

UCH-FC
DOC-Microb
G 216
C 1



**DIVERSIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN CLONAL DE *Vibrio*
parahaemolyticus PANDÉMICO.**

Tesis entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Por

Katherine Patricia García Jara



Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo T.

Junio de 2011

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

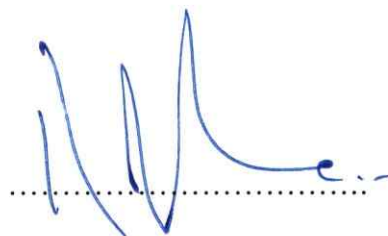
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Katherine Patricia García Jara

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 18 de Mayo de 2011.

Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'R. Espejo', written over a horizontal dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos

Dr. Carlos Jerez

Dr. Roberto Vidal

Three handwritten signatures in blue ink, stacked vertically over horizontal dotted lines. The top signature is 'Rosalba Lagos', the middle is 'Carlos Jerez', and the bottom is 'Roberto Vidal'.

“Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución”

Theodosious Dobzhansky.



Mi nombre es Katherine García, nací en Santiago el 27 de Mayo de 1982. Desde niña siempre tuve una gran inquietud por entender como ocurrían las cosas a mi alrededor. Estudie en el Liceo N°1 de niñas Javiera Carrera, lugar donde desarrollé un gran interés por la Biología y la Química. Esto me llevó a estudiar Bioquímica en la Universidad de Santiago donde mis ramos favoritos fueron Inmunología, Microbiología y Virología. Al terminar mi carrera me dediqué a trabajar un año en un laboratorio de Inmunología de la Reproducción (estudiando los mecanismos de patogenicidad de *Neisseria gonorrhoeae*) y ahí noté cuanto me gustaba la investigación, razón por la cual entré al doctorado de Microbiología en la Universidad de Chile. En estos momentos me encuentro finalizando esta tesis que me permitirá obtener el grado de Doctora, sin embargo, sé que este es sólo un pequeño paso en el largo camino que me queda por recorrer en la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las cosas maravillosas que me ha dado en la vida.

A Víctor por todo su amor. Por compartir mis alegrías y por alentarme siempre en los momentos en que me sentí decaer. Por estar siempre a mi lado.

A mis padres Patricia y Marco, mi hermano Marco, mis abuelos Pedro y Ernestina y a todos mis tíos y primos por todo el apoyo y el cariño entregado. Por acompañarme siempre y por su ayuda incondicional.

Al Dr. Romilio Espejo por aceptarme en su laboratorio. Por todas sus enseñanzas que me permitieron ser una mejor profesional. Por ser un gran guía.

A los integrantes de la comisión evaluadora, Dra. Rosalba Lagos, Dr. Carlos Jerez y Dr. Roberto Vidal por su valioso aporte en el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Erika, Beatriz, Daniel, Roberto, Rafa, Gastón, Paulina y Pamela, por todas las veces que compartimos, por las eternas discusiones en que nunca nos pusimos de acuerdo y por todo su apoyo en los momentos difíciles.

A Paulina Uribe por la gran ayuda y los excelentes consejos que me brindó durante la escritura de mi tesis.

INDICE DE MATERIAS

	Página
INDICE DE MATERIAS	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xvi
INTRODUCCION	1
1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1
1.1 Clon pandémico de <i>V. parahaemolyticus</i>	1
1.2 Epidemiología de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico en Chile.	3
2. Mecanismos de variación génica en <i>V. parahaemolyticus</i> .	5
2.1 Diversidad genética dentro de la población clonal de <i>V. parahaemolyticus</i> .	6
2.2 Regiones de DNA interespaciadas con secuencias no repetitivas (CRISPR).	8
2.3 Regiones de DNA repetidas en serie (TRs).	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16

MATERIALES Y METODOS	17
1. Presencia de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico en las costas del sur de Chile.	17
1.1 Aislamiento de <i>V. parahaemolyticus</i> a partir de muestras ambientales y clínicas.	17
1.2 Condiciones de cultivo y extracción de DNA.	19
1.3 Caracterización genotípica por DGREA.	19
1.4 Caracterización fenotípica de acuerdo a los serotipos.	20
2. Identificación de aislados variantes de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico.	20
2.1 Detección de variantes en base a marcadores genéticos tradicionales, DGREA, serotipo y presencia de fago Vp58.5.	20
2.2 Detección de variantes en CRISPR y VNTRs.	21
2.2.1 Cepas.	21
2.2.2 Detección de variantes en CRISPR.	24
2.2.3 Detección de variantes en VNTRs.	25
3. Mecanismo de variación de VNTRs.	27
3.1 Clones y cepas bacterianas.	27
3.2 Subcultivos seriados y PSPEs.	29
3.3 Tasas de mutación y análisis del tipo de mutación.	29
4. Diversidad e interrelación entre aislados variantes.	30
4.1 Relación filogenética entre mutantes o variantes nativas.	30
4.2 Distancia Génica ($\delta\mu^2$)	31
RESULTADOS	32
1. Epidemiología de <i>V. parahaemolyticus</i> en la Región de Los Lagos.	32
1.1 <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico asociado a casos clínicos.	32
1.2 <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico asociado a mariscos.	34
1.3 Diversidad de <i>V. parahaemolyticus</i> en mariscos de la Región de Los Lagos.	39

2.	Identificación de aislados variantes de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico.	41
2.1	Variantes en marcadores genéticos tradicionales, DGREA, serotipo y presencia de fago Vp58.5.	41
2.2	Variantes en CRISPR y VNTRs.	42
2.2.1	Detección de variantes en CRISPR	42
2.2.2	Detección de variantes en VNTRs.	43
3.	Mecanismo de variación de VNTRs.	45
3.1	Diversidad de VNTRs entre clones de una misma cepa y sus tasas de mutación.	45
3.2	Distribución de mutantes obtenidos luego de la subcultivación en serie.	48
4.	Relación entre aislados variantes.	50
4.1	Modelos evolutivos y árboles filogenéticos.	50
4.2	Filogenia de poblaciones nativas.	54
	DISCUSION	60
1.	Epidemiología de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pandémico en la Región de Los Lagos.	60
2.	Aislados variantes en la población clonal de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pandémico.	66
3.	Estudio de la variación de VNTRs y su aplicabilidad.	68
3.1	Variaciones en los VNTRs durante almacenamiento en agar blando a temperatura ambiente.	68
3.2	Tasa de mutación y número de repetidos en los VNTRs.	69
	CONCLUSIONES	74
	BIBLIOGRAFÍA	76
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas pandémicas aisladas en la Región de Los Lagos entre los años 2004 y 2009.....	23
Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados para amplificar ocho VNTRs descritos para <i>V. parahaemolyticus</i>	25
Tabla 3. Cepas pandémicas aisladas en la Región de Antofagasta (1998) y en Sudeste asiático (1996-1999).....	28
Tabla 4. Propiedades de aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> obtenidos a partir de casos clínicos durante los veranos de 2008 y 2009 en Puerto Montt, Chile.....	33
Tabla 5. Propiedades de aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> obtenidos de mariscos durante los veranos de 2008 a 2011 en Puerto Montt, Chile.....	35
Tabla 6. Perfiles de VNTRs de cepas clínicas y ambientales obtenidas en Puerto Montt, Región de Los Lagos, entre los años 2004 y 2009.....	44

Tabla 7.	Número de unidades repetidas de seis <i>loci</i> VNTR en cuatro clones de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico y las tasas de mutación observadas después de subcultivos <i>in vitro</i>	46
Tabla 8.	Frecuencia de mutantes con cambios de 1, 2, 3 y 4 unidades repetidas para los clones examinados	48
Tabla 9.	Perfil de VNTRs de cepas aisladas en el norte de Chile y Sudeste Asiático entre los años 1996 y 1999.....	54
Tabla 10.	Distancia genética $(\delta\mu)^2$ entre las diferentes poblaciones de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico y sus fechas de aislamiento.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Número de casos clínicos ocurridos en la Región de Los Lagos a partir del año 2004.....	4
Figura 2. Estructura y función de CRISPR.....	11
Figura 3. Mal apareamiento de hebras durante la replicación del DNA.....	13
Figura 4. Amplicón de <i>tlh</i> obtenido desde <i>V. alginolyticus</i> y dendrograma de disimilitud de las secuencias de <i>tlh</i>	38
Figura 5. Histograma con el número de muestras de mariscos que contienen <i>V. parahaemolyticus</i> que pertenecen a diferentes grupos DGREA observados desde 2004.....	40
Figura 6. Migración del amplicón de CRISPR en gel de poliacrilamida en cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i>	42
Figura 7. Tasa de mutación de VNTRs en relación al número de repetidos en cada VNTR.....	47
Figura 8. Distribución de la frecuencia de mutantes con diferencias incrementadas en el número de unidades repetidas.....	49

Figura 9. Árboles filogenéticos construidos para la población de KX utilizando coeficiente Manhattan (A) o coeficiente categórico (B).	51
Figura 10. Árbol filogenético MST generado para cuatro clones diferentes de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico.....	53
Figura 11. Árbol filogenético MST de aislados nativos de <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> pandémico aislados en el sur de Chile...	55
Figura 12. Árbol filogenético MST de aislados nativos de <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> pandémico de distinto origen geográfico	57
Figura 13. Árbol construido por el método del vecino más cercano para diferentes poblaciones de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémico basado en la distancia génica $(\delta\mu)^2$	59

ABREVIATURAS

ATC	: Aislado clínico de Antofagasta
COC	: Aislado clínico de Coquimbó.
CRISPR	: Agrupamiento de pequeñas secuencias repetidas interespaciadas regularmente. (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
DGREA	: Análisis directo del genoma con enzimas de restricción
Kb	: Kilo bases
ORF	: Marco de lectura abierto (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	: Pares de bases
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	: Electroforesis en gel en campo pulsante
PMA	: Aislado ambiental de Puerto Montt
PMC	: Aislado clínico de Puerto Montt
RFLP	: Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción
SSM	: Malapareamiento de hebras del DNA durante la replicación por resbalamiento de la polimerasa (<i>Slipped Strand Mismatching</i>)
SMM	: Modelo de mutaciones en VNTRs que ocurren paso a paso (<i>Stepwise Mutation Model</i>)
VNTR	: Repetido en serie de número variable (<i>Variable Number Tandem Repeat</i>)

RESUMEN

Los casos de diarrea relacionada al consumo de mariscos crudos se multiplicaron en Chile cuando llegó la cepa pandémica de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6. Esta cepa se detectó inicialmente en Chile en la Región de Antofagasta (23°39'S 70°24'W) el año 1998, donde produjo un brote que alcanzó más de 300 casos clínicos y luego desapareció. Sin embargo, el año 2004 reapareció en la Región de Los Lagos (41°29'S 72°24'W) en el sur de Chile, donde se produce aproximadamente un 80% de los mariscos de nuestro país, generando grandes brotes de diarrea no sólo en esta región, sino en todo el país.

