



# Cepas chilenas de origen clínico de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 portan los genes *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF* del sistema de secreción T3SS2 presentes en una isla de patogenicidad

María Teresa Ulloa<sup>1</sup>, Camila Sanhueza<sup>1</sup>, Tania Henríquez<sup>1</sup>, Benjamín Aguayo<sup>1</sup>, Germán Hermosilla<sup>1</sup>, Lorena Porte<sup>2,4,5</sup>, Jeannette Dabanch<sup>2</sup>, Stephanie Braun<sup>2</sup>, Alberto Fica<sup>2</sup>, Isabel Briceño<sup>3</sup> y Carlos Gonzalo Osorio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Microbiología y Micolgía, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Hospital Militar de Santiago. Chile.

<sup>3</sup>Hospital Naval Almirante Nef. Viña del Mar, Chile.

<sup>4</sup>Clínica Alemana de Santiago. Chile.

<sup>5</sup>Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo. Santiago, Chile.

Recibido: 30 de agosto de 2018  
Aceptado: 1 de abril de 2019

#### Correspondencia a:

Carlos Gonzalo Osorio Abarzúa  
gonosorio@med.uchile.cl

## Chilean strains of clinical origin of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* carry the genes *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF* from secretion system T3SS2 present in an island of pathogenicity

**Background:** The virulence factors of the *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains are not clearly known. The strain of septicemic origin NN1 *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 was sequenced previously by the Illumina platform. A fragment of the pathogenicity island VPai-7 of *V. parahaemolyticus* was detected in its genome. **Aim:** To detect the virulence genes *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF* in Chilean strains of *V. cholerae* non-O1, non-O139. **Methods:** A total of 9 Chilean strains of clinical origin of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated between 2006-2012 were analyzed by conventional PCR assays for type III secretion genes encoded on that island: *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* and *vopF*. Additionally, the presence of the virulence genes *hylA* and *rtxA* was determined. In addition, REP-PCR and ERIC-PCR assays were performed. **Results:** most (6/9) Chilean *V. cholerae* non-O1, non-O139 strains contain the type III secretion genes *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* and *vopF*, encoded in an island of pathogenicity. In addition, all (9/9) the strains contain the virulence genes *hylA* and *rtxA*. **Conclusion:** These results strongly suggest the possibility that those strains possess an important virulence potential in humans.

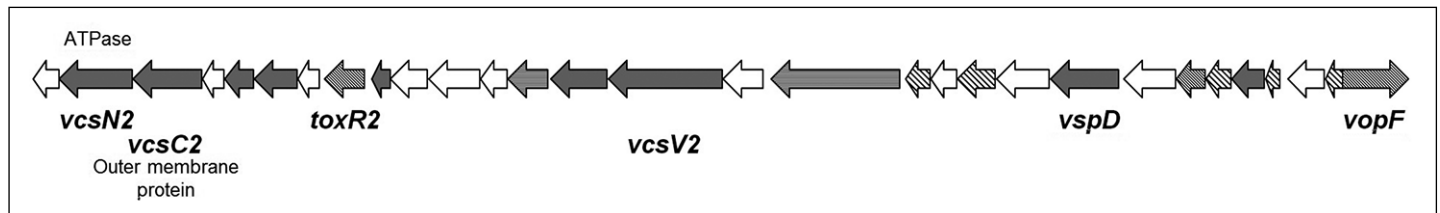
**Keywords:** Chile; gastroenteritis; *Vibrio cholerae* non-O1; genomic islands; virulence factors; T3SS2.

**Palabras clave:** Chile; gastroenteritis; *Vibrio cholerae* no-O1; islas genómicas; factores de virulencia; T3SS2.

## Introducción

*Vibrio cholerae* es una bacteria gramnegativa que pertenece a la clase gamma del phylum Proteobacteria. Las cepas toxigénicas de *V. cholerae* causan el cólera, una enfermedad caracterizada por producir un tipo de diarrea secretora grave y tener alta letalidad. Para tipificar las diferentes cepas de *V. cholerae* se utiliza un antígeno localizado en su membrana externa denominado O, porción más externa del lipopolisacárido (LPS), correspondiendo las cepas de *V. cholerae* toxigénico, generalmente al tipo O1 o O139. Cepas de origen ambiental de esta bacteria presentan diversos subtipos de antígeno O denominándose en su conjunto como no-O1, no-O139<sup>1-3</sup>. Se ha descrito que algunas cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 poseen un claro poder patógeno con la potencialidad de causar brotes o casos esporádicos de gastroenteritis e infecciones extra-intestinales fatales en humanos<sup>3-5</sup>.

