

## RESEÑA ANALÍTICA

# *Vibrio cholerae* O139: Surgimiento, evolución y estructura genética de CTX $\Phi$

Talena Ledón, Javier Campos, Edith Suzarte, Karen Marrero, Boris Luis Rodríguez, Arlenis Moreno, Caridad Urra y Rafael Fando.

Departamento de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. \*Correo electrónico:

talena.ledon@cnic.edu.cu

Recibido: 10 de enero de 2006. Aceptado: 27 de noviembre de 2006.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, O139, CTX $\Phi$ , *RstR*, precursor de CTX

Key words: *Vibrio cholerae*, O139, CTX , CTX precursor, *RstR*.

**RESUMEN.** El surgimiento de *Vibrio cholerae* O139 Bengal entre 1992 y 1993 estuvo asociado con grandes brotes epidémicos en la India y Bangladesh. En un inicio, estas cepas lograron desplazar a las de *Vibrio cholerae* O1 circulantes, responsables hasta ese momento de los casos de cólera reportados. No obstante, los vibrios O1 emergieron nuevamente en 1994 y se iniciaron ciclos de mayor y menor incidencia de *Vibrio cholerae* O139. Esta intermitencia epidemiológica se ha relacionado con cambios genéticos y fenotípicos en las cepas de *Vibrio cholerae* O139. El análisis genético molecular del polimorfismo de los fragmentos de restricción ha sido una herramienta muy útil para estudiar los cambios mencionados anteriormente. Estos estudios apuntan a la existencia de una diversidad clonal entre las cepas O139, lo cual se revela en las diversas estructuras en que se presenta el fago CTX $\Phi$  en el genoma de estas cepas, las cuales incluyen cambios en el número de copias, en la localización en el genoma y en la propia estructura de CTX $\Phi$ . En este trabajo se hace una revisión de la información disponible sobre este tema y se reporta la estructura genética de CTX $\Phi$  en cepas de reciente aislamiento de la India, en las cuales existen copias de CTX $\Phi$  intactas y carentes de toxina colérica coexistiendo en la misma cepa. Las copias de CTX $\Phi$  ctx-negativas pertenecen a los tipos Calcuta y El Tor y pudieran considerarse precursores de ambas clases de CTX $\Phi$ , respectivamente. Un análisis comparativo entre parte de la secuencia de ellos y lo reportado por otros autores, indicó diferencias en sus orígenes. Las cepas analizadas poseen además, copias diferentes de CTX $\Phi$  con el mismo grupo de inmunidad. En el artículo se discute la implicación de este hecho sobre el concepto de heteroinmunidad y en el diseño de vacunas.

**ABSTRACT.** The emergence of *Vibrio cholerae* O139 Bengal during 1992-1993 was associated with large epidemics of cholera in India and Bangladesh, and initially, with a total displacement of the existing *Vibrio cholerae* O1 strains. However, the O1 strains reemerged in 1994 and initiated a series of disappearance and re-emergence of either of the two serogroups that were associated with temporal changes sustained by the strains. Molecular studies using restriction fragment polymorphism analysis of CTX $\Phi$  phage in toxigenic *Vibrio cholerae* O139 have been a useful tool used to study the above mentioned changes. Those studies have shown clonal diversity among the O139 strain and continues emergence of new epidemic clones, reflected by changes in the structure, organization and location of the CTX $\Phi$  prophages in the *Vibrio cholerae* O139 chromosome. Here it was reviewed the available information about this subject and it was reported the finding of two strains from India containing several copies of CTX $\Phi$  with and without cholera toxin coexisting in the same strain. The ctx-gene-negative copies could be considered putative CTX $\Phi$  precursors and they are both types Calcuta and El Tor. Comparative nucleotide sequence analysis revealed certain differences with other reported precursors, suggesting a different origin. The strains here examined, possess CTX $\Phi$  copies of different immunity groups. The implication of this finding in the concept of heteroinnunity and in the vaccine design is discussed.

## INTRODUCCIÓN

*Vibrio cholerae* es el agente causal del cólera, una enfermedad diarreica aguda que se produce en forma de brotes epidémicos que en ocasiones, llegan a convertirse en pandemia.<sup>1</sup> Las especies de *Vibrio cholerae* se clasifican de acuerdo con sus antígenos somáticos (antígeno O) en diferentes serogrupos. Existen más de 200 serogrupos descritos, pero solo el O1, y más recientemente el O139, han estado asociados a brotes epidémicos de la enfermedad.<sup>2</sup> Desde 1817, se han reportado siete pandemias de cólera, todas ellas, excepto la séptima, fueron asociadas a *Vibrio cholerae* O1 biotipo Clásico.<sup>3</sup> La última ha sido producida por *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor. El surgimiento de este serotipo emergente atrajo la atención mundial de los especialistas ya que luego de su aparición en el golfo de Bengal se expandió por varias regiones de la India y Bangladesh.<sup>2</sup> Posteriormente, se han reportado casos en más de 15 países entre los que se incluyen, Pakistán, Tailandia, China, Malasia y Rusia.<sup>4,5</sup> La aparición de *Vibrio cholerae* O139 constituye una oportunidad única para estudiar los cambios genéticos y epidemiológicos asociados con el surgimiento y la permanencia de un nuevo serogrupo epidémico. El objetivo de esta revisión fue analizar la información disponible sobre el surgimiento de este nuevo serogrupo con potencialidades epidémicas y profundizar en los múltiples cambios genéticos relacionados con la estructura de

CTXΦ en su genoma, así como aportar nuevos elementos que enriquezcan la discusión sobre este tema y sobre el papel que estos resultados recientes pudieran tener en la evolución de CTXΦ y *Vibrio cholerae* O139, así como en el diseño de vacunas.

