHSMUTH, K., OLSVIK, O., EVINS, G.M. and POPOVIC, T. (1994). Molecular epidemiology of cholera, p. 357-370. In WACHSMUTH, I.K., BLAKE, P.A. and OLSVIK, O. (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives. ASM Press, Washington, D.C.
- WRIGHT, A.C., GUO, Y., JOHNSON, J.A., NATARO, J.P. and MORRIS, J.G., Jr. (1992). Development and testing of a nonradioactive DNA oligonucleotide probe that is specific for *Vibrio cholerae* cholera toxin. **J. Clin. Microbiol.** **30**: 2302-2306.
- YAMAMOTO, K., ICHINOSE, Y., NAKASONE, N., TANABE, M., NAGAHAMA, M., SAKURAI, J. and IWANAGA, M. (1986). Identity of hemolysins produced by *Vibrio cholerae* non-O1 and *Vibrio cholerae* O1, biotype El Tor. **Infect. Immun.** **51**: 927-931.
- YAMAMOTO, K., ICHINOSE, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., NAKATA, A., IWANAGA, M., HONDA, T. and MIWATANI, T. (1990). Two-step processing for activation of the cytolysis/hemolysis of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural sequence of the structural gene (*hlyA*) and characterization of the processed products. **Infect. Immun.** **58**: 4106-4116.
- YAMAMOYO, K., KAMANO, T., UCHIMURA, M., IWANAGA, M. and YOKOTA, T. (1988). *Vibrio cholerae* O1 adherence to vili and lymphoid follicle epithelium: in vitro model using formalin-treated human small intestine and correlation between adherence and cell associated hemagglutinin levels. **Infect. Immun.** **56**: 3241-3250.
- YAMAMOTO, T., ALBERT, J.M. and SACK, B.R. (1994). Adherence to human small intestines of capsulated *Vibrio cholerae* O139. **FEMS Microbiol Lett** **11**: 229-236.
- YAMAMOTO, T., TAMURA, T. and YOKOTA, T. (1984). Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for humans. **J. Biol. Chem.** **259**: 5037-5044.
- YAMAMOTO, T. and YOKOTA, T. (1983). Sequence of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* pathogenic for humans. **J. Bacteriol.** **155**: 728-733.
- YAMAMOTO, T. and YOKOTA, T. (1988). Electron microscopic study of *Vibrio cholerae* O1 adherence to the mucus coat and villus surface in the human small intestine. **Infect. Immun.** **56**: 2753-2759.
- YAMAMOTO, T. and YOKOTA, T. (1989). *Vibrio cholerae* O1 adherence to human small intestinal M cells in vitro. **J. Infect. Dis.** **160**: 168-169.
- YO, M., MIYAGI, K., MATSUMOTO, Y., HAYASHI, K., TAKARADA, Y., YAMAMOTO, K. and HONDA, T. (1993). Development of an enzyme-labeled oligonucleotide probe for the cholera toxin gene. **J. Clin. Microbiol.** **31**: 1312-1314.

YU, J., WEBB, H. and HIRST, T.R. (1992). A homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol. 6:** 1949-1958.