A diferencia de los mecanismos de patogenicidad de las cepas de *V. cholerae* O1 y O139, que han sido bastante estudiados, los mecanismos de las cepas patogénicas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 son bastante menos conocidos. Pionero en esta área, el grupo de Mekalanos, describió por primera vez en el año 2005 una cepa de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que portaba en su genoma un segmento homólogo de la isla de patogenicidad VPai-7 de *V. parahaemolyticus*<sup>6</sup> (Figura 1). Dicho segmento corresponde sólo a una porción de 30 kpb localizada en el extremo 3' de la isla VPai-7 de 80 kpb, descrita originalmente en *V. parahaemolyticus*. Este segmento génico codifica para un sistema de secreción tipo III (T3SS) funcional que recientemente se ha descrito como un importante factor de virulencia<sup>7-10</sup>. Existen en este segmento de isla de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* una serie de genes denominados "*Vibrio cholerae* secretion" (*vcs*), que codifican para varios componentes estructurales (*vsc* C, J, R, T, Q, V, U) del sistema de secreción T3SS2,



**Figura 1.** Organización estructural del segmento de la isla de patogenicidad VPai-7, la que fue descrita originalmente en cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 por Dziejman y cols. 2005<sup>6</sup>.

que en conjunto otorgan un mayor grado de virulencia<sup>7</sup>. Otro gen localizado en esta isla es el denominado *vcsN2*, responsable de codificar para una ATPasa que brinda la energía necesaria para conducir la secreción por medio del complejo de poro. Estudios recientes indican que este último gen sería esencial para la colonización del epitelio intestinal en animales<sup>7</sup>. Además, el gen denominado *vopF*, localizado también en la misma isla, sería importante en el fenómeno de la colonización intestinal por parte de *V. cholerae* no-O1, no-O139<sup>7,9</sup>. Este último gen codifica para una proteína que es capaz de alterar la organización del citoesqueleto de actina en eucariontes, lo que puede comprometer la integridad de las uniones estrechas en el epitelio intestinal, producto de una inducción de la despolimerización cortical en las fibras de actina. Otros dos genes de virulencia presentes en este tipo de cepas, denominados *hlyA* (hemolisina VCC) y *rtxA* (*repeats in toxin*), y que se encuentran fuera de la isla, también fueron analizados en este estudio<sup>1</sup>. En nuestro país, se han reportado dos casos clínicos causados por cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que presentan un segmento de la isla de patogenicidad VPai-7<sup>3,4</sup>.

En un estudio anterior, el genoma de la cepa septicémica NN1, aislada en Valparaíso en 2006, fue secuenciado mediante las plataformas Illumina y 454 (Roche) (manuscrito en preparación). Los genes de virulencia *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF*, fueron localizados en la isla genómica VPai-7 mediante el uso de la plataforma pública BLAST (NCBI) y del programa GCK.

El objetivo de este trabajo fue detectar y conocer la prevalencia de los genes de virulencia codificados en el segmento de isla de patogenicidad VPai-7: *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF*, en cepas chilenas clínicas de *V. cholerae* no-O1, no-O139. Adicionalmente se determinó la presencia de los genes de virulencia *hlyA* y *rtxA*, localizados fuera de la isla de patogenicidad.

## Métodos

**Cepas estudiadas:** Las cepas de *V. cholerae* que se utilizaron en este estudio fueron identificadas con técnicas tradicionales de cultivo en medios selectivos (TCBS y

Chromoagar Vibrio) y pruebas serológicas contra los antígenos O1 y O139 (antisueros *V. cholerae* O139 Bengala y O1 polivalente, serotipo Inaba y Ogawa, Denka Seiken).

En este estudio se utilizaron en total nueve cepas chilenas de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139 aisladas entre 2006-2012 (Tabla 1). Las cepas NN1, NN2 y NN9 fueron obtenidas a partir de casos clínicos aislados. Las cepas NN3-NN8 corresponden a cepas obtenidas de un brote epidémico ocurrido en Antofagasta en 2010. Todas estas cepas se conservaron criopreservadas a -80° C en glicerol al 15%.