## ANTECEDENTES

### Surgimiento del serogrupo O139

Desde la identificación por primera vez de cepas de *Vibrio cholerae* O139, Bengal, como causantes de brotes de cólera, en Madras, India, en octubre de 1992,<sup>6</sup> este serogrupo se ha mantenido asociado a las principales epidemias de la enfermedad en áreas endémicas del subcontinente indio. Al principio, las nuevas cepas desplazaron totalmente al serogrupo predominante (*Vibrio cholerae* O1). No obstante, en septiembre de 1993, surgió un nuevo clon de vibrios O1 que desplazó a los O139 en febrero de 1994.<sup>7</sup> Posteriormente, en agosto de 1996, *Vibrio cholerae* O139 reapareció en Calcuta y Bangladesh y se ha mantenido hasta la fecha con alternancia de intervalos de mayor y menor incidencia.<sup>8</sup>

Debido a que este grupo emergente es considerado el único no-O1 capaz de causar brotes epidémicos, inmediatamente después de su identificación, se han realizado diversos análisis comparativos entre cepas de *Vibrio cholerae* O1 y O139 en aras de investigar el origen de este último.<sup>9,10</sup> Los primeros estudios indicaban que las cepas O139 estaban muy relacionadas con las cepas O1, El Tor. Las principales evidencias en este sentido provienen de la identidad entre ellas en análisis epidemiológicos y moleculares como zimovares, ribotipos y electroforesis de campo pulsante.<sup>11,12</sup> Además, las cepas de *Vibrio cholerae* O139 poseen todos los factores de virulencia que normalmente se encuentran en cepas El Tor, como la toxina colérica (CTX) y el pelo coregulado con la toxina (TCP), que son resistentes a polimixina y capaces de aglutinar eritrocitos de pollo. Estas características microbiológicas reafirman el vínculo original entre estos serotipos.<sup>13</sup>

### Origen de *Vibrio cholerae* O139

Existen varias hipótesis referentes a qué mecanismos de transferencia horizontal de genes condujeron al surgimiento de la nueva variante epidémica. Estas hipótesis se basan en el hecho de que la única diferencia esencial entre *Vibrio cholerae* O1 y O139 es que estos últimos son

encapsulados y que los antígenos somáticos O139 incluyen por tanto antígenos O de la cápsula y del lipopolisacárido de superficie (LPS).<sup>14</sup>

El LPS del serogrupo O139 posee un núcleo polisacárido muy sustituido, con muy pocos residuos de azúcares adicionales, que no llegan a constituir una cadena lateral específica. Los vibrios O1 en cambio, tienen un núcleo sustituido por cadenas laterales de hasta diecisiete unidades repetidas de 4-NH<sub>2</sub>-4,6-dideoximanosa, cada una sustituida por un derivado del ácido tetrónico.<sup>15</sup>

La cápsula de *Vibrio cholerae* O139 está formada por un polímero de la unidad que constituye el LPS O139. Estos cambios en los antígenos somáticos determinan que sean vibrios inmunológicamente diferentes.

Los genes responsables de la síntesis del antígeno O están presentes en una zona del genoma denominada *wbf*.<sup>16</sup> Los vibrios O139 pudieron haber evolucionado a partir de algún vibrio de serogrupo no-O1 que adquirió los genes de CTXΦ y con ello, la potencialidad para causar epidemias, o a partir de una cepa O1 con un antígeno-O alterado.

El análisis de las regiones genéticas asociadas a la síntesis del antígeno-O en cepas O1 y O139 ha sugerido como hipótesis más probable que una cepa de *Vibrio cholerae* O1, El Tor sea el ancestro de los actuales vibrios O139 epidémicos.<sup>17-19</sup> El proceso original debió incluir la inserción de un largo fragmento genómico que contenía los genes específicos de *Vibrio cholerae* O139 y la delección simultánea de la mayoría de los genes propios del antígeno O1.

Otros autores han reportado la secuencia nucleotídica de la región *wbf*, responsable de la síntesis del antígeno O y de zonas contiguas a ella.<sup>20-24</sup> Estos estudios revelaron que una región de 22 kb (*wbe*) de los vibrios O1, había sido delecionada en las cepas O139 y estas habían adquirido un fragmento de aproximadamente 35 kb.

Otro punto de discusión es dilucidar cómo llegó ese fragmento foráneo a las cepas El Tor. Este hecho ha sido explicado a través de dos hipótesis. La primera propone que un evento de transposición mediado por el elemento IS1358 reemplazó los genes *wbe* de las cepas O1 por los genes *wbf* de las O139.<sup>25,26</sup> La segunda hipótesis propone que un evento de recombinación homóloga posibilitó el intercambio genético entre las regiones antes mencionadas.

El análisis de las secuencias que se localizan cuesta abajo de la inserción y de los genes flanqueantes a la región del antígeno-O en otros serogrupos mostró que en todos los serogrupos analizados la organización de los genes *wb\** era similar a la de los vibrios O1 y O139, y que estos presentan una organización parecida a un casete, flanqueados por los genes *gmhD* y *rjg*, que constituyen puntos calientes de recombinación. Estos elementos, conjuntamente con el hecho de que en el proceso está involucrado un fragmento de ADN de gran tamaño, soportan la segunda hipótesis e implican que es posible el surgimiento de cepas patógenas pertenecientes a serogrupos no-O1/no-O139 mediante mecanismos similares.<sup>23</sup> De hecho, se han aislado cepas O139, CTX-negativas, TCP-negativas, probablemente originadas a partir de progenitores no-O1, lo que determina la existencia de líneas O139, no epidémicas derivadas de diferentes parentales.<sup>27</sup> El elemento IS1358 que aparece asociado a los genes *wb\** de varios serogrupos de *V. cholerae*, debió ser adquirido por eventos de recombinación más que de transposición, ya que en este último caso, se esperaría una localización más aleatoria en el cromosoma de dicho elemento de inserción.

Diferentes serogrupos no patógenos de *Vibrio cholerae* han sido analizados como posibles donadores del grupo *wbf*.<sup>23,25</sup> Estos estudios comparativos han revelado que la composición de azúcares del LPS de *Vibrio cholerae* O139 es muy similar a la de *Vibrio cholerae* O22. La relación antigénica entre estas cepas ha sido analizada por diversos métodos que indicaron una cercanía antigénica entre estos serogrupos.<sup>28</sup> Además de existir gran homología entre las regiones genéticas responsables de la síntesis de los antígenos O, el contenido de GC de estas zonas es de 29 a 35 %, el cual es menor que el que caracteriza a *Vibrio cholerae* (47 a 48 %).<sup>29,30</sup>

Estos resultados indican que este fragmento pudiera provenir de otra bacteria que no es *V. cholerae*. Todos estos resultados apuntan a que *V. cholerae* O22 es el donador más probable de los genes que codifican para el antígeno de superficie O139.<sup>31</sup>

## CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LOS BROTES DE *Vibrio cholerae*

La enfermedad causada por *V. cholerae* O139 es idéntica a la provo-

cada por *V. cholerae* O1 en cuanto a los síntomas con que se presenta y su severidad. En áreas endémicas, en cambio, el cólera se presenta con mayor frecuencia en niños.<sup>32</sup> Sin embargo, en los brotes iniciales la mayoría de los casos producidos por *V. cholerae* O139 ocurrieron en adultos, lo que sugirió desde un inicio que exposiciones previas al serogrupo O1 no protegía a la población de estas zonas contra el nuevo serogrupo. A pesar de que las cepas emergentes se han mantenido en algunas áreas, como Calcuta y Bangladesh por más de diez años, la tendencia a que la enfermedad por ellas provocada se presente más comúnmente en adultos se ha mantenido.<sup>33</sup>

Una posible explicación pudiera ser que esas poblaciones no hayan estado suficientemente expuestas a *V. cholerae* O139 como para que se indujera inmunidad protectora, o que las cepas de este serogrupo posean mecanismos para evadir la respuesta inmune, como la cápsula, por ejemplo. Es válido señalar que se ha demostrado que, a pesar de la cápsula, *V. cholerae* O139 induce respuesta de células productoras de anticuerpos (ASC) a nivel sistémico e intestinal, aunque su papel en la protección se desconoce.<sup>34</sup>

El patrón de resistencia a antibióticos de las cepas de *V. cholerae* O139 en los últimos diez años ha sido muy variable.<sup>35-37</sup> Estas cepas han mantenido, en general, la susceptibilidad a ciprofloxacina, tetraciclina y gentamicina. En cambio, la resistencia a ampicilina, así como la susceptibilidad a cotrimoxazol, cloranfenicol y estreptomina han variado durante este período. Las cepas de *V. cholerae* O139 que aparecieron en 1992 y 1993 eran sensibles a tetraciclina y resistentes a cotrimoxazol (SXT) y estreptomina. Esta resistencia estaba asociada a la presencia en las cepas de un elemento autotransmisible, como un transposón conjugativo, de 62 kb (elemento SXT) que es capaz de integrarse en el genoma de la cepa portadora mediante un mecanismo independiente de RecA.<sup>35</sup> Las cepas aisladas en Bangladesh en 1997 y posteriormente en la India eran en su mayoría sensibles a SXT y estreptomina.<sup>36,37</sup> Este cambio en el patrón de susceptibilidad a antibióticos está asociado, en este caso, con una delección de aproximadamente 3,6 kb en el elemento SXT de las cepas sensibles.<sup>36</sup> Desde 1997, existe una tendencia al incremento del número de cepas de

*Vibrio cholerae* O139 resistentes a ampicilina y neomicina y sensibles a cloranfenicol y estreptomina.

Estos cambios en el patrón de resistencia a antibióticos ha sido observado también en cepas de *Vibrio cholerae* O1,<sup>38</sup> y se ha asociado fundamentalmente a la movilidad de los elementos genéticos que portan los genes de resistencia. Los cambios en el antibiograma de las cepas pudieran influir en la aparición y predominio de determinados clones.<sup>39</sup>

#### ESTRUCTURA Y ORDENAMIENTO GENÉTICO DE CTXΦ

Los estudios genético-moleculares de *Vibrio cholerae* O1 han sido utilizados como criterio de diferenciación entre los biotipos Clásico y El Tor.<sup>39</sup> En el caso de *Vibrio cholerae* O139, han sido además utilizados por los epidemiólogos para seguir las huellas de los diferentes brotes, teniendo en cuenta la elevada variabilidad genética de este serogrupo. Esto ha permitido la identificación de nuevos clones.

El profago CTXΦ que codifica la toxina colérica está presente en todas las cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae* O139, pero su número de copias y la organización en el genoma han experimentado continuos cambios desde el surgimiento de este serogrupo, conjuntamente con la evolución de un nuevo tipo de fago CTXΦ.<sup>39,40</sup>

Las cepas de *Vibrio cholerae* O139 aisladas en 1992 y 1993 tienen dos copias del profago CTXΦ El Tor (CTX<sup>ET</sup>Φ) conectadas por un elemento RS1 (Fig. 1), mientras que las cepas colectadas en Calcuta en 1996 tienen tres copias del profago CTXΦ en tandem (Fig. 1) y por primera vez, se encontraron cepas que portaban un nuevo tipo de profago, que se denominó CTXΦ Calcuta (CTX<sup>Cal</sup>Φ).<sup>41</sup> Por otra parte, el análisis de la estructura genética de CTXΦ en cepas aisladas posteriormente en la India (año 2000) ha revelado la existencia de una estructura aún más compleja (Fig. 1).

En estudios de *Southern blotting* realizados en el laboratorio de los autores, se utilizaron varias enzimas de restricción y sondas específicas que reconocen los genes de CTX (CTAB), otros genes de CTXΦ (core) y el elemento RS1 (RS).<sup>37</sup> Estos estudios revelaron que el patrón observado con la sonda core difiere de lo obtenido con la sonda CTAB. De acuerdo con la estructura de CTXΦ el número de copias de *ctxAB* debía

ser idéntico al del resto de los genes de CTXΦ (core). Sin embargo, los resultados publicados por Ledón y colaboradores<sup>37</sup> indican que en las cepas analizadas coexisten copias de CTXΦ con y sin CTX (Fig. 1). Se debe resaltar el hecho de que sin considerar las copias atoxigénicas de CTXΦ, el resto de la estructura de estas cepas se corresponde con lo reportado para cepas posteriores a 1996.<sup>38</sup>

El número de copias de CTXΦ en las cepas O139 ha mostrado también gran variación. Existen reportes de aislamientos con dos copias de CTXΦ El Tor en 1992, pero en ese mismo período, se han reportado cepas que portan una sola copia de este profago.<sup>42</sup> Asimismo, en 1998 se aislaron en Calcuta cepas que poseían desde unas hasta tres copias de CTXΦ, en las que se describen fagos tanto CTXΦ El Tor como CTXΦ Calcuta.<sup>43</sup>

También se han reportado variaciones en la localización física de estas copias de CTXΦ en el genoma de *Vibrio cholerae*, teniendo en cuenta el polimorfismo en los fragmentos de restricción que contienen los genes de CTX (RFLP), este tipo de estudio ha sido realizado por varios autores y solo se han descrito dos posibles sitios de inserción de CTXΦ en el genoma de *Vibrio cholerae*, los *dif*, los cuales se ubican uno en cada cromosoma.<sup>43,44</sup> De acuerdo con los resultados obtenidos en el laboratorio de los autores, las cepas por ellos analizadas poseen todas las copias de CTXΦ en el cromosoma 1.<sup>37</sup>