Los brotes de diarrea en la Región de los Lagos que comenzaron el año 2004, alcanzaron un máximo en el 2005 con 3.725 casos clínicos, todos asociados con la cepa pandémica. Luego de este año, los casos clínicos fueron descendiendo sostenidamente hasta 1 caso el 2010 y 4 casos el 2011, lo cual parece indicar la desaparición de la cepa pandémica en esta región, o al menos, una disminución hasta niveles indetectables dado que tampoco fue detectada estos dos años en los mariscos examinados. No obstante, desde que fue observada por primera vez en la Región de Los Lagos el año 2004, la cepa clonal pandémica de *V. parahaemolyticus* proliferó en el litoral llegando a producir más de 8.000 casos de diarrea. La proliferación de este clon pandémico de *V. parahaemolyticus* durante el tiempo que se mantuvo en esta región, ofrece una oportunidad única para estudiar la microevolución que sufrió esta población clonal en su

ambiente natural de propagación, considerando como microevolución a la ocurrencia de cambios genómicos en la población a lo largo de un número limitado de generaciones.

La epidemiología de *V. parahaemolyticus* pandémico se estudió midiendo la carga de *V. parahaemolyticus* en casos clínicos y en mariscos y caracterizando las cepas de *V. parahaemolyticus* encontradas. Hasta el momento se han encontrado 30 grupos diferentes de *V. parahaemolyticus* diferenciados por su patrón de digestión del genoma. Estos grupos han prevalecido por tiempos que van desde uno a ocho años, entre los cuales la cepa pandémica constituye solo un pequeño porcentaje.

La identificación y caracterización de las variantes genéticas de *V. parahaemolyticus* pandémico se llevó a cabo en clones aislados desde casos clínicos y desde mariscos. Sólo se encontraron variantes en las muestra clínicas que correspondieron a aislados que diferían de la cepa tipo por la presencia del profago Vp58.5 (18,5%), ausencia de *toxRS/new* (3,9%) y diferencia en serotipo (1,8%).

Como el número de variantes observados por los métodos utilizados fue muy bajo, se analizaron regiones genómicas hipervariables: las regiones de DNA repetidas interespaciadas y las regiones de DNA repetidas en serie. Se analizaron 50 cepas pandémicas para detectar mediante PCR una posible región de DNA repetida interespaciada descrita para *V. parahaemolyticus* pero ninguna mostró variación. La estabilidad observada sugiere que esta región no es una región realmente funcional como en otras cepas. Por otro lado, el estudio de regiones de DNA repetidas en serie en las mismas cepas mostró que era posible distinguir 35 de las 50 cepas, lo que equivale a un 70% de las cepas variantes. Se determinó que la tasa de mutación de estas secuencias repetidas en serie es del orden de 10^{-4} mutante por generación y que esta tasa es

proporcional al número de unidades repetidas presentes inicialmente. Subsecuentemente, se concluyó que las variaciones en el tamaño de estas secuencias ocurren principalmente por una acumulación paso a paso de adiciones o deleciones de una sola de las secuencias repetidas. Esta forma de variación se consideró para la estimación de las distancias filogenéticas en la construcción de los árboles, dado que la distancia entre variantes depende del número de unidades repetidas disminuidas o aumentadas. La aplicación de esta forma de análisis en un grupo de aislados independientes, obtenidos en diferentes localidades geográficas, permitió obtener la diferenciación de las cepas de acuerdo a su origen geográfico y estimar el tiempo desde la separación de los grupos analizados. De acuerdo a esta estimación la separación más antigua en las poblaciones de *V. parahaemolyticus* examinadas habría sido entre las poblaciones de Tokio y las correspondientes al sur de Chile.

En base a los resultados de esta tesis, se postula que mediante el estudio de las regiones de DNA repetidas en serie, es posible diferenciar entre aislados clonales de *V. parahaemolyticus*. Y que es plausible además determinar la microevolución de este patógeno e inferir una posible ruta de su colonización en Chile. Adicionalmente, este conocimiento permitirá el rastreo de brotes producidos por el clon pandémico de *V. parahaemolyticus*.

SUMMARY

Diarrhea cases associated with the consumption of raw seafood increased in Chile since 1998, when the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 arrived. This strain was initially detected in Chile in the Region de Antofagasta (23° 39'S 70° 24'W) in 1998. This year an outbreak occurred that caused over 300 clinical cases but no further outbreaks were observed in the north of Chile since then. The pandemic strain arrived in 2004 to the Region de Los Lagos (41°29'S 72°24'W) in southern Chile, which produces about 80% of the seafood, generating large outbreaks of diarrhea in the whole country.

Outbreaks of diarrhea in Region de Los Lagos began in 2004, reaching a peak in 2005 with 3,725 clinical cases, all of them associated with the pandemic strain. After this year, clinical cases diminished steadily to 1 case in 2010 and 4 cases in 2011. This fact suggested the disappearance of the pandemic strain in this region, or at least it decreasing to undetectable levels. However, before its apparent disappearance, the pandemic clonal strain of *V. parahaemolyticus* proliferated on the coast, producing over 8,000 cases of diarrhea since its first observation in the Region de Los Lagos in 2004. The spread of this pandemic clone of *V. parahaemolyticus* during this period in this region provided a unique opportunity to learn on the epidemiology of *V. parahaemolyticus* associated diarrhea and to study the microevolution and natural clonal propagation of this population, considering microevolution as the occurrence of genomic changes on the population over few generations.

The epidemiology of pandemic *V. parahaemolyticus* was studied by measuring the load of total *V. parahaemolyticus* in clinical and shellfish samples, and characterizing the strains of *V. parahaemolyticus* found. Until now, we have found 30 groups that corresponded to different patterns of digestion of their genome of *V. parahaemolyticus* in shellfish, which have prevailed for different periods, ranging from one to eight years. The group of the pandemic strain corresponded to a small percentage of the total population of *V. parahaemolyticus*.

The identification of genetic variants of pandemic *V. parahaemolyticus* was made in clones isolated from clinical cases and from shellfish. Genetic variants were only found in clinical cases and they corresponded to variants with the presence of the prophage Vp58.5 (18.5%), absence of *toxRS/new* (3.9%), and a serotype different to O3:K6 (1.8%). Considering that the number of variants observed by the traditional methods was very low, the next step was to explore possible changes in hypervariable genomic regions: interspaced repeated DNA regions and serial repeated DNA regions.

Fifty pandemic strains were analyzed by PCR to detect possible interspersed repeated DNA region described for *V. parahaemolyticus* but none of them showed changes. Observed stability suggested that this region is not really functional as in other strains.

On the other hand, the analysis of serial repeated DNA regions in the same strains showed that it was possible to differentiate 35 types in 50 strains (70% of variant strains).

In this work we found that the mutation rate of serial repeated regions is about 10^{-4} mutant per generation and that it is proportional to the number of repeat units in these regions. Subsequently, it was concluded that variations in the size occur mainly by accumulation "step by step" of additions or deletions. This feature was included to estimate distances in constructing phylogenetic trees. Thus, the analysis of these regions in an independent group of isolates obtained from different geographic locations, were performed allowing their distinction according to their geographical origin. The genetic distance between these populations suggested that the first separation among the populations examined of pandemic *V. parahaemolyticus* occurred between the populations of Tokyo and southern Chile.

Based on the obtained results it is postulated that the analysis of serial repeated DNA regions allows to differentiate between clonal isolates of *V. parahaemolyticus* that cannot be distinguished by other high resolution methods. And that it is also plausible to determinate, by analyzing serial repeated DNA regions, the microevolution of this pathogen and it is possible infer a possible route of colonization in Chile. A potential applicability arising from this work is the tracking of outbreaks caused by pandemic clone of *V. parahaemolyticus* to determine the source of the outbreak, which has been impossible until now.

INTRODUCCION

1. *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria halófila, Gram negativa y marina, que habita naturalmente ambientes estuarinos y marinos a nivel mundial (Blake y col., 1980). Esta especie bacteriana incluye un gran número de cepas, cada una de las cuales se reproduce y propaga por división binaria, en forma esencialmente clonal. En consecuencia, la población de *V. parahaemolyticus* que habita en el mar estaría formada por diferentes clones que evolucionan en forma independiente (Gevers y col., 2005; Feil y col., 2004). La gran mayoría de estos clones son inocuos y menos del 1% de ellos se consideran patógenos. Estos clones patógenos pueden propagarse en mariscos y causar gastroenteritis por la ingesta de estos mariscos crudos o mal cocidos (DePaola y col., 2003).

1.1 Clon pandémico de *V. parahaemolyticus*

Previo a 1996, la gastroenteritis causada por *V. parahaemolyticus* estaba asociada a diversos serotipos. Sin embargo, a partir de ese año junto con un aumento de los casos totales, aumentó notablemente la prevalencia de un serotipo particular, el serotipo O3:K6. Las bacterias con este serotipo corresponden a una población clonal

originalmente observada en Calcuta, India (Okuda y col., 1997). Este nuevo clon aparentemente tiene un inusual potencial para diseminarse y causar infecciones. Desde su aparición ha provocado importantes brotes de diarrea en diferentes países, partiendo en el sudeste Asiático y extendiéndose a América, Europa y África. Esta rápida diseminación marcó el inicio de la primera pandemia de *Vibrio parahaemolyticus* y fue la primera vez en que un solo serotipo se asoció a la diseminación de *V. parahaemolyticus*. Este clon se denomina actualmente clon pandémico de *V. parahaemolyticus* serotipo O3:K6 (Daniels y col., 2000; Wong y col., 2000).