**Detección de los genes TTSS2 de la isla de patogenicidad VPai-7 en base al genoma de cepa NN1 de *V. cholerae* no-O1, no-O139 en cepas clínicas de *V. cholerae* no-O1, no-O139.** Utilizando el genoma de la cepa septicémica NN1, aislada en Valparaíso en 2006, se localizaron los genes de virulencia *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF*, codificados en la isla genómica VPai-7. Para ello se utilizó la plataforma pública BLAST (NCBI) y del programa GCK (versión 2.5; Textco, West Lebanon, NH).

**Tabla 1.** Cepas chilenas de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139 analizadas en este trabajo

Nombre Cepa	Año	Ciudad	Cuadro clínico	Origen muestra
NN1	2006	Valparaíso	Septicemia	Sangre
NN2	2009	Santiago	SDA	Deposición
NN3	2010	Antofagasta	SDA	Deposición
NN4	2010	Antofagasta	SDA	Deposición
NN5	2010	Antofagasta	SDA	Deposición
NN6	2010	Antofagasta	SDA	Deposición
NN7	2010	Antofagasta	SDA	Deposición
NN8	2010	Antofagasta	SDA	Deposición
NN9	2012	Santiago	SDA	Deposición

SDA: Síndrome diarreico agudo.



**Tabla 2. Partidores diseñados en este estudio y utilizados en la tipificación de cepas chilenas de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139**

Partidores	Secuencia	Tamaño (pb)
VCNN-N2f VCNN-N2r	5'-CAA TCG CAG GAT AAC GTC CT-3' 5'-CGA GGC GAA ATT GTC AAA GT-3'	874
VCNN-C2f VCNN-C2r	5'-CTC GAG GAG GGT TAA TGT CG-3' 5'-GCG CAG GCA GAT GTT TTT AT-3'	1050
VCNN-V2f VCNN-V2r	5'-ATT GCA CAA GTA GCC GCT TT-3' 5'-GAA ACC GTC GGT CAG TTT GT-3'	1438
VCNN-VopFf VCNN-VopFr	5'-CTG CCG TCA ATT TGG AAG AT-3' 5'-AAG TGC TGC CAA TTG AGC TT-3'	1265
VCNN-VspDf VCNN-VspDr	5'-CTT GCT CAA TTC GTG TTT GC -3' 5'-AAC CAA CCT CAG CAA CAA GC-3'	853
VCNN-ToxR2f VCNN-ToxR2r	5'-ACA GGA GCC AAC TGG GTT TA-3' 5'-TGC TGT GTG AAA ATG CCA AT-3'	369
VCNN-HylAf VCNN-HylAr	5'-AGA TCA ACT ACG ATC AAG CC-3' 5'-AGA GGT TGC TAT GCT TTC TAC-3'	1677
VCNN-RtxAf VCNN-RtxAr	5'-GCG ATT CTC AAA GAG ATG C-3' 5'-CAC TCA TTC CGA TAA CCA C-3'	1366

**Ensayos de reacción de polimerasa en cadena (RPC) convencional.** Cada par de partidores fue diseñado en base a la secuencia genómica obtenida de la cepa septicémica NN1 (Tabla 2). Para los ensayos de RPC se utilizó la siguiente mezcla de reacción: tampón (Promega) 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 μM, 25 pmol de cada partidor y 2U de Taq polimerasa. El volumen final de cada reacción fue de 50 μl. Finalmente, se adicionó a esta mezcla 1μl de ADN genómico de cada cepa purificado mediante el kit Genomic DNA QIAGEN. Los tiempos y temperaturas utilizadas para configurar los termocicladores (Minicycler™ de MJ Research y G-STORM 482) fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min. Luego 30 ciclos de amplificación, consistiendo cada uno de ellos en: 30 s a 95°C, 30 s a 58°C y 1 min 30 s a 72°C. Para finalmente realizar una extensión final a 72°C.

Los amplicones se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. Se utilizó el kit GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Se cargó 4 μl de producto en cada carril. Los geles fueron corridos a 50 V por 90 min en tampón TAE 0,5X en cámara Minigel migration Tank, Gel X Labnet. Para visualizar los resultados se utilizó un transluminador UV (Espectroline® modelo TUC-312R). Los geles fueron capturados digitalmente con el programa KODAK EDAS290 y analizados mediante el software Kodak 1D v3.6. En cada reacción se utilizó los siguientes controles: control positivo cepa NN1; control negativo: cepa toxigénica de *V. cholerae* O1 denominada N16916, la que no presenta la isla de patogenicidad VPai-7.