La existencia de fagos similares a CTXΦ, pero que no portan los genes de CTX (pre-CTXΦ) ha sido descrita anteriormente.<sup>45</sup> En ese estudio se plantea que dichos fagos pueden haber sido precursores de CTXΦ que adquirieron los genes de CTX mediante un mecanismo de transferencia horizontal, en el que se desconoce el donador. Esta hipótesis se basa fundamentalmente en el hecho de que el contenido de GC en *ctxAB* es diferente al del resto de los genes de CTXΦ, lo que sugiere que evolucionaron separadamente. Además, CTX no juega ninguna función en la fisiología del fago, de hecho, los precursores CTXΦ descritos son completamente funcionales.<sup>45</sup>

Luego de dilucidar la estructura de CTXΦ en las cepas CRC262 y CRC266, los autores realizaron un análisis de la capacidad infectiva del profago pre-CTXΦ encontrado. Para este estudio se infectó la cepa de *V. cholerae* biotipo Clásico 569b con el sobrenadante de las cepas a analizar.

La cepa receptora utilizada (569b) fue incapaz de inducir CTXΦ desde su genoma. Se comprobó la existencia de forma replicativa (RF) de CTXΦ en el citoplasma de las cepas receptoras infectadas. Se digirió con la enzima *SphI*, que corta solo una vez el profago CTXΦ, y se evidenció que estas poseían menor peso molecular (5,4 kb) que la proveniente de la cepa *Vibrio cholerae* C7258 (6,9 kb), utilizada como control positivo (Fig. 2, panel A, carrilera 2).

Para conocer la naturaleza de los profagos atenuados presentes en estas cepas, se digirió el ADN correspondiente a las RF con la enzima *HindIII*, la cual corta solamente el ADN de los profagos CTXΦ Calcuta. La reducción en el tamaño del fragmento de ADN obtenido (4,5 kb), con relación al tamaño del fragmento correspondiente a la digestión *SphI* (5,4 kb), indica que al menos uno de los pre-CTXΦ posee las características de CTXΦ Calcuta.

Este resultado ofrece una evidencia práctica de la existencia de diferentes precursores-CTXΦ, como ocurre con los fagos CTXΦ intactos, lo cual da nuevos elementos que sustentan la hipótesis de que existe diversidad alélica a nivel de precursores, lo que determinó la diversidad

ADN de las formas replicativas obtenidas de 569b luego de la transducción con sobrenadante de:

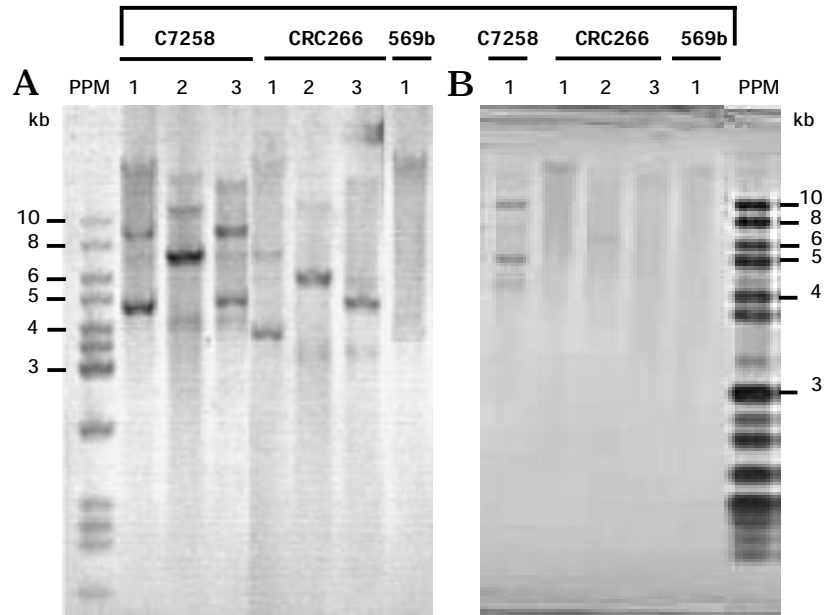


Fig. 2. Determinación de la capacidad infectiva de una forma pre-CTXΦ derivada de la cepa CRC266. El ADN correspondiente a la RF de CTXΦ presente en la cepa 569b infectada con el sobrenadante de las cepas C7258 y 569b fue utilizado como control positivo y negativo, respectivamente. El panel A muestra el resultado de la hibridación con la sonda core (genes *orfU*, *ace* y *zot* de CTXΦ) y el panel B, con la sonda CTAB (genes *ctxAB*). Las carrileras corresponden a: 1) ADN sin digerir; 2) digeridos con *SphI* y 3) digeridos con *HindIII*. En los extremos se aplicó el patrón de peso molecular (PPM) Gene Ruler™ DNA Ladder Mix de Fermentas y se indica la posición y el tamaño aproximado (kb) de las bandas más importantes para el análisis.