Los aislados de este clon presentan como propiedad común la presencia del gen *tdh* y la ausencia del gen *trh* y de ureasa, frecuentemente encontrados en otros *V. parahemolyticus* patógenos (Shirai y col., 1990). Además exhiben una secuencia única dentro del operón *toxRS* (*toxRS/new*) y poseen un marco de lectura abierto, *orf8* que corresponde a un fago filamentosos asociado (Nasu y col., 2000). La naturaleza clonal de estas cepas pandémicas ha sido determinada por la similitud de los patrones obtenidos mediante análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP-PFGE, *random fragment length polymorphism-pulse field gel electrophoresis*) visualizado por electroforesis en campo pulsado (Suthienkul y col., 1996), mediante la reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR, *arbitrary primers-polymerase chain reaction*) (Chowdhury y col., 2000), por digestión directa del genoma con enzimas de restricción (DGREA, *direct genome restriction enzyme analysis*) (Fuenzalida y col., 2006) y tipificación de las secuencias de multilocus (MLST, *multilocus sequence typing*) (Chowdhury y col., 2004a; Gonzalez-Escalona y col., 2008).

1.2 Epidemiología de *V. parahaemolyticus* pandémico en Chile

Previo al año 1998, las diarreas producidas por ingestión de mariscos crudos eran poco comunes en Chile. La situación cambió drásticamente en 1998 cuando se observó un gran brote en Antofagasta (23°39'S a 70°24'W), que generó más de 300 casos clínicos (Córdova y col., 2002). Este brote fue sucedido por otros que comenzaron en 2004 en la Región de Los Lagos.

La Región de los Lagos se extiende desde 40°13'S a 44°3'S y produce aproximadamente un 80% de los mariscos en Chile (<http://www.sernapesca.cl>). Se ha aceptado que los mariscos de esta región causan la mayoría de los casos clínicos de diarreas por *V. parahaemolyticus* observados en nuestro país. El primer brote de diarrea asociado a consumo de mariscos se registró el año 2004. En el año 2005, los casos reportados por el Ministerio de Salud alcanzaron un máximo de 3.600 en la Región de Los Lagos y 10.984 en todo el país. Desde entonces, el número de casos ha oscilado anualmente entre 450 y 1.100 sólo en la Región de Los Lagos y entre 1.500 y 3.500 en todo el país. (Cabello y col., 2007; Olea y col., 2005; Fuenzalida y col., 2006; Gonzalez-Escalona y col., 2005; Fuenzalida y col., 2007; Harth y col., 2009). Inesperadamente, el número de casos en la Región de Los Lagos descendió drásticamente desde 1.143 en 2008 a 477 en el 2009 (García y col., 2009), y a sólo un caso el año 2010 y 4 en 2011, lo cual muestra una posible desaparición de *V. parahaemolyticus* pandémico en las costas del sur de Chile. (<http://epi.minsal.cl/epi/html/elvigia/elvigia.htm>), o al menos una disminución hasta niveles indetectables. No obstante, desde que fue observada por primera vez en la

Región de Los Lagos el año 2004, la cepa clonal pandémica de *V. parahaemolyticus* proliferó en el litoral produciendo más de 8000 casos de diarrea (Figura 1). La proliferación del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* durante el tiempo que permaneció en esta región ofrece una oportunidad única para estudiar los cambios que sufrió esta población clonal en su ambiente natural de propagación mediante la caracterización de las variantes generadas que han prevalecido.

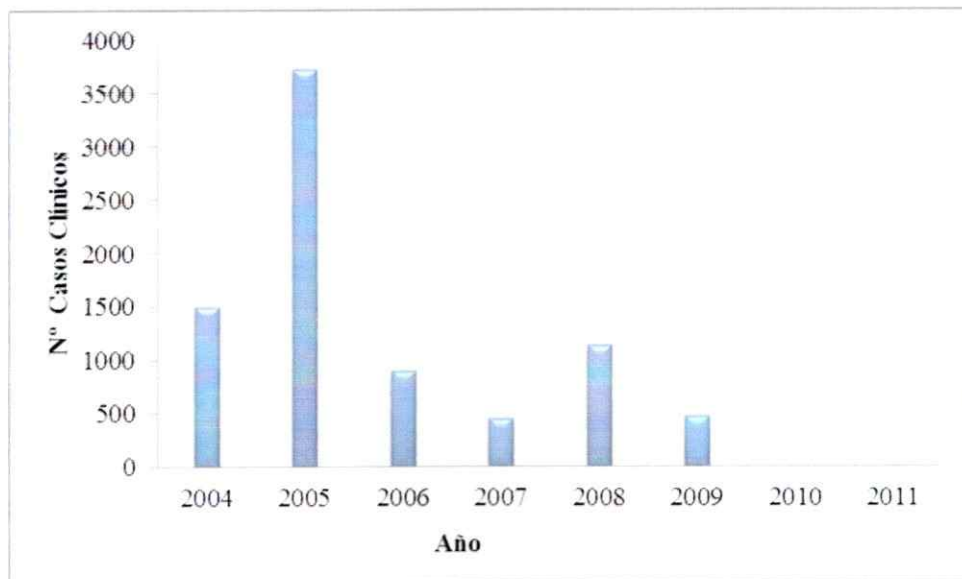


Figura 1. Número de casos clínicos ocurridos en la Región de Los Lagos a partir del año 2004.

La epidemiología de *V. parahaemolyticus* pandémico en la Región de Los Lagos se ha estudiado desde el año 2004 mediante la caracterización de cepas de *V. parahaemolyticus* de origen clínico y ambiental, lo que ha permitido calcular las cargas de *V. parahaemolyticus* total y pandémico presentes en la Región de Los Lagos,

determinar la diversidad de *V. parahaemolyticus* en el ambiente y detectar variantes generadas dentro de la población clonal de *V. parahaemolyticus* pandémico.

2. Mecanismos de variación génica en *V. parahaemolyticus*

La divergencia genética de las cepas bacterianas surge aleatoriamente, debido a mutaciones no letales que se acumulan con el tiempo (Maslow y col., 1993).

La variabilidad genética en las bacterias puede producirse por diversos mecanismos dentro de los cuales se encuentran mutaciones puntuales, rearrreglos genómicos y adquisición de nuevo material genético por transferencia génica horizontal (TGH). Este último mecanismo se refiere a la adquisición de genes foráneos provenientes de otro microorganismo. Los genes adquiridos pueden ser integrados en su genoma a través de recombinación homóloga, recombinación sitio específica, transposición o pueden permanecer en forma extracromosomal como plasmidios (Jain y col., 2003; Boucher y Stokes, 2006).

Dentro de los principales elementos que están involucrados en TGH se encuentran las islas genómicas, los plasmidios y los fagos (Gal-Mor y Finlay, 2006). Estudios recientes han demostrado que en *V. parahaemolyticus* la TGH puede producir mayor variación genética que las mutaciones puntuales (Gonzalez-Escalona y col., 2008). A pesar que se conoce que la TGH ocurre a través de tres modos principales que son transformación, conjugación y transducción (Jain y col., 2002) es improbable que la transformación tenga gran importancia en *Vibrio* ya que no se conoce un grupo que sea naturalmente competente en este género. Sin embargo, existe una gran cantidad de

plasmidios conjugativos y bacteriófagos asociados a diversas especies de *Vibrio*, que sugieren que los mayores modos de transferencia lateral en este género son la conjugación y la transducción (Boucher y Stokes, 2006).

2.1 Diversidad genética dentro de la población clonal de *V. parahaemolyticus*.

Los clones bacterianos son definidos como aislados relacionados que son indistinguibles uno de otro por una variedad de métodos de tipificación molecular (Farber, 1996). A pesar de la coherencia del grupo clonal pandémico de *V. parahaemolyticus*, ocasionalmente se han encontrado diferencias en serotipos y en otras propiedades que han indicado la emergencia de variantes dentro de este grupo (Bag y col., 1999). Hasta la fecha se han identificado al menos 22 serotipos: O3:K6; O3:K59; O4:K68; O1:K25; O1:KUT; O4:K12; O1:K41; O1:K56; O3:K75; O4:K8; O4:KUT; O5:KUT; O5:K17; O5:K25; O1:K33; O2:K3; OUT:KUT; O3:KUT; O3:K5; O4:K4; O4:K10; y O6:K18, (UT indica no tipificable) que han emergido del clon pandémico (Laohaprerthisan y col., 2003; Nair y col., 2007; Chowdhury y col., 2004; Harth y col., 2009). Una comparación de los grupos génicos relacionados con el serotipo entre las cepas pandémicas O3:K6 y O4:K68, sugiere que los rearrreglos dinámicos de una gran secuencia de DNA son esenciales para que ocurra conversión de serotipo (Sozhamannan y col., 1999). Además se ha visto que las cepas pandémicas O1:K25 y O4:K68 poseen una secuencia de inserción en *rjg* que no está presente en las cepas no pandémicas con estos serotipos. Esta región *rjg* ha sido reportada como un punto caliente para la ocurrencia de rearrreglos genómicos en *V. cholerae* (Sozhamannan y col., 1999). Además

se ha determinado que la delección de esta región *rjg* juega un rol crítico en las transiciones de antígenos O y K en *V. parahaemolyticus* pandémico (Okura y col., 2008).

Por otro lado, un estudio de hibridación de genómica comparativa basada en microarreglos (M-GCH, *Microarray-based comparative genomic hybridization*) que incluyó un total de 4021 genes, permitió distinguir y agrupar un total de 39 cepas pandémicas en 5 subgrupos (Han y col., 2008). La variación entre estos 5 subgrupos se localizó principalmente en las islas genómicas y en los genes que codifican para los antígenos O y K.

Se han descrito además otras variantes que presentan diferencias menores en los patrones de RFLP-PFGE y AP-PCR (Chowdhury y col., 2004), otras que han perdido el *orf8* (Chowdhury y col., 2004) y otras que presentan plasmidios que van desde 1.8 a 140 Kb, que no fueron observados en las cepas iniciales (Martinez-Urtaza y col., 2004).