**Ensayos de repetitive element palindromic PCR (REP-PCR) y Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR).** Los partidores utilizados en esta técnica fueron obtenidos de Versalovic et al. 1991<sup>11</sup>: VpREP1: 5'-IIICGICGICATCIGGC-3'  
VpREP2: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'  
VpERIC-1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'  
VpERIC-2: 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'

La mezcla de reacción utilizada para ambos ensayos se basó en el protocolo descrito por Rao y cols., 2010, con modificaciones menores: tampón (Promega) 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPS 200 μM, 25 pmol de cada partidor y 3U de Taq polimerasa<sup>12</sup>. El volumen final de cada reacción fue de 25 μl. Finalmente, se le adicionó 2 μl de ADN genómico purificado mediante el kit Genomic DNA QIAGEN. La RPC se realizó en ambos casos en un termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient) con los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 95°C por 7 min, 30 ciclos de 90°C por 30 s, 45°C por 1 min y 65°C por 3 min. Extensión final a 70°C por 10 min.

**Análisis de similitud  $S_{AB}$  y dendrograma.** Para calcular la similitud genética ( $S_{AB}$ ) entre las cepas se utilizó el coeficiente de Dice. Con dichos datos se construyó luego un dendrograma mediante un análisis de agrupamiento por UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*). Estos análisis se realizaron con ayuda del Programa Treecon v1.3b para windows.

## Resultados

El genoma de la cepa septicémica NN1 fue secuenciado mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina y 454. En su genoma se detectó el segmento génico que corresponde al extremo 3' la isla VPai-7 de *V. parahae-molyticus*<sup>4</sup>. En base a dicha secuencia se diseñaron todos los partidores utilizados en este trabajo. Los fragmentos de RPC obtenidos para cada reacción fueron del tamaño esperado.

El análisis de las nueve cepas de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139 (incluyendo la cepa clínica control NN1), demuestra que 6/9 cepas fueron positivas para los genes T3SS2. Sólo las cepas NN3, NN4 y NN9 mostraron un perfil de virulencia diferente, destacando la cepa NN9 que fue negativa para la totalidad de dichos genes (Tabla 3). Por otra parte, destaca que las nueve cepas fueron positivas para los marcadores *rtxA* y *hlyA*.

Los ensayos de REP-PCR y ERIC-PCR demostraron la presencia de cuatro perfiles genómicos dentro de este grupo (Figura 2). En la Figura 3 se muestra el dendrograma obtenido en base a REP-PCR (dada la estrecha concordancia entre ambos ensayos sólo se muestra el resultado del REP-PCR).



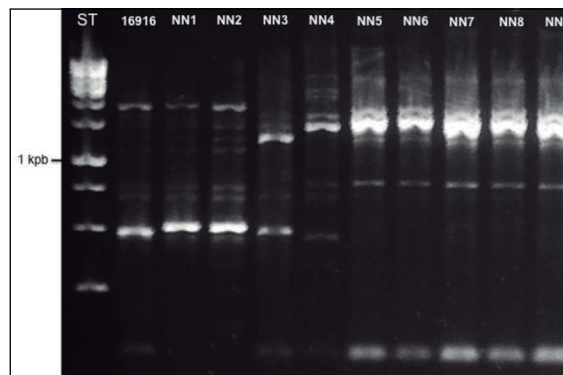
**Tabla 3. Patrones de amplificación de los diferentes genes de virulencia presentes en las cepas chilenas de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139**

Cepa	Localidad	Año	<i>vcsN2</i>	<i>vcsC2</i>	<i>vcsV2</i>	<i>vopF</i>	<i>vspD</i>	<i>toxR2</i>	<i>rtxA</i>	<i>hlyA</i>
NN1	Valparaíso	2006	+	+	+	+	+	+	+	+
NN2	Santiago	2009	+	+	+	+	+	+	+	+
NN3	Antofagasta	2010	+	+	+	+	-	+	+	+
NN4	Antofagasta	2010	+	+	+	+	-	+	+	+
NN5	Antofagasta	2010	+	+	+	+	+	+	+	+
NN6	Antofagasta	2010	+	+	+	+	+	+	+	+
NN7	Antofagasta	2010	+	+	+	+	+	+	+	+
NN8	Antofagasta	2010	+	+	+	+	+	+	+	+
NN9	Santiago	2012	-	-	-	-	-	-	+	+