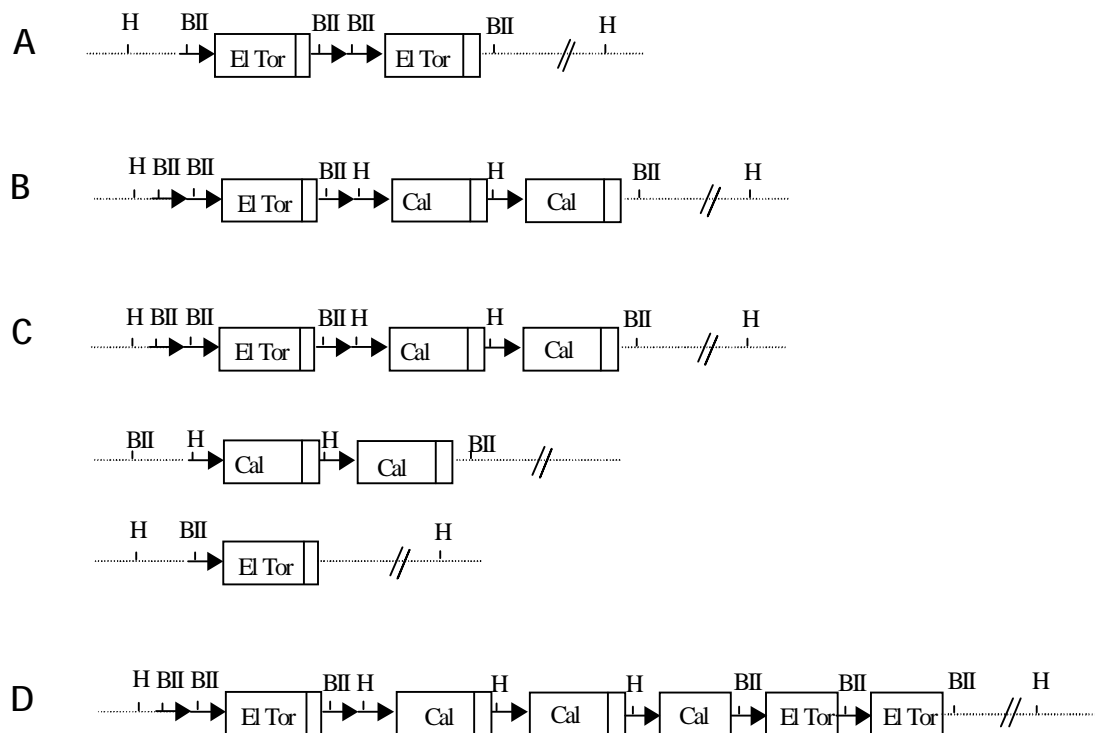


Fig. 1. Representación esquemática de la organización del profago CTXΦ, de acuerdo con resultados de Southern blotting, que caracteriza a varias cepas de *Vibrio cholerae* O139 aisladas en diferentes períodos de tiempo. A) Período de 1992 a 1993. B) Cepas aisladas en 1996. C) Cepas aisladas en 1998. D) Estructura genética de las cepas CRC262 y CRC266 aisladas en 2000. Las flechas y los recuadros corresponden a los elementos RS y a la región del core del profago CTXΦ, respectivamente. El rectángulo más pequeño representa los genes *ctxAB*. BII, sitio de restricción *BglII* y H, *HindIII*.

de fagos y no que la diversidad de fagos CTX $\Phi$  está asociada a eventos de recombinación homóloga entre fagos toxigénicos y no toxigénicos, como ha sido propuesto por otros autores.<sup>46</sup>

El fragmento de ADN genómico de las cepas CRC262 y CRC266, donde debía localizarse la toxina colérica en las copias atoxigénicas de CTX $\Phi$  fue clonado y secuenciado. La secuencia obtenida corroboró que se trataba de un profago pre-CTX $\Phi$ , similar al aislado de la cepa de *V. cholerae* O1 C325 y reportado por Boyd y col. (Fig. 3).<sup>45</sup>

Dicho fragmento comprende la región 3' del gen *zot* de uno de los precursores-CTX $\Phi$  y la región 5' de la zona intergénica 1 (*ig1*) del precursor-CTX $\Phi$  que le sucede, en el genoma de las cepas analizadas.

El análisis comparativo de las secuencias de los genes *zot* de todos los precursores-CTX $\Phi$  reportados y de la secuencia del gen CTX $\Phi$  presente en la cepa N16961, las cuales se encuentran depositadas en la base de datos del Instituto de Investigaciones del Genoma (TIGR), EE.UU.,<sup>47</sup> permitió concluir que la secuencia del gen *zot* presente en la copia del precursor analizado es muy similar a la de otros precursores reportados por Boyd y col.,<sup>45</sup> así como Qu y colaboradores,<sup>48</sup> Entre ellas existe más de un 97 % de identidad. En cambio, cuando se compara con la del fago CTX $\Phi$  de la cepa N16961 se encontró mayor divergencia (88,7 % de identidad). La mayor cantidad de cambios de bases se localizan en la región más cercana al extremo carboxilo terminal del gen *zot*. Uno de los cambios de base detectados, con relación a la copia de la cepa *Vibrio cholerae* N16961, genera un sitio HindIII, que no está presente en ninguna estructura de CTX $\Phi$  de cepas de *Vibrio cholerae* antes reportadas (Fig. 3). Este nuevo sitio de restricción solo se encuentra en los precursores de las cepas CRC262, CRC266 y en el reportado por Qu y colaboradores,<sup>48</sup> en la cepa de *V. cholerae* O139 JS9803, lo cual permite establecer cierto vínculo evolutivo entre ellos.

El análisis de la secuencia de la zona *ig1* de otro de los precursores presentes en las cepas de la India que se analizan en este trabajo permitió arribar a otras conclusiones. En este caso, la mayor divergencia aparece con relación a los precursores reportados anteriormente,<sup>45,48</sup> ya que su secuencia es idéntica a la de la zona *ig1* del fago CTX $\Phi$  presente en la cepa N16961.

La región de la zona *ig1* cercana a la secuencia de 18 pb que se relaciona el sitio de unión al cromosoma (CTX $\Phi$  *att*), conocida como ER, es muy similar en todos los precursores (Fig. 3). En cambio, a partir de aproximadamente 180 pb cuesta abajo de este sitio las secuencias divergen, esta región pudiera ser crítica en el funcionamiento del sitio CTX $\Phi$  *att*. Esta zona es diferente entre los fagos Clásicos y El Tor, por ejemplo.<sup>49</sup>

Dicho análisis de secuencias ubicaría a los pre-CTX $\Phi$  presentes en las cepas aquí analizadas en una posición intermedia, desde el punto de vista evolutivo, entre los pre-CTX $\Phi$  que dieron lugar a los fagos CTX $\Phi$  similares al que está presente en la cepa N16961 y los precursores que se habían reportado hasta este momento.<sup>45,48</sup>

El modelo que se ha propuesto para explicar la evolución del profago CTX $\Phi$  por Boyd y col.<sup>45</sup> plantea escenarios evolutivos paralelos para CTX $\Phi$  y las cepas pandémicas de *V. cholerae* y sugiere que diferentes profagos infectaron progenitores atoxigénicos de las cepas de *V. cholerae* Clásico y El Tor. Los resultados aquí presentados sustentan esta hipótesis, pero por otra parte, los hallazgos relacionados con la diversidad de precursores permiten proponer que el proceso de diversificación tuvo lugar antes de la adquisición de CTX.

#### INMUNIDAD DE CTX $\Phi$

Como se ha explicado, diferentes autores han descrito la existencia de cepas de *Vibrio cholerae* O139 que portan profagos carentes de CTX<sup>45,50</sup> y otras donde coexisten copias intactas y atoxigénicas de CTX $\Phi$  en una misma cepa.<sup>48</sup> Las cepas analizadas en el laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas poseen copias de pre-CTX $\Phi$ <sup>ET</sup> y pre-CTX $\Phi$ <sup>Cal</sup> coexistiendo en el genoma con copias intactas de CTX $\Phi$  de ambos tipos, lo que las distingue de las descritas anteriormente. Esta característica entraña contradicciones con los conceptos establecidos respecto a la inmunidad de fagos.