En Chile hasta el año 2007 más del 95% de los casos clínicos fue relacionado con la cepa pandémica clásica de *V. parahaemolyticus* O3:K6. Sin embargo, en el año 2007, gran parte de los casos clínicos fue producido por variantes con un nuevo serotipo O3:K59 (Harth y col., 2009). Otro gran grupo de variantes detectadas en Chile a partir del año 2005 correspondió a aquellas cepas que contenían un plasmidio de 42 Kb que corresponde a un fago telomérico temperado (Zabala y col., 2009). Ocasionalmente, se han detectado además variantes en el serotipo, variantes que carecen de *toxRS/new* (García y col., 2009), variantes que contienen plasmidios, y otras que presentan diferencias menores en DGREA.

La poca variación que se ha observado en esta población clonal con los métodos utilizados hasta el momento, no permite distinguir mayormente entre aislados, y en consecuencia, no permite rastrear las cepas de los brotes de diarrea causados por *V. parahaemolyticus* pandémico. Dos de los objetivos primarios en las investigaciones de brotes bacterianos producidos en alimentos son: identificar la fuente de exposición del patógeno en el consumo humano y estudiar el sitio donde se generó la exposición del patógeno, debido al potencial riesgo que significa ese lugar. Sin embargo, estos objetivos son difíciles de conseguir si la bacteria que causa los brotes no puede ser diferenciada, como ocurre con *V. parahaemolyticus* pandémico.

Una posible solución a este problema se encuentra en el estudio de las regiones hipervariables del genoma de *V. parahaemolyticus* pandémico. Dentro de las regiones más variables del genoma se encuentran las regiones repetidas de DNA. En los genomas de procariontes, estas regiones representan menos del 5% del genoma y dentro de estas, las más comunes son las secuencias cortas repetidas de DNA que pueden ser encontradas dispersas en todo el genoma, interespaciadas con secuencias no repetitivas (CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (Godde y Bickerton, 2006) o arregladas en serie (TRs, *tandem repeats*) (Eisen, 1999).

2.2 Regiones de DNA interespaciadas con secuencias no repetitivas (CRISPR).

Una de las regiones que evolucionan rápidamente y que resultan ser hipervariables son los CRISPR, las cuales son repeticiones de entre 24-47 pares de bases con espaciadores que varían de 26 a 72 pares de bases. Los arreglos de CRISPR, la

región líder y los genes CAS (*CRISPR-associated*) forman en conjunto el sistema CRISPR (Figura 2a) y varían grandemente entre especies y entre cepas de una misma especie (Barrangou y col., 2007).

La adición de nuevos espaciadores casi siempre ocurre por inserción en el extremo 5' al lado de la región líder, así, los espaciadores más viejos tienen mayor distancia del líder y son frecuentemente comunes entre aislados mientras que los nuevos espaciadores más cercanos al líder son únicos (Sorek y col., 2008). La delección de unidades repetidas o de espaciadores también es frecuentemente observada y sería una forma de evitar el crecimiento desmesurado de los CRISPR. Sin embargo, no está claro si estas delecciones ocurren en forma activa o si se producen pasivamente por recombinación homóloga.

Existe evidencia filogenética que muestra que la TGH fue probablemente la responsable del movimiento de CRISPR entre genomas distantemente relacionados y se cree que se mueven como una sola identidad (Godde y Bickerton, 2006). Las secuencias espaciadoras de los CRISPR corresponden a secuencias presentes en elementos genéticos transmisibles tales como los bacteriófagos y los transposones conjugativos. Más aún, la presencia de megaplasmidios que contienen CRISPR sugiere un modo de transmisión en el cual los CRISPR se han diseminado ampliamente a través de los procariontes. Estas evidencias han llevado a proponer que los CRISPRs y sus genes asociados representan una forma de elemento genético móvil que se mueve vía TGH y que constituye un elemento de resistencia adquirida frente a la infección por bacteriófagos (Godde y Bickerton, 2006; Barrangou y col., 2007).

Estudios realizados en *Streptococcus termophilus* DGCC7710 con el fago virulento tipo *pac* 2972 y 858 mostraron que los CRISPR juegan un rol en el desarrollo de mutantes insensibles a la infección por bacteriófagos. En respuesta a los desafíos con el fago 858 y/ o 2972, *S. termophilus* DGCC7710 integra nuevos espaciadores derivados de los genomas de los fagos, generando un fenotipo fago-resistente. La especificidad de la resistencia está determinada por la identidad entre el espaciador y la secuencia del fago (Barrangou y col., 2007). Mientras que la inserción de nuevos espaciadores produce resistencia al fago (Figuras 2b y 2c), una pequeña población de fagos es capaz de infectar a los mutantes insensibles a infección por bacteriófagos. Esto sugiere que tanto el *locus* CRISPR como otras regiones genómicas del fago están sujetos a cambios evolutivos rápidos (Barrangou y col., 2007; Sorek y col., 2008).

Un estudio reciente demostró que en una población clonal de la especie *Leptospirillum* la evolución de los espaciadores en las regiones CRISPR fue bastante rápida como para generar diversidad genética dentro de la población y promover individualidad celular. Por otro lado, se describió que estos *loci* están entre las estructuras que evolucionan más rápido en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* cuyas cepas varían en el número de repetidos y en la presencia o ausencia de espaciadores específicos (Groenen y col., 1993). Basándose en esta observación, Kamerbeek (Kamerbeek y col., 1997) desarrolló el método de tipificación de los oligonucleótidos espaciadores para la detección de cepas variantes. Este método ha sido ampliamente utilizado para tipificar *M. tuberculosis* y *Corynebacterium diphtheriae*.

En *V. parahaemolyticus* se ha identificado una posible región CRISPR (NC_004605_2; <http://crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php/>) en el cromosoma II,

la que está compuesta por tres regiones repetidas, y cuyo repetido de consenso comprende 28 pb y dos regiones espaciadoras.

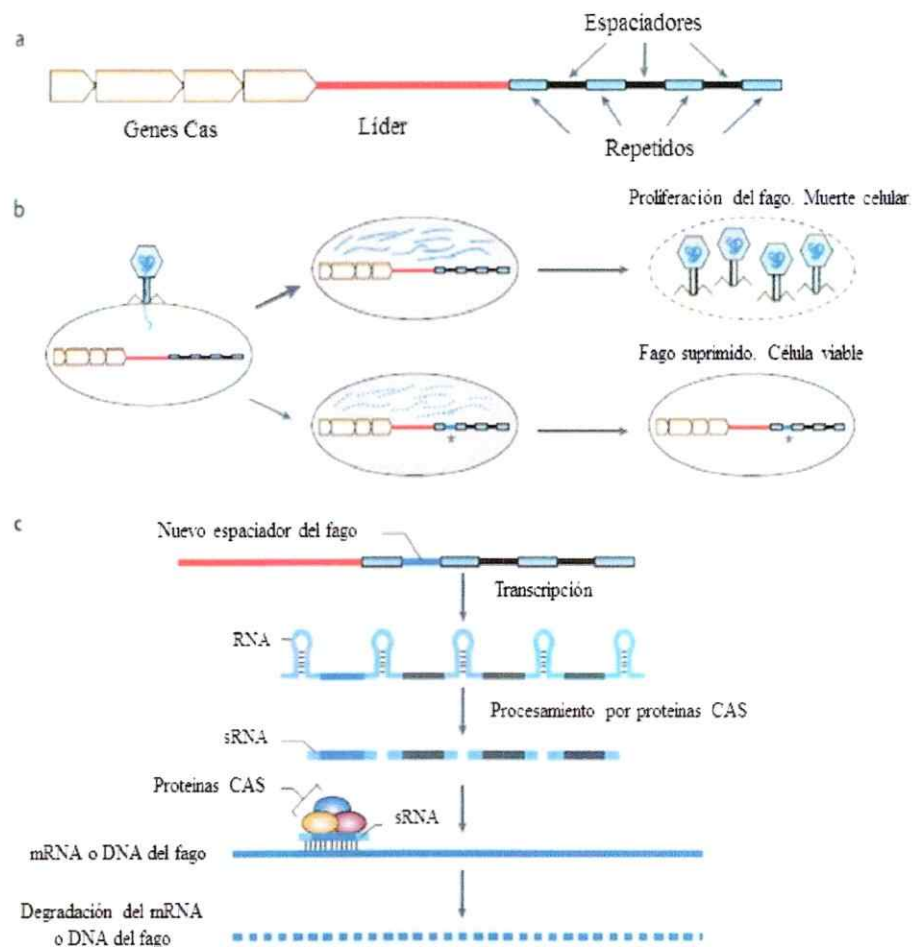


Figura 2. Estructura y función de CRISPR

a. Estructura típica de los CRISPRs. **b.** Los CRISPRs adquieren espaciadores derivados de fagos que proveen inmunidad. Luego del ataque del fago, los ácidos nucleicos del fago proliferan en la célula y se producen nuevas partículas, llevando a la muerte de la mayoría de las bacterias sensibles. Un número pequeño de bacterias adquiere espaciadores derivados del fago (asterisco) y sobreviven probablemente por degradación del mRNA o DNA mediado por CRISPR. **c.** Posible modelo simplificado para la acción de CRISPR. El arreglo de espaciadores-repetidos es transcrito en un solo RNA y los repetidos asumen estructura secundaria. Las proteínas Cas reconocen esta estructura y procesan el RNA para producir RNAs pequeños (sRNA). En conjunto los sRNA con las proteínas Cas se aparean con los ácidos nucleicos del fago induciendo su degradación. Figura copiada de Sorek y col., 2008.

2.3 Regiones de DNA repetidas en serie (TRs).

Las regiones de DNA repetidas en serie, (*tándem repeats*, TRs) son secuencias cortas de DNA (denominadas motivos o unidades repetidas) que están repetidas en serie, es decir, una al lado de la otra y varían en el número de repetidos (*variable number tandem repeats*, VNTRs). Representan uno de los *loci* genómicos más diversos en las poblaciones bacterianas (Eisen, 1999; Kimura y col., 2008).