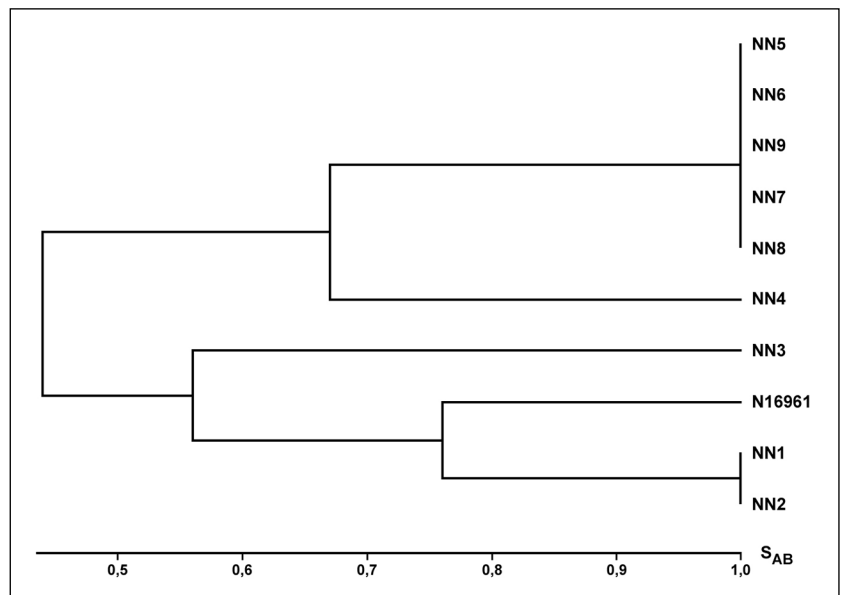
### Discusión

Este trabajo muestra por primera vez que un grupo heterogéneo temporalmente y geográficamente de cepas chilenas de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139 portan los genes de virulencia *vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *toxR2* y *vopF*, recientemente reconocidos como *bona fide* factores de virulencia en modelo murino<sup>7-10</sup>. Es importante destacar que estos genes participan en la estructuración y funcionamiento de un sistema de secreción tipo III (denominado en este caso T3SS2). Los sistemas T3SS conforman una especie de “jeringa molecular” que introduce o inyecta directamente toxinas al citoplasma de la célula blanco del hospedero<sup>13</sup>. El gen *vcsN2* codifica para una ATPasa que participa en el fenómeno de secreción. El gen *vopF* (*vibrio outer protein F*) participa en la regulación del proceso y los genes *vcsC2*, *vcsV2* y *vspD* desempeñan un papel estructural<sup>10</sup>. Por otra parte, el gen *toxR*, perteneciente a una familia de reguladores transcripcionales, codifica para la proteína ToxR, la que se une al ADN a través de un dominio HTH, que es necesario para la regulación transcripcional positiva y/o negativa de múltiples genes<sup>14</sup>. Además, las cepas fueron positivas para los genes de virulencia *hlyA* y *rtxA*, localizados fuera de la isla de patogenicidad, ambos reconocidos como importantes buscar un sinónimo exotoxinas de estas bacterias<sup>1</sup>. La hemolisina codificada por el gen *hlyA*, denominada también VCC (*Vibrio cholerae cytolyisin*), es un importante factor de virulencia que actúa como citotoxina formadora de poros en membranas<sup>15</sup>. Por otra parte, el gen *rtxA* codifica para una exotoxina perteneciente a la superfamilia de las toxinas RTX que también tienen actividad citotóxica y citolítica<sup>16</sup>.

La localización de este T3SS en una isla de patogenicidad cromosomal podría facilitar la diseminación de estos factores en la población natural de cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139, a través de transferencia genética ho-



**Figura 2.** Ensayo de REP-PCR de cepas chilenas clínicas de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139. ST: controles de peso molecular; 16916: cepa toxigénica control; NN1-NN9: cepas *V. cholerae* no-O1, no-O139.