La diferencia entre los distintos tipos de fagos CTX $\Phi$  descritos se limita fundamentalmente al gen *RstR*. Este gen es el represor del gen *RstA*, que está relacionado con la replicación de CTX $\Phi$ . La diversidad de represores constituye la base de la heteroinmunidad entre los diferentes fagos CTX $\Phi$ .<sup>46</sup> Se han descri-

to al menos cuatro tipos de fagos CTX $\Phi$ , denominados El Tor (CTX $\Phi$ <sup>ET</sup>), Clásico (CTX $\Phi$ <sup>Clas</sup>), Calcuta (CTX $\Phi$ <sup>Cal</sup>) y Ambientales (CTX $\Phi$ <sup>Env</sup>).<sup>49,51</sup>

El concepto establecido de heteroinmunidad determina que una cepa portadora de un profago El Tor, por ejemplo, no puede ser reinfectada por un fago del mismo grupo de inmunidad. Este planteamiento ha servido de base para sugerir que una cepa vacunal portadora de una copia estable del gen *RstR* de determinado grupo de inmunidad poseería mejores propiedades de bioseguridad al quedar protegida contra la reinfección con fagos de este propio grupo.<sup>46</sup> Este concepto ha servido de base para hacer recomendaciones relacionadas con el diseño de vacunas. Por ejemplo, algunos autores han planteado que la introducción del gen *RstR* en candidatos vacunales atoxigénicos de *V. cholerae* asegura que estas vacunas quedarán inmunes a la infección con CTX $\Phi$  El Tor y por tanto a la readquisición de los genes tóxicos por esta vía.<sup>52</sup> Esta herramienta de hecho reduce significativamente la posibilidad de infección con esta variante de fago. Sin embargo, la estructura genética de CTX $\Phi$  en las cepas CRC262 y CRC266 presupone que un ancestro de estas cepas que poseía copias de CTX $\Phi$ <sup>ET</sup> y CTX $\Phi$ <sup>Cal</sup>, fue reinfectado con fagos pre-CTX $\Phi$  del mismo grupo de inmunidad, por lo que la protección conferida por la presencia de *RstR* no es absoluta. Todo indica que los fagos CTX $\Phi$  poseen otros mecanismos que les permiten sortear la mencionada heteroinmunidad y reinfectar cepas lisogénicas de su mismo tipo. Recientemente se ha descrito que la integración de CTX $\Phi$  en el genoma de *V. cholerae* involucra a la simple cadena de ADN, considerando que *RstR* es un represor del proceso de replicación y no de las recombinasas involucradas en la integración de este fago, es posible la integración de la simple cadena de ADN de una subpoblación de fagos aun cuando prime la represión del proceso replicativo.

#### CONCLUSIONES

El surgimiento de un nuevo serogrupo epidémico de *Vibrio cholerae* ha estimulado a los investigadores a estudiar la evolución y epidemiología de *Vibrio cholerae* utilizando toda la tecnología molecular disponible, para tratar de definir las bases moleculares para el establecimiento de un nuevo se-

→ *ctxAB\**

CTXΦ-N16961 (201) AA-AAGGACTAAATAGTATATTTTGATTTTTGATTTTTCTTAGTGCCTA  
 Precursor-CTXΦ-CRC262 (6) (201) GTC··TT·T·····CA·-·T··G······A·CC·GCCG······  
 Precursor-CTXΦ-C325 (201) GTC··TT·T·····CA·-·T··G······A·CC·GCCG······  
 Precursor-CTXΦ-JS9803 (201) GTC··TT·T·····CA·-·T··G······A·CC·GCCG······

(250) *TTATGTGGCGCGCATTATGTTGAGGGCAGTCGTCAGTACCATTGCGCC*  
 (250) ··T····T·····G··  
 (250) ··T····T·····G··  
 (250) ··G····T·····A··

(300) AGCACTGACGGCCTCACTTGCAGCAGAACGTGGGCAGCTTGCTGAATCGT  
 (300) ···  
 (300) ···  
 (300) ···

(350) TCTGCAAGAGTGAGCCCGTAACATAATGGCGTATAATACGCATTAAGGCG  
 (350) ·····A·G·······································  
 (350) ·····A·G·······································  
 (350) ·····C·A·······································

(400) GTATGTCATTTTCGGTATGTCAAAAATGACATAATTCGATTTATTCTGATT  
 (400) ···  
 (400) ···  
 (399) ···

(450) CCAGCCGTCCGCCGAGTCATCAGCTTCGCTGATGCGAGGAGACGGAATT  
 (450) CC·G··GTC··CCGCAG··A··A···T·G·T·A·GC··G·AG··G·A··T  
 (450) AG····TAA··TTAGGT··G········A·C·T·CT··T·CT··T·C··A  
 (436) AG····TAA··TTAGGT··G········A·C·T·CT··T·CT··T·C··A

(500) TCTACAGGTTCTATTTGAGACAGCGCCGCTGTGAGCTTAATTGTCTCACC  
 (500) ··T·CA·G·T··A·T·AGA··GCG··C·CT··GA······A····TCTC·C·  
 (497) ··C·AG·C·G··T·A······CTC··A·AA··TC·····G····CTCA·G·  
 (483) ··C·AG·C·G··T·A······CTC··A·AA··TC·····G····CTCA·G·

(550) --TCTATACTGCGACAGC  
 (550) --···TATA·T·C··C·GC  
 (544) GT··CCGT·A·T··A·TG  
 (530) GT··CCTT·A·T··A·TG

**Fig. 3.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica que abarca desde el extremo 3' del gen *zot* hasta la región *ig-1* del profago CTXΦ presente en la cepa de *Vibrio cholerae* N16961 con uno de los pre-CTXΦ presentes en las cepas CRC262 y CRC266, así como con los pre-CTXΦ de las cepas C325 y JS9803. Los puntos indican identidad total en las cuatro secuencias comparadas y las rayas, ausencia de bases nucleotídicas. La saeta representa el final del gen *zot* y el sitio donde se encuentran los genes *ctxAB* en una copia salvaje, los cuales fueron omitidos en el caso de la cepa N16961 para facilitar el alineamiento. La región ER se representa en *itálicas*.

rogrupo patógeno bacteriano como cepa endémica de determinadas regiones.