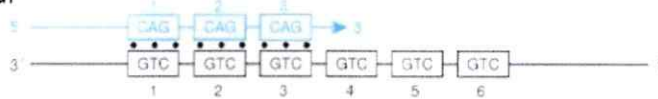
En cepas individuales que pertenecen a una misma especie bacteriana se mantienen las mismas secuencias de DNA repetidas en tándem, pero varían en el número de repetidos, debido a que nuevas secuencias repetidas se introducen o delecionan por apareamientos fallidos que ocurren por desplazamiento de una hebra durante la replicación del DNA (*slipped strand mispairing*, SSM) (Schlötterer y Tautz, 1992). La variación en el número de copias repetidas ocurre por inserción o deleción de uno o más repetidos dependiendo si el bucle de repetidos se forma en la hebra naciente o en la hebra templado (Figura 3).

Cuando el cambio involucra una gran número de repetidos, se cree que ocurre más bien por recombinación que por SSM, aunque este tipo de cambios ocurren en baja frecuencia y se cree que SSM es el mecanismo mutacional predominante (Eisen, 1999).

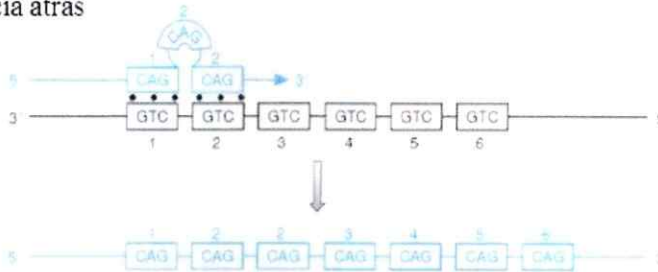
Aunque muchos VNTRs no tienen un efecto fenotípico y generan una variación genética neutral, algunos VNTRs pueden alterar funciones biológicas importantes. Algunos VNTRs ubicados en la región promotora afectan diferencialmente la transcripción de genes ubicados río abajo, mientras que otros afectan la secuencia

aminoacídica de proteínas y no sólo los niveles de transcripción (Van Belkum y col., 1998).

Replicación Normal



Resbalamiento hacia atrás
causa inserción.



Resbalamiento hacia
adelante causa deleción.

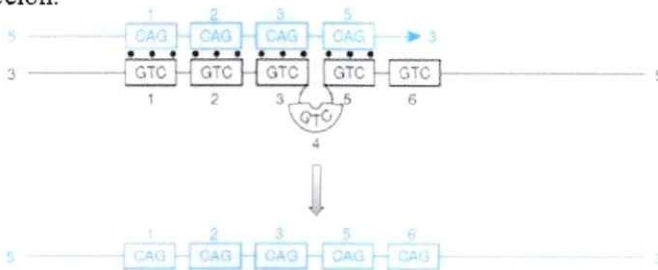


Figura 3. El mal apareamiento de hebras durante la replicación del DNA causa una inserción o una deleción en la nueva hebra sintetizada dependiendo si la formación del bucle ocurre en la hebra nueva que se sintetiza (resbalamiento hacia atrás) o en la hebra molde (resbalamiento hacia adelante). Figura copiada de Levinson y Gutman, 1987.

Otros *loci* VNTRs ubicados entre o cerca de genes se han asociado con rasgos de fenotipo alterado y algunos efectos selectivos (van Belkum y col., 1998). A pesar de estos ejemplos, la mayoría de los VNTRs no se asocia con efectos biológicos conocidos y la variación en VNTRs es probablemente selectivamente neutral (Schlötterer, 2000).

La rápida evolución de estas regiones de DNA provee un alto nivel discriminatorio para tipificar bacterias, lo cual ha provocado que los VNTRs sean considerados muy útiles como marcadores moleculares epidemiológicos (Kimura y col., 2008). A la fecha, el análisis de VNTR en locus múltiple (*Multiple locus VNTR analysis*, MLVA) ya ha sido desarrollado para muchas especies médicas relevantes y puede ser usada para distinguir entre bacterias que presentan una alta identidad de genoma y así trazar brotes o formas de diseminación bacteriana (Van y col., 2007; Lindstedt y col., 2005). Este sistema ha sido altamente exitoso en estudios epidemiológicos de patógenos bacterianos genéticamente homogéneos tales como *Yersinia pestis* (Girard y col., 2004), *V. cholerae* O1 y O139 (Ghosh y col., 2008), *Escherichia coli* O157:H7 (Pei y col., 2008), *Bartonella henselae* (Monteil y col., 2007) y *Mycobacterium leprae* (Hall y col., 2010) y provee además una discriminación genética en poblaciones a múltiples escalas geográficas proporcionando información muy útil si los brotes ocurrieron a nivel mundial, regional o local. Ha sido usado además en el estudio de la evolución de *Burkholderia pseudomallei* en el hospedero durante la infección (Price y col., 2010).

El alto poder resolutivo del MLVA ha sido recientemente mostrado en *V. parahaemolyticus*. Un MLVA de ocho VNTRs de 28 cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* O3:K6 aisladas desde casos clínicos, produjo 28 patrones de VNTRs

diferentes (Kimura y col., 2008). Por otro lado, el análisis de 36 aislados pandémicos pertenecientes al complejo clonal pandémico aislado en Chile, produjo 26 patrones diferentes (Harth-Chu y col., 2009). Finalmente un MLVA de un número representativo de cepas de Asia, Perú y Chile de *V. parahaemolyticus* pandémico usando siete *loci* polimórficos, permitió dividir la población en dos grupos genéticamente diferentes. Uno de estos agrupó cepas de la población original asiática en conjunto con cepas que llegaron a Perú y Chile en 1997 (Ansede-Bermejo y col., 2010).

A pesar de lo exitoso que han sido los VNTRs en estudios epidemiológicos y en la diferenciación de cepas genéticamente homogéneas, se sabe muy poco acerca de la tasa a la cual mutan estas secuencias, los factores que la afectan y los mecanismos por los cuales ocurren estas mutaciones en estos *loci* (Vogler y col., 2006). La naturaleza clonal de la reproducción bacteriana permite determinar relaciones genéticas sin la desviación observada entre organismos que se reproducen sexualmente. En consecuencia, el conocimiento de las tasa de mutación pueden aumentar el uso de los VNTRs como marcadores epidemiológicos permitiendo el desarrollo de modelos probabilísticos mutacionales, los cuales son de gran utilidad en las investigaciones epidemiológicas en los brotes producidos por patógenos (Vogler y col., 2006; Vogler y col., 2007).

En este trabajo de tesis se formuló la siguiente hipótesis:

La caracterización de diferentes aislados de *V. parahaemolyticus* pandémico clonal permitirá detectar cambios genómicos, inferir como se han generado y en base a estas variaciones, determinar cómo se ha ido diversificando la población.

El objetivo general fue:

Detectar y caracterizar variantes del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* con el fin de observar posibles cambios genómicos, inferir su mecanismo de generación y en base a estas variaciones, determinar la diversificación de la población.

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar la presencia de *V. parahaemolyticus* pandémico en muestras clínicas y ambientales.
2. Detectar y caracterizar aislados clonales variantes que presenten cambios en:
 - 2.1 Marcadores genéticos tradicionales, DGREA, serotipo y presencia de fago Vp58.5.
 - 2.2 Regiones consideradas de alta variabilidad genómica (CRISPR y VNTRs).
3. Inferir el mecanismo generador de los cambios genómicos detectados.
4. Determinar la diversidad de la población clonal de *V. parahaemolyticus* y las interrelaciones entre los aislados variantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Presencia de *V. parahaemolyticus* pandémico en las costas del sur de Chile.

1.1 Aislamiento de *V. parahaemolyticus* a partir de muestras ambientales y clínicas.

Las muestras ambientales fueron colectadas desde mariscos de la zona intermareal en la costa del Seno de Reloncaví (Puerto Montt) en la Región de Los Lagos entre los veranos del año 2008 al año 2011. Las muestras obtenidas entre 2004 y 2007 fueron previamente aisladas y caracterizadas (Fuenzalida y col., 2006; Gonzalez-Escalona y col., 2005; Fuenzalida y col., 2007; Harth y col., 2009). Los mariscos fueron almacenados en bolsas de polietileno (ziploc) y mantenidos en cajas con hielo hasta el momento de su análisis. El enriquecimiento, aislamiento y caracterización se realizó como lo describe el Manual de Bacteriología Analítica del FDA (*Food and Drug Administration*, US) (Kaysner y DePaola, 2004). Brevemente, 50 g de 10 especímenes fueron macerados con una Minipimer Phillips y homogenizados en 450 mL de tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS). El homogenizado fue enriquecido para *V. parahaemolyticus* en una serie de 3 tubos que contenían agua peptonada alcalina (*Alkaline Peptone Water*, APW) en diluciones seriadas, con el fin de determinar la carga bacteriana por el método del número más probable (NMP). Luego estos 3 tubos se incubaron toda la noche a 37°C y aquellos tubos que mostraron crecimiento fueron sometidos a PCR múltiplex para detectar los genes *tlh*, *tdh* y *trh* (Bej y col., 1999). Las

cargas de *V. parahaemolyticus* total y pandémico se calcularon de acuerdo al número de tubos positivos para *tlh* y para *tdh* respectivamente. Los enriquecimientos que resultaron positivos se inocularon en placas de CHROMagar *Vibrio* (CHROMagar Microbiology, Paris, Francia) y se purificaron aquellas colonias bacterianas con la morfología y el color esperado. En aquellos casos en que se amplificó el fragmento *tlh* con un tamaño menor al esperado y en que las colonias tenían una morfología o color diferente en CHROMagar *Vibrio*, se tomaron inóculos de los cultivos enriquecidos iniciales, a partir de los cuales se obtuvieron estas colonias y fueron sembrados en placas de agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa). Se escogió una colonia de cada placa para ser identificada mediante Api20E para enterobacterias (Biomérieux, Hazelwood, MO) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El análisis filogenético de las secuencias de *tlh* fue llevado a cabo mediante la construcción de un dendrograma de disimilitud con el programa TREECON 1.3b (Van de Peer y DeWachter, 1994).