**Figura 3.** Dendrograma construido con análisis de agrupamiento en base a patrones de bandas de REP-PCR. La escala inferior refleja la similitud genética entre las cepas. Se indica a la derecha la denominación de las cepas respectivas.



rizontal, favoreciendo el surgimiento de nuevos clones patogénicos. Aunque el mecanismo de movilización horizontal de las islas patogénicas cromosomales no es del todo conocido, existe evidencia experimental que indica que dichas islas se pueden transferir de manera parcial o total<sup>17</sup>. La presencia del grupo de genes de virulencia *vcS* podría indicar un mayor grado de virulencia de la cepa portadora, y por lo tanto, condicionar la gravedad del cuadro clínico. Por otra parte, la detección de este grupo de genes podría ser de utilidad para el control ambiental y de alimentos marinos de consumo humano. Según datos no publicados de nuestro laboratorio, alrededor de 40% de las cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 de origen ambiental contienen este mismo segmento génico (manuscrito en preparación). Esto indicaría que este tipo de cepas se encuentra distribuido ampliamente en el ambiente acuático local, lo que sugiere que nuestra población estaría expuesta permanentemente a casos esporádicos y eventualmente brotes epidémicos por este tipo de *Vibrio*.

Aun siendo un grupo pequeño de cepas clínicas, varias de ellas provienen de lugares y tiempos diferentes, lo que sugiere un origen no clonal. Esta idea fue evaluada por el uso de dos técnicas de genotipificación global como REP-PCR y ERIC-PCR. Estas técnicas permiten comparar perfiles globales de genomas bacterianos y establecer grados de similitud<sup>18</sup>. Ambas técnicas fueron concordantes en mostrar cuatro diferentes perfiles genómicos en el grupo de cepas estudiadas, lo que sugiere que estas cepas no conforman un grupo clonal.

Finalmente, estos hallazgos deberían incentivar una actitud de cautela y precaución respecto del consumo de productos marinos crudos en nuestro Chile, sobre todo para grupos de riesgo, por la posibilidad de infectarse con cepas patogénicas pertenecientes a este subgrupo de vibriones.

## Conclusiones

La mayoría (6/9) de las cepas chilenas de origen clínico de *V. cholerae* no-O1, no-O139 presentó amplificación para los genes de secreción *vcS*N2, *vcS*C2, *vcS*V2, *vsp*D, *tox*R2 y *vop*F, todos ellos presentes en el segmento de isla de patogenicidad VPai-7. Dos cepas (NN3 y NN4) amplificaron el mismo conjunto de genes excepto el gen *vsp*D. Sólo una cepa (NN9) no amplificó gen *vcS* alguno. Respecto a los genes de virulencia *rtxA* y *hlyA*, locali-

zados fuera de la isla, todas las cepas fueron positivas para ambos.

Estos resultados sugieren fuertemente la posibilidad que dichas cepas posean un potencial de virulencia importante en seres humanos y que, por lo tanto, debiera mantenerse una conducta de cautela permanente frente al consumo de productos marinos crudos que puedan eventualmente contagiar a grupos de riesgo de nuestra comunidad.

*Agradecimientos.* A Juan Carlos Hormazábal, Jefe del Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), por la gentileza de facilitarnos algunas cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 utilizadas en este estudio.

## Resumen

*Introducción.* Los factores de virulencia de las cepas de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 no son claramente conocidos. La cepa de origen septicémico NN1 *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 fue secuenciada previamente mediante la plataforma Illumina, detectándose en su genoma un fragmento de la isla de patogenicidad VPai-7 de *V. parahaemolyticus*. *Objetivo:* detectar los genes de virulencia *vcS*N2, *vcS*C2, *vcS*V2, *vsp*D, *tox*R2 y *vop*F en cepas chilenas clínicas de *V. cholerae* no-O1, no-O139. *Material y Métodos:* Un total de 9 cepas chilenas de origen clínico de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 aisladas entre 2006-2012 fueron analizadas mediante ensayos de reacción de polimerasa en cadena (RPC, en inglés PCR) convencional para los genes de secreción tipo III codificados en dicha isla: *vcS*N2, *vcS*C2, *vcS*V2, *vsp*D, *tox*R2 y *vop*F. Adicionalmente se determinó la presencia de los genes de virulencia *hlyA* y *rtxA*. Además, se realizaron ensayos de *repetitive element palindromic PCR* (REP-PCR) y *Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR* (ERIC-PCR). *Resultados:* la mayoría (6/9) de las cepas chilenas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 contiene todos los genes de secreción tipo III *vcS*N2, *vcS*C2, *vcS*V2, *vsp*D, *tox*R2 y *vop*F, codificados en una isla de patogenicidad. Además, el total de las cepas (9/9) contiene los genes de virulencia *hlyA* y *rtxA*. *Conclusión:* Estos resultados sugieren fuertemente la posibilidad que dichas cepas posean un potencial de virulencia importante en seres humanos.