Varios estudios han indicado que continuos cambios genéticos en *V. cholerae* O139 han llevado al surgimiento de nuevos clones de vibrios O139 toxigénicos. Este proceso pudiera haber involucrado factores ecológicos aun no definidos, inmunológicos, y mecanismos de selección natural de las cepas que les hayan conferido algunas ventajas como colonizadoras del intestino humano.

El significado epidemiológico, por ejemplo, de la diversidad de fagos CTXΦ no está aclarado, pero al menos dos periodos de surgimiento explosivo de cólera han sido asociados con cepas que mostraron cambios en el tipo de *RstR* de CTXΦ; en agosto de 1996, en Calcuta y en marzo de 2002, en Bangladesh.<sup>41,46</sup>

Existen múltiples evidencias además de que el origen del serogrupo O139 no fue un evento único, sino que conversiones serotípicas similares han estado ocurriendo continuamente dando lugar a la difusión

del antígeno O139 entre diferentes líneas de *V. cholerae*.<sup>27</sup>

Los elementos discutidos en este artículo, así como las nuevas evidencias incluidas constituyen puntos de discusión y análisis por parte de los investigadores sobre la evolución de estas nuevas cepas epidémicas y el papel que han jugado los diferentes mecanismos de transferencia horizontal de genes en su establecimiento.

Además, ofrece nuevos elementos que sustentan que la expresión de *RstR* en candidatos vacunales de *V. cholerae* posee limitaciones poten-

ciales en cuanto a su efectividad para proteger a estas vacunas de la readquisición de genes tóxicos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Kaper J.B., Morris J.G., Jr and Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 48-86, 1995.
- Cholera Working Group, International Centre for Diarrhoeal Diseases Research, Bangladesh. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet*, **342**, 387-390, 1993.
- Pollitzer R.R. Cholera studies. V. Bacteriophage investigations. *Bull. World Health Organ.*, **13**, 1-25, 1955.
- Ramamurthy T., Garg S., Sharma R., Bhattacharya S.K., Nair G.B., Shimada T. *et al.* Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet*, **341**, 703-704, 1993.
- Nair G.B., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Mukhopadhyay A.K., Garg S., Bhattacharya M.K. *et al.* Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *J. Infect. Dis.*, **169**, 1029-1034, 1994.
- Hisatsune K., Kondo S., Isshiki Y., Iguchi T., Kawamata Y. and Shimada T. O-antigenic lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 Bengal, a new epidemic strain for recent cholera in the Indian subcontinent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1309-1315, 1993.
- Sharma C., Nair G.B., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya S.K., Ghosh R.K. and Ghosh A. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains isolated between 1992 and 1995 in Calcutta, India: evidence for the emergence of a new clone of the El Tor biotype. *J. Infect. Dis.*, **175**, 1134-1141, 1997.
- Mitra R., Basu A., Dutta D., Nair G.B. and Takeda Y. Resurgence of *Vibrio cholerae* O139 Bengal with altered antibiogram in Calcutta, India. *Lancet*, **348**, 1181, 1996.
- Faruque S.M., Abdul Alim A.R., Roy S.K., Khan F., Nair G.B., Sack R.B. *et al.* Molecular analysis of rRNA and cholera toxin genes carried by the new epidemic strain of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1050-1053, 1994.
- Bhattacharya S.K., Bhattacharya M.K., Nair G.B., Dutta D., Deb A., Ramamurthy T. *et al.* Clinical profile of acute diarrhoea cases infected with the new epidemic strain of *Vibrio cholerae* O139: designation of the disease as cholera. *J. Infect.*, **27**, 11-15, 1993.
- Popovic T., Fields P.I., Olsvik O., Wells J.G., Evins G.M., Cameron D.N. *et al.* Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. *J. Infect. Dis.*, **171**, 122-127, 1995.
- Morris J.G. *et al.* Clinical immunological characteristics of *Vibrio cholerae* O139 infection in North American volunteers. *J. Infect. Dis.*, **171**, 903-908, 1995.
- Berche P., Poyart C., Abachin E., Lelievre H., Vandepitte J., Dodin A. *et al.* The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, **170**, 701-704, 1994.
- Johnson J.A., Salles C.A., Panigrahi P., Albert M.J., Wright A.C., Johnson R.J. *et al.* *Vibrio cholerae* O139 synonym bengal is closely related to *Vibrio cholerae* El Tor but has important differences. *Infect. Immun.*, **62**, 2108-2110, 1994.
- Weintraub A., Widmalm G., Jansson P.E., Jansson M., Hultenby K. and Albert M.J. *Vibrio cholerae* O139 Bengal possesses a capsular polysaccharide which may confer increased virulence. *Microb. Pathog.*, **16**, 235-241, 1994.
- Iredell J.R., Stroehler U.H., Ward H.M. and Manning P.A. Lipopolysaccharide O-antigen expression and the effect of its absence on virulence in rfb mutants of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **20**, 45-54, 1998.
- Stroehler U.H., Jedani K.E., Dredge B.K., Morona R., Brown M.H., Karageorgos L.E. *et al.* Genetic rearrangements in the rfb regions of *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 10374-10378, 1995.
- Waldor M.K. and Mekalanos J.J. *Vibrio cholerae* O139 specific gene sequences. *Lancet*, **343**, 1366, 1994.
- Bik E.M., Bunschoten A.E., Gouw R.D. and Mooi F.R. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J.*, **14**, 209-216, 1995.
- Bik E.M., Gouw R.D. and Mooi F.R. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1453-1461, 1996.
- Comstock L.E., Johnson J.A., Michalski J.M., Morris J.G., Jr and Kaper J.B. Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1. *Mol. Microbiol.*, **19**, 815-826, 1996.
- Stroehler U.H., Parasivam G., Dredge B.K. and Manning P.A. Novel *Vibrio cholerae* O139 genes involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **179**, 2740-2747, 1997.
- Sozhamannan S., Deng Y.K., Li M., Sulakvelidze A., Kaper J.B., Johnson J.A. *et al.* Cloning and sequencing of the genes downstream of the wbf gene cluster of *Vibrio cholerae* serogroup O139 and analysis of the junction genes in other serogroups. *Infect. Immun.*, **67**, 5033-5040, 1999.
- Stroehler U.H. and Manning P.A. *Vibrio cholerae* serotype O139: swapping genes for surface polysaccharide biosynthesis. *Trends Microbiol.*, **5**, 178-180, 1997.
- Mooi F.R. and Bik E.M. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Trends Microbiol.*, **5**, 161-165, 1997.
- Dumontier S., Trieu-Cuot P. and Berche P. Structural and functional characterization of IS1358 from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **180**, 6101-6106, 1998.
- Faruque S.M., Saha M.N., Asadulghani, Sack D.A., Sack R.B., Takeda Y. *et al.* The O139 serogroup of *Vibrio cholerae* comprises diverse clones of epidemic and nonepidemic strains derived from multiple *V. cholerae* O1 or non-O1 progenitors. *J. Infect. Dis.*, **182**, 1161-1168, 2000.
- Dumontier S. and Berche P. *Vibrio cholerae* O22 might be a putative source of exogenous DNA resulting in the emergence of the new strain of *Vibrio cholerae* O139. *FEMS Microbiol. Lett.*, **164**, 91-98, 1998.
- Yamasaki S., Shimizu T., Hoshino K., Ho S.T., Shimada T., Nair G.B. *et al.* The genes responsible for O-antigen synthesis of *Vibrio cholerae* O139 are closely related to those of *Vibrio cholerae* O22. *Gene*, **237**, 321-332, 1999.
- Sack D.A., Sack R.B., Nair G.B. and Siddique A.K. Cholera. *Lancet*, **363**, 223-233, 2004.
- Faruque S.M., Sack D.A., Sack R.B., Colwell R.R., Takeda Y. and Nair G.B. Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 1304-1309, 2003.
- Glass R.I. and Black R.E. The epidemiology of cholera, in: D. Barua & Greenough W.B., Plenum, New York, 129-154, 1992.
- Saha D., LaRocque R.C., Khan A.I., Harris J.B., Begum Y.A., Akramuz-zaman S.M. *et al.* Incomplete correlation of serum vibriocidal antibody titer with protection from *Vibrio cholerae* infection in urban Bangladesh. *J. Infect. Dis.*, **189**, 2318-2322, 2004.
- Takeda T., Ramamurthy T., Chowdhury A.S., Dutta D., Bhattacharya S.K., Deb B.C. *et al.* *Vibrio cholerae* O1 vibriocidal and anti-cholera toxin antibodies in O139 Bengal cholera patients. *J. Infect.*, **29**, 233-235, 1994.
- Waldor M.K., Tschape H. and Mekalanos J.J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.*, **178**, 4157-4165, 1996.
- Faruque S.M., Siddique A.K., Saha M.N., Asadulghani, Rahman M.M., Zaman K. *et al.* Molecular characterization of a new ribotype of *Vibrio cholerae* O139 Bengal associated with an outbreak of cholera in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1313-1318, 1999.
- Ledón T., Campos J., Suzarte E., Marrero K., Rodríguez B.L., Moreno