Las muestras clínicas fueron obtenidas de hisopados rectales de pacientes con diarrea aguda atendidos en el Hospital Regional de Puerto Montt durante el tiempo de los brotes (González-Escalona y col., 2005). Estas muestras fueron mantenidas en agar blando hasta su análisis en laboratorio donde fueron plaqueadas en CHROMagar *Vibrio* y se purificaron aquellas colonias bacterianas con la morfología y el color esperado.

1.2 Condiciones de cultivo y extracción de DNA.

Las cepas de *V. parahaemolyticus* fueron cultivadas en caldo Luria–Bertani (LB) suplementado con 3% NaCl (p/v). El DNA bacteriano fue extraído desde los cultivos crecidos toda la noche en un agitador rotatorio en caldo LB 3% NaCl, usando el kit de purificación de *DNA Wizard Genomic* (Promega Madison, WI). La concentración de DNA fue evaluada comparando la intensidad de la banda de interés en una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, con cantidades conocidas de DNA de λ *HindIII* como estándar.

1.3 Caracterización genotípica por DGREA.

La caracterización por comparación de fragmentos de restricción del genoma total de las cepas de *V. parahaemolyticus* fue realizada por DGREA utilizando *NaeI* según lo indicado por Fuenzalida (Fuenzalida y col., 2006). Brevemente, el DNA fue extraído desde 1 mL de un cultivo crecido toda la noche y suspendido en 50 μ L de TE (Tris 0.01 M, EDTA 0.001 M, pH 8.0). Una alícuota de 10 μ L del DNA se digirió con 5U de *NaeI* (Promega, Madison, WI) a 37°C for 2 h. Las muestras fueron incubadas con proteinasa K a una concentración final de 0.2 mg/mL por 1 h a 37°C. Aproximadamente 8 μ L de la digestión se mezclaron con 2 μ L de buffer de carga y la electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 7.5%, por 3 h a 100 V. La tinción se realizó con nitrato de plata. Sólo aquellos fragmentos con un tamaño entre 500 a 2500 pb fueron analizados.

1.4 Caracterización fenotípica de acuerdo a los serotipos.

La determinación de los antígenos O y K de las cepas de *V. parahaemolyticus* se realizó por aglutinación en portaobjeto utilizando antisueros de conejo obtenidos de Seiken (Denka Seiken, Japan). El serotipo K fue determinado utilizando nueve antisueros polivalentes KI a KIX (cada uno de los cuales agrupa 7 serotipos K más K70 y K71). En los casos en que se observó aglutinación positiva, se confirmó con antisero monovalente para determinar el antígeno K exacto. El serovar O fue determinado para O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10 y O11.

2. Identificación de aislados variantes de *V. parahaemolyticus* pandémico.

2.1 Detección de variantes en base a marcadores genéticos tradicionales, DGREA, serotipo y presencia de fago Vp58.5.

Los aislados en los que se amplificaron *tlh* y *tdh* y no se detectó *trh* (Bej y col., 1999) fueron identificados como posible *V. parahaemolyticus* pandémico. En estos casos se procedió a identificar la presencia de los marcadores genéticos *orf8* (Laohaprertthisan y col., 2003) y *toxRS/new* (Matsumoto y col., 2000). Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando aproximadamente 10 ng de DNA por tubo de reacción y las amplificaciones para *orf8* y *toxRS/new* se realizaron según lo indicado previamente (Laohaprertthisan y col., 2003; Matsumoto y col., 2000). La caracterización del genoma total fue realizada por DGREA y los patrones de restricción fueron

comparados con el patrón de VpKX que es la cepa tipo de *V. parahaemolyticus* pandémico. Los aislados además fueron clasificados por su serotipo e identificados como *V. parahaemolyticus* pandémico por la presencia del serotipo O3:K6. Los requisitos para determinar si las cepas eran variantes en los marcadores genéticos fue considerar todas aquellas cepas que contenían *tlh*, *tdh* y tenían un patrón DGREA idéntico a VpKX, pero que no amplificaban *orf8* o *toxRS/new*. En el caso de DGREA, se consideraron variantes todas aquellas cepas que tenían presentes todos los marcadores genéticos de *V. parahaemolyticus* pandémico pero presentaban variaciones en menos de un 5% de las bandas respecto al patrón de VPKX. Finalmente, se consideraron variantes en serotipo a las cepas que contenían los marcadores genéticos de *V. parahaemolyticus* y el patrón de DGREA esperado, y presentaban un serotipo diferente a O3:K6.

La presencia o ausencia del fago Vp58.5 de 42 Kb fue determinada mediante extracción de DNA por lisis alcalina, que fue realizada usando el sistema *Plasmid Mini Kit* (Omega Bio Tek) y la observación posterior en una electroforesis en gel de agarosa (Zabala y col., 2009)

2.2 Detección de variantes en CRISPRs y VNTRs.

2.2.1 Cepas.

Cincuenta cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicas obtenidas a partir de brotes de diarrea ocurridos en el sur de Chile (identificadas con el prefijo PMC) o de mariscos (cepas ambientales, identificadas con el prefijo PMA) entre los años 2004 y 2009 fueron incluidas en este estudio para la identificación de variantes de CRISPR y VNTRs (Tabla

1). El último dígito que sucede a los prefijos PMC y PMA corresponde al año de aislamiento. Cepas de los años 2010 y 2011 no fueron consideradas debido a que estos años no se registró la presencia de *V. parahaemolyticus* pandémico. Las 50 cepas fueron cultivadas en caldo Luria–Bertani (LB) suplementado con 3% NaCl (p/v) y crecidas toda la noche en un agitador rotatorio. A partir de estos cultivos se extrajo el DNA bacteriano usando el kit de purificación de *DNA Wizard Genomic* (Promega Madison, WI) el cual se utilizó para determinar las posibles variaciones en CRISPR y VNTRs.

Tabla 1. Cepas pandémicas aisladas en la Región de Los Lagos entre 2004 y 2009.

Cepa	País	Año	Referencia	Cepa	País	Año	Referencia
PMA114	Chile	2004	González-Escalona y col., 2005	PMC68	Chile	2004	González-Escalona y col., 2005
PMA24.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006	PMC47	Chile	2004	González-Escalona y col., 2005
PMA115.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006	PMC18.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006
PMA37.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006	PMC2.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006
PMA39.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006	PMC57.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006
PMA43.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006	PMC58.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006
PMA44.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006	PMC10.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006
PMA9.5	Chile	2005	Fuenzalida y col., 2006	PMC10.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007
PMA25.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC19.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007
PMA26.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC5.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007
PMA24.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC15.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007
PMA15.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC15.7	Chile	2007	Harth y col., 2009
PMA21.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC29.7	Chile	2007	Harth y col., 2009
PMA22.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC72.7	Chile	2007	Harth y col., 2009
PMA23.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC58.7	Chile	2007	Harth y col., 2009
PMA29.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC1.7	Chile	2007	Harth y col., 2009
PMA38.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC15.8	Chile	2008	García y col., 2009
PMA30.6	Chile	2006	Fuenzalida y col., 2007	PMC20.8	Chile	2008	García y col., 2009
PMA18.8	Chile	2008	García y col., 2009	PMC26.8	Chile	2008	García y col., 2009
PMA23.8	Chile	2008	García y col., 2009	PMC7.8	Chile	2008	García y col., 2009
PMA24.8	Chile	2008	García y col., 2009	PMC30.8	Chile	2008	García y col., 2009
PMC49	Chile	2004	González-Escalona y col., 2005	PMC29.9	Chile	2009	García y col., 2009
PMC36	Chile	2004	González-Escalona y col., 2005	PMC31.9	Chile	2009	García y col., 2009
PMC60	Chile	2004	González-Escalona y col., 2005	PMC51.9	Chile	2009	García y col., 2009
PMC65	Chile	2004	González-Escalona y col., 2005	PMC69.9	Chile	2009	García y col., 2009

2.2.2 Detección de variantes en CRISPR.

Se amplificó por PCR la región descrita como CRISPR para *V. parahaemolyticus* (crispr.u-psud.fr/Server/CRISPRfinder.php/) utilizando los partidores VpCRISPR-F y VpCRISPR-R que flanquean esta región dando un producto de tamaño esperado de 500 pb:

VpCRISPR-F: 5'-AGCTATGGGCTAGGCAATACCG-3'

VpCRISPR-R: 5'-TCGCTTTTTGGCTGAGCCTGG-3'.

Los amplicones obtenidos a partir de las 50 cepas analizadas fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata. Para detectar las posibles variaciones presentes en la secuencia de estas regiones genómicas, se purificaron 10 productos de PCR escogidos al azar, utilizando el sistema “*Wizard SV Gel or PCR Clean-Up System*” (Promega, USA) y se secuenciaron en ambas direcciones por MacroGen (South Korea), utilizando los mismos partidores empleados en las amplificaciones. Las secuencias de DNA se analizaron individualmente utilizando Bioedit.

2.2.3 Detección de variantes en VNTRs

Se amplificaron ocho regiones repetidas en tándem descritas para los cromosomas 1 y 2 de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 en las 50 cepas seleccionadas utilizando los partidores descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados para amplificar ocho VNTRs descritos para *V. parahaemolyticus*.