## Referencias bibliográficas

- 1.- Chowdhury G, Joshi S, Bhattacharya S, Sekar U, Birajdar B, Bhattacharyya A, Shinoda S, et al. Extraintestinal infections caused by non-toxicogenic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. *Front Microbiol* 2016; 7: 1-5. doi:10.3389/fmicb.2016.00144.
- 2.- Boyd E F, Waldor M K. Evolutionary and functional analyses of variants of the toxin-coregulated pilus protein TcpA from toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 serogroup isolates. *Microbiology* 2002; 148: 1655-66. doi: 10.1099/00221287-148-6-1655.
- 3.- Briceño I, Puebla C, Guerra F, Jensen D, Nuñez H, Ulloa M T, et al. Septicemia fatal causada por *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 hemolítico en Chile. Caso clínico. *Rev Med Chile* 2009; 137: 1193-96. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000900008>.
- 4.- Ulloa T M T, Porte T L, Braun J S, Dabanch P J, Fica C.A, Henríquez A T, et al. Gastroenteritis aguda causada por *Vibrio cholerae* no-O1, no O-139 que porta una región homóloga a la isla de patogenicidad Vpal-7. *Rev Chilena Infectol* 2011; 28: 470-3. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000600012>.
- 5.- Halabi M, Haditsch M, Renner F, Brinninger G, Mittermayer H. *Vibrio cholerae* non-O1 septicemia in a patient with liver cirrhosis and Billroth-II-gastrectomy. *J Infect* 1997; 34: 83-4. PMID: 9120332.
- 6.- Dziejman M, Serruto D, Tam V C, Sturtevant D, Diraphat P, Faruque S M, et al. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3465-70. doi: 10.1073/pnas.0409918102.
- 7.- Shin O S, Tam V C, Suzuki M, Ritchie J M, Bronson R T, Waldor M K, et al. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *MBio* 2011; 14:e00106-11. doi: 10.1128/mBio.00106-11.
- 8.- Alam A, Tam V, Hamilton E, Dziejman M. vttRA and vttRB encode ToxR family proteins that mediate bile-induced expression of type three secretion system genes in a non-O1/ non-O139 *Vibrio cholerae* strain. *Infect Immun* 2010; 78: 2554-70. doi: 10.1128/IAI.01073-09.
- 9.- Tam V C, Serruto D, Dziejman M, Briehier W, Mekalanos J J. A Type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell-Host Microbe* 2007; 1: 95-107. doi: 10.1016/j.chom.2007.03.005.
- 10.- Alam A, Miller K, Chaand M, Butler J, Dziejman M. Identification of *Vibrio cholerae* Type III secretion system effector proteins. *Infect Immun* 2011; 79: 1728-40. doi: 10.1128/IAI.01194-10.
- 11.- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6823-31. PMID: 1762913.
- 12.- Rao B M, Surendran P K. Genetic heterogeneity of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from shrimp aquaculture system: a comparison of RS-, REP- and ERIC-PCR fingerprinting approaches. *Lett Appl Microbiol* 2010; 51: 65-74. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02863.x
- 13.- Wagner S, Grin I, Malmshiemer S, Singh N, Torres-Vargas C E, Westerhausen S. Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells *FEMS Microbiol Lett* 2018; 365: 1-13. doi: 10.1093/femsle/fny201.
- 14.- Faruque S M, Albert M J, Mekalanos J J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1301-14. PMID: PMC98947.
- 15.- Saka H A, Bidinost C, Sola C, Carranza P, Collino C, Ortiz S, et al. *Vibrio cholerae* cytotoxin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb Pathog* 2008; 44: 118-28. doi: 10.1016/j.micpath.2007.08.013.
- 16.- Benz R. Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1858: 526-37. doi: 10.1016/j.bbamem.
- 17.- Carraro N, Rivard N, Burrus V, Ceccarelli D. Mobilizable genomic islands, different strategies for the dissemination of multidrug resistance and other adaptive traits. *Mob Genet Elements* 2017; 7: 1-6. doi: 10.1080/2159256X.2017.1304193.
- 18.- Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 430-40. doi: 10.1016/j.meegid.2009.03.004.