- A. *et al.* Obtención de mutantes atoxigénicos para inmunizar contra *Vibrio cholerae* O139. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **36**, 156-162, 2005.
38. Mukhopadhyay A.K., Garg S., Mitra R., Basu A., Rajendran K., Dutta D. *et al.* Temporal shifts in traits of *Vibrio cholerae* strains isolated from hospitalized patients in Calcutta: a 3-year (1993 to 1995) analysis. **J. Clin. Microbiol.**, **34**, 2537-2543, 1996.
39. Mukhopadhyay A.K., Basu A., Garg P., Bag P.K., Ghosh A., Bhattacharya, S.K. *et al.* Molecular epidemiology of reemerged *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. **J. Clin. Microbiol.**, **36**, 2149-2152, 1998.
40. Khetawat G., Bhadra R.K., Nandi S. and Das J. Resurgent *Vibrio cholerae* O139: rearrangement of cholera toxin genetic elements and amplification of *rrn* operon. **Infect. Immun.**, **67**, 148-154, 1999.
41. Kimsey H.H., Nair G.B., Ghosh A. and Waldor M.K. Diverse CTXphages and evolution of new pathogenic *Vibrio cholerae*. **Lancet**, **352**, 457-458, 1998.
42. Ramamurthy T., Yamasaki S., Takeda Y. and Nair G.B. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: odyssey of a fortuitous variant. **Microbes. Infect.**, **5**, 329-344, 2003.
43. Basu A., Garg P., Datta S., hakraborty S., Bhattacharya T., Khan A. *et al.* *Vibrio cholerae* O139 in Calcutta, 1992-1998: incidence, antibiograms, and genotypes. **Emerg. Infect. Dis.**, **6**, 139-147, 2000.
44. Bhadra R.K., Roychoudhury S., Banerjee R.K., Kar S., Majumdar R., Sengupta S. *et al.* Cholera toxin (CTX) genetic element in *Vibrio cholerae* O139. **Microbiology**, **141**, 1977-1983, 1995.
45. Boyd E.F., Heilpern A.J. and Waldor M.K. Molecular analyses of a putative CTXphi precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX(phi)s by toxigenic *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **182**, 5530-5538, 2000.
46. Kimsey H.H. and Waldor M.K. CTXphi immunity: application in the development of cholera vaccines. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **95**, 7035-7039, 1998.
47. Instituto de Investigaciones del Genoma (TIGR), EE.UU. Base de datos. <http://www.tigr.org>. (Consultado: 14 de septiembre de 2005.)
48. Qu M., Xu J., Ding Y., Wang R., Liu P., Kan B. *et al.* Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O139 in China: polymorphism of ribotypes and CTX elements. **J. Clin. Microbiol.**, **41**, 2306-2310, 2003.
49. Davis B.M., Kimsey H.H., Chang W. and Waldor M.K. The *Vibrio cholerae* O139 Calcutta bacteriophage CTXphi is infectious and encodes a novel repressor. **J. Bacteriol.**, **181**, 6779-6787, 1999.
50. Singh D.V., Bhanumathi R. and Colwell R.R. Characterization of a cholera toxin gene-negative clinical strain of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **J. Clin. Microbiol.**, **42**, 1381, 2004.
51. Nusrin S., Khan G.Y., Bhuiyan N.A., Ansaruzzaman M., Hossain M.A., Safa A. *et al.* Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholera is endemic in Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, **42**, 5854-5856, 2004.
52. Liu G., Yan M., Liang W., Qi G., Liu Y., Gao S. *et al.* Resistance of the cholera vaccine candidate IEM108 against CTXPhi infection. **Vaccine**, **24**, 1749-1755, 2006.