Locus	Partidor	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	Referencia
VPTR1	VPTR1 F	*NED-TAACAACGCAAGCTTGCAACG	253	Kimura y col., 2008
	VPTR1 R	TCATTCTCGCCACATAAECTCAGC		
VP2-07	VP2-07 F	*VIC-TGATTTTGAAGCAGCGAAGA	296	Harth-Chu y col., 2009
	VP2-07 R	TTTGTGACTGCTGTCCTTGC		
VPTR3	VPTR3 F	*PET-CGCCAGTAATTCGACTCATGC	331	Kimura y col., 2008
	VPTR3 R	AAGACTGTCCCCGTCGCTGA		
VPTR4	VPTR4 F	*NED-AAACGTCTCGACATCTGGATCA	227	Kimura y col., 2008
	VPTR4 R	TGTTTGGCTATGTAACCGCTCA		
VPTR5	VPTR5 F	*NED-GCTGGATTGCTGCGAGTAAGA	204	Kimura y col., 2008
	VPTR5 R	AACTCAAGGGCTGCTTCGG		
VPTR6	VPTR6 F	*6-FAM-TGTCGATGGTGTCTGTTCCA	316	Kimura y col., 2008
	VPTR6 R	CTTGACTTGCTCGCTCAGGAG		
VPTR7	VPTR7-1F	*VIC-TATCTACAAAGGTGGCGGAGAT	200	Harth-Chu y col., 2009
	VPTR7-1R	AAGGTGTACTTGTTCAGACG		
VPTR8	VPTR8 F	*PET-ACATCGGCAATGAGCAGTTG	301	Kimura y col., 2008
	VPTR8 R	AAGAGGTTGCTGAGCAAGCG		

*En negrita se encuentra el fluoróforo unido en cada partidor sentido.

Los ocho *loci* seleccionados para el análisis de las cepas fueron amplificados en 3 grupos de PCR múltiplex denominados MultiA (VPTR7-1, VPTR5), MultiB (VPTR1, VPTR8) y MultiC (VP2-07, VPTR4, VPTR3, VPTR6). Los partidores sentido fueron marcados con los fluoróforos VIC, PET, NED y 6-FAM (*Applied Biosystems*, USA) en el extremo 5'. Los partidores antisentido fueron sintetizados sin marcaje (*Operon*, Germany) (Tabla 2). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo usando el sistema *Qiagen Multiplex PCR kit* (*Qiagen*, Alemania) tal como fue descrito por Harth-Chu (Harth-Chu y col., 2009)

Los productos de PCR se purificaron usando el sistema de purificación *MinElute PCR Purification Kit* (*Qiagen*) y el DNA fue eluido en el tampón EB. Previo a la electroforesis capilar, los productos de PCR de las tres reacciones múltiples fueron diluidos en agua destilada a 1:100 para MultiA y MultiB y 1:200 para MultiC. 1 μ L de los productos de PCR diluidos fueron mezclados con 8.85 μ L *HiDi Formamide* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) y 0.15 μ L de estándar *GeneScan LIZ1200* (*Applied Biosystems*), que contiene 68 fragmentos de simple hebra marcados en el rango de 20 a 1200 pb. Las muestras se dispusieron en una placa de microtitulación de 96 pocillos, desnaturadas por 3 minutos a 95°C y enfriadas en hielo por al menos 1 minuto. Luego la placa de microtitulación fue centrifugada brevemente a 500 rpm en una centrífuga *Multifuge1* (Heraeus, Germany). La electroforesis fue realizada en un secuenciador 3130xl (*Applied Biosystems*) equipado con capilares de 50 cm, usando el polímero POP-7, con los parámetros recomendados para el estándar *GeneScan LIZ1200*, por 2.5 h con un voltaje de corrida de 8.5 kV, y una inyección de 15 kV (Harth-Chu y col., 2009).

Cada locus de VNTR fue identificado con un color y se le asignó un tamaño utilizando el programa *GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems)* usando la configuración necesaria para el análisis de microsatélites.

El número de repetidos en los alelos fue estimado por sustracción de la región invariable del tamaño del amplicón dividido por el largo de la unidad repetida, como se determinó para la cepa de referencia RIMD2210633. El tamaño de alelos obtenidos por *GeneMapper* fue convertido en número de repetidos usando *Microsoft Excel* y la fórmula:

$$\text{Número de repetidos (pb)} = \frac{\text{Tamaño de fragmento (pb)} - \text{Región flanqueante (pb)}}{\text{Tamaño de la unidad repetida (pb)}}$$

3. Mecanismo de variación de VNTRs.

3.1 Clones y cepas bacterianas.

Se utilizaron cuatro clones diferentes de *V. parahaemolyticus* pandémico para realizar los subcultivos seriados, los pasajes seriados en paralelo (PSPEs) y el posterior análisis por MLVA. Estos fueron: VpKX-1, un clon obtenido desde una muestra de la cepa de referencia RIMD2210633 en 2005 y guardada en agar blando desde el 2005 (Makino y col., 2003); PMC57.5-1, PMC57.5-2, y PMC57.5-3, tres clones obtenidos desde una cepa aislada en 2005 de una muestra clínica proveniente de Puerto Montt, Región de Los Lagos y guardada en agar blando a temperatura ambiente.

En cuanto a las cepas nativas utilizadas en este estudio, a las cepas pandémicas del Sur de Chile obtenidas desde la Región de Los Lagos entre 2004 y 2009 (Tabla 1) se sumaron aislados chilenos que fueron colectados de la costa de Antofagasta en 1998 (Tabla 3) en el norte del país y cepas pandémicas de sudeste asiático que fueron recibidas de Nishibuchi (*Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University*) (Tabla 3). Los datos obtenidos para las cepas pandémicas provenientes de Tokio corresponden a aquellos reportados por Kimura (Kimura y col., 2008).

Tabla 3. Cepas pandémicas aisladas en la Región de Antofagasta (1998) y en Sudeste asiático (1996-1999).

Cepa	País	Origen	Año	Referencia
VpKX	Japón	Humano	1996	Makino y col., 2003
KX225	Tailandia	Humano	1996	Matsumoto y col., 2000
Vp81	India	Humano	1996	Matsumoto y col., 2000
JKYVP6	Japón	Humano	1997	Matsumoto y col., 2000
OP424	Japón	Humano	1998	Matsumoto y col., 2000
AN8373	Bangladesh	Humano	1998	Matsumoto y col., 2000
AN5034	Bangladesh	Humano	1998	Matsumoto y col., 2000
Vp2	Corea del sur	Humano	1998	Matsumoto y col., 2000
Vp47	Tailandia	Humano	1998	Matsumoto y col., 2000
KXV737	Tailandia	Humano	1999	Matsumoto y col., 2000
ATC208	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
ATC210	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
ATC213	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
ATC218	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
ATC219	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
ATC220	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
ATC224	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
ATC296	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
COC276	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005
COC284	Chile	Humano	1998	González-Escalona y col., 2005

3.2 Subcultivos seriados y PSPEs.

Los subcultivos seriados fueron realizados como fue descrito por Papadopoulos (Papadopoulos y col., 1999) con algunas modificaciones. Un solo clon proveniente de cada una de las cepas VpKX (clon VpKX-1) y de PMC57.5 (clon PMC57.5-1) fue suspendido en forma independiente en 5 mL de LB 3% e incubado a 37°C en un agitador rotatorio toda la noche. Cada uno de estos cultivos fue propagado en serie por 20 subcultivos de dilución 1:100, más 80 subcultivos de dilución 1:10.000. Al final de los 100 subcultivos, se escogieron 60 colonias de cada cultivo para el análisis de sus VNTRs.

Los experimentos de PSPE fueron realizados tal como lo describe Girard (Girard y col., 2004). Dos clones únicos derivados de PMC57.5 (clones PMC57.5-2 y PMC57.5-3) fueron crecidos independientemente en 5 mL de LB3% NaCl y 96 colonias provenientes de cada uno de estos cultivos fueron transferidas serialmente por 10 pasajes y al final de estos pasajes fueron utilizadas para el análisis de VNTRs.

En ambos experimentos mutacionales, el número total de generaciones fue calculado como: número de colonias analizadas x número de duplicaciones de cada colonia (en cada subcultivo) x el número de subcultivos totales.

3.3 Tasa de mutación y análisis del tipo de mutación.

El DNA fue extraído a partir de cada una de las colonias escogidas para análisis de los VNTRs con el sistema *DNA Wizard Genomic kit* (Promega Madison, WI). Las

reacciones de PCR de VNTRs y el posterior análisis de los amplicones fueron llevados a cabo tal como se describió previamente en detalle en la sección anterior (2.2.3). Se consideró como mutante aquella colonia que difería en al menos un VNTR con respecto al clon inicial.

La tasa de mutación se calculó como el número de mutantes dividido por el número de generaciones, para cada uno de los VNTRs de cada uno de los cuatro clones. Se calculó además la tasa de mutación combinada para cada clon, que correspondió a la suma de cada una de las tasas de mutación calculadas en forma independiente para cada VNTR. La distribución de los mutantes de VNTRs con deleciones o inserciones de 1, 2, 3, etc, unidades repetidas fue calculada para los datos combinados de las poblaciones examinadas de los cuatro clones de *V. parahaemolyticus* pandémico. La distribución geométrica se calculó usando la ecuación $P(X = n) = P(1-P)^{n-1}$ (Vogler y col., 2006) y se comparó con los datos obtenidos experimentalmente. Solo aquellos mutantes que difirieron en menos de tres unidades repetidas de sus vecinos más cercanos fueron considerados para realizar los cálculos de la distribución geométrica. Los otros mutantes fueron considerados como recombinantes y se dejaron fuera del análisis.

4. Diversidad e interrelación entre aislados variantes.

4.1 Relación filogenética entre mutantes o variantes nativas.

Se construyó un árbol de mínima expansión (*Minimum spanning tree*, MST), el cual fue calculado para las cuatro poblaciones diferentes obtenidas *in vitro* usando el

coeficiente *Manhattan* con los parámetros *offset=0* y *saturation= 3* en *Bionumerics* v 5.10 (*Applied 213 Maths, Sint-Martens- Latern, Belgium*). Los mismos parámetros se utilizaron para la construcción del árbol MST con las cepas variantes nativas.

4.2 Distancia Génica ($\delta\mu$)².

La distancia génica ($\delta\mu$)² fue calculada como se define por Goldstein (Goldstein y col., 1995) incluyendo la diferencia en el tamaño de cada VNTR, usando el programa *Microsatellite Analyzer* (MSA) versión 4.05. Para inferir el árbol filogenético se utilizó el método de construcción del árbol del vecino más cercano (*Neighbor-Joining*, NJ) del programa MEGA4 (Tamura y col., 2007), basado en la distancia genética $\delta\mu$ ². Para realizar este análisis, dos de las poblaciones estudiadas (Tokio y Puerto Montt) fueron divididas de acuerdo al año de aislamiento de sus aislados, en poblaciones más antiguas (a) y más recientes (r).

RESULTADOS

1. Epidemiología de *V. parahaemolyticus* en la Región de Los Lagos.

1.1 *V. parahaemolyticus* pandémico asociado a casos clínicos del 2008 al 2011.

Los aislados de casos de diarrea asociados a consumo de mariscos que ocurrieron en la Región de Los Lagos en los veranos desde el 2008 al 2011, se analizaron y agruparon de acuerdo a sus marcadores genéticos (*tlh*, *tdh*, y *trh*), a su patrón de DGREA y a su serotipo. En 2008 se analizaron cuarenta y seis casos y el 98% de ellos correspondió a la cepa clonal pandémica. El único aislado no pandémico obtenido desde un caso clínico fue negativo para los genes asociados con patogenicidad, *tdh* y *trh* (Tabla 4). En 2009 sólo un 64% de los 14 casos ocurridos se asoció a la cepa pandémica. En los aislados no pandémicos obtenidos a partir de cinco casos clínicos no se detectaron los genes relacionados a patogenicidad, *tdh* y *trh* y todos correspondieron al mismo grupo DGREA 34.6. Este grupo fue observado en relativa abundancia en mariscos desde el año 2006, y no había sido previamente observado en casos clínicos (Tabla 4). Durante el verano de 2010, solo se registró un caso de diarrea relacionada al consumo de mariscos crudos en el Hospital General de Puerto Montt y en este caso no se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* en sus heces. Lo mismo sucedió con los cuatro casos de diarrea asociados al consumo de mariscos crudos registrados durante el verano de 2011.

Tabla 4. Propiedades de aislados de *V. parahaemolyticus* obtenidos a partir de casos clínicos de diarrea durante los veranos de 2008 y 2009 en Puerto Montt, Chile. En 2010 y 2011 no se observó *V. parahaemolyticus* asociado a casos clínicos.

Aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> en 2008	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	Serotipo	DGREA	Vp58.5
<u>PMC3.8, 7.8, 12.8, 15.8, 17.8, 20.8, 24.8, 26.8, 30.8, 34.8, 41.8, 42.8, 45.8, 47.8, 2.8, 6.8, 8.8, 9.8, 11.8, 13.8, 16.8, 18.8, 19.8, 21.8, 23.8, 29.8, 31.8, 32.8, 33.8, 35.8, 37.8, 43.8, 44.8, 46.8</u>	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	-
<u>PMC1.8, 10.8, 22.8, 36.8, 38.8, 48.8, 49.8, 50.8</u>	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	+*
<u>PMC4.8, 14.8</u>	+	+	-	+	-*	O3:K6	KX	-
<u>PMC5.8</u>	+	+	-	+	+	O3:KUT*	KX	-
<u>PMC39.8</u>	+	-	-	-	-	OUT:KUT	39.8	-
Aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> en 2009	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	Serotipo	DGREA	Vp58.5
<u>PMC31.9, 33.9, 47.6, 64.9, 69.9, 70.9, 72.9</u>	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	-
<u>PMC29.9, 51.9,</u>	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	+*
<u>PMC25.9, 34.9, 40.9, 41.9, 44.9</u>	+	-	-	-	-	O3:KUT	34.6	-

+, presente; -, ausente; subrayado, DGREA realizado; *itálica*, serotipo no realizado.

En negrita: cepa prototipo de cada grupo DGREA.

El asterisco (*) indica presencia de variación en las cepas pandémicas.

1.2 *V. parahaemolyticus* pandémico asociado a mariscos.

Los aislados de *V. parahaemolyticus* obtenidos a partir de mariscos recolectados en la Región de Los Lagos durante los veranos desde 2008 a 2011, se analizaron y agruparon de acuerdo a sus marcadores genéticos (*tlh*, *tdh*, y *trh*), su patrón de DGREA y en algunos casos a su serotipo. En 2008 se analizaron 27 muestras. Con el fin de estimar el número más probable (NMP) de *V. parahaemolyticus* en los mariscos, se realizaron enriquecimientos de *V. parahaemolyticus* en diluciones seriadas paralelas a partir del tejido suave de choritos homogenizado en APW. La presencia de *tlh*, marcador específico para esta especie, y de *tdh* y *trh*, marcadores asociados a cepas patogénicas, se determinó mediante PCR multiplex (Bej y col., 1999). En 2008, se detectó *tlh* en todas las muestras y sólo ocho de ellas contenían *tdh*. El NMP de bacterias positivas para *tdh* en mariscos fluctuó desde 0.3 g^{-1} hasta 24 g^{-1} . A su vez, la carga total de *V. parahaemolyticus* (*tlh*) tuvo un rango entre 1.5 g^{-1} a 110 g^{-1} . De estas muestras se obtuvieron veinte aislados no pandémicos que fueron caracterizados en detalle (Tabla 5).

En 2009, se detectó *V. parahaemolyticus* en 14 de 17 muestras, y sólo cuatro de ellas contenían *tdh*. Ninguna de las muestras contenía *trh*. La carga de bacterias positivas para *tdh* fluctuó desde indetectable ($<0.3 \text{ g}^{-1}$) hasta 1.1 g^{-1} mientras que la carga de *V. parahaemolyticus* total fue de 0.3 g^{-1} hasta 24 g^{-1} . A partir de los cultivos enriquecidos con *V. parahaemolyticus* se obtuvieron aislados positivos para *tdh* en sólo cuatro de las ocho muestras *tdh*-positivas en 2008 y en ninguna de las muestras obtenidas en 2009. Se obtuvieron doce aislados que fueron caracterizados en detalle para determinar la

Tabla 5. Propiedades de aislados de *V. parahaemolyticus* obtenidos de mariscos durante los veranos de 2008 a 2011 en Puerto Montt, Chile.

Aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> en 2008	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	Serotipo	Grupo DGREA
PMA18.8, 23.8,24.8	+	+	-	+	+	O3:K6	KX
PMA6.8, 13.8, 16.8, 20.8, 21.8, 26.8	+	--	-	ND	ND	ND	118
PMA1.8, 2.8, 4.8, 5.8	+	-	-	ND	ND	ND	1.8
PMA3.8, 8.8, 10.8, 11.8, 14.8, 15.8, 17.8, 18.8	+	-	-	ND	ND	ND	3.8
PMA7.8	+	-	-	ND	ND	ND	7.8
PMA9.8	+	--	-	ND	ND	ND	9.8
PMA25.8	+	-	-	ND	ND	O3:KUT	27.8
Aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> en 2009	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	Serotipo	Grupo DGREA
PMA 10.9, 26.9, 31.9, 33.9	+	-	-	-	-	ND	118
PMA6.9	+	-	-	-	-	ND	128
PMA21.9	+	-	-	-	-	ND	187
PMA11.9	+	-	-	-	-	ND	34.6
PMA29.9	+	-	-	-	-	ND	40.6
PMA4.9	+	-	-	-	-	ND	21.7
PMA2.9	+	-	-	-	-	ND	2.9
PMA18.9	+	-	-	-	-	ND	18.9

Continuación Tabla 5.

Aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> en 2010	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	Serotipo	Grupo DGREA
PMA2.10	+	-	-	ND	ND	ND	PMA34.6
PMA1.10, 3.10	+	-	-	ND	ND	ND	PMA1.10
PMA4.10, 5.10, 6.10, 7.10, 8.10, 9.10	+	-	-	ND	ND	ND	PMA118
PMA10.10, 11.10, 12.10, 13.10, 14.10, 15.10, 16.10, 17.10	+	-	-	ND	ND	ND	PMA18.9
PMA18.10	+	-	-	ND	ND	ND	PMA11.7
Aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> en 2011	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	Serotipo	Grupo DGREA
PMA1.11,6.11,11.11,12.11, 13.11,19.11,24.11	+	-	-	ND	ND	ND	PMA 1.11
PMA2.11,3.11,7.11,8.11,9.11,14.11 15.11, 17.11,18.11,20.11, 21.11, 22.11, 23.11,25.11, 26.11,30.11	+	-	-	ND	ND	ND	PMA 18.9
PMA4.11,5.11, 10.11	+	-	-	ND	ND	ND	PMA1.10
PMA27.11, 28.11	+	-	-	ND	ND	ND	PMA118

+ presente, - ausente, ND: no determinado. En negrita: cepa prototipo de cada grupo DGREA.

presencia de marcadores genéticos (*tlh*, *tdh*, y *trh*), la distinción de acuerdo a sus patrones de DGREA y en algunos casos su serotipo (Tabla 5). El análisis de muestras ambientales del 2010 comprendió 28 muestras de mariscos (Tabla 5). En ellas se detectó *tlh* en un 89% y en ninguna se amplificó *tdh* o *trh*. La carga total de *V. parahaemolyticus* (*tlh*) fluctuó entre 0.7 g^{-1} y 110 g^{-1} , con un promedio geométrico de 2.1 g^{-1} . En algunas de las muestras, la amplificación por PCR dio un amplicón de *tlh* levemente más pequeño que aquel obtenido normalmente con *V. parahaemolyticus* (Figura 4a). La carga de bacterias que poseían este *tlh* fue de 0.3 g^{-1} a 1.1 g^{-1} . El aislamiento de colonias de cultivos enriquecidos mostró que aquellas bacterias a partir de las que se amplificó un *tlh* más pequeño eran más similares a *V. alginolyticus* que a *V. parahaemolyticus*: estas colonias al igual que *V. alginolyticus* crecieron amarillas y blancas en agar TCBS y Chromagar respectivamente, y resultaron ser *Voges Proskauer* (VP) positivo y *ara* negativo en galería Api 20E, reacciones propias de *V. alginolyticus*.

La secuenciación de este amplicón más pequeño de *tlh* mostró que estos (cepas M1-M4, cuadro rosado, Figura 4b) se agrupan con aquellos *tlh* secuenciados y reportados en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) como *V. alginolyticus*. Por el contrario, la secuenciación de amplicones de *tlh* del tamaño esperado para *V. parahaemolyticus*, mostró que estos *tlh* (cepas E y F, cuadro celeste, Figura 4b) se agrupan con aquellos secuenciados y reportados previamente en NCBI como *V. parahaemolyticus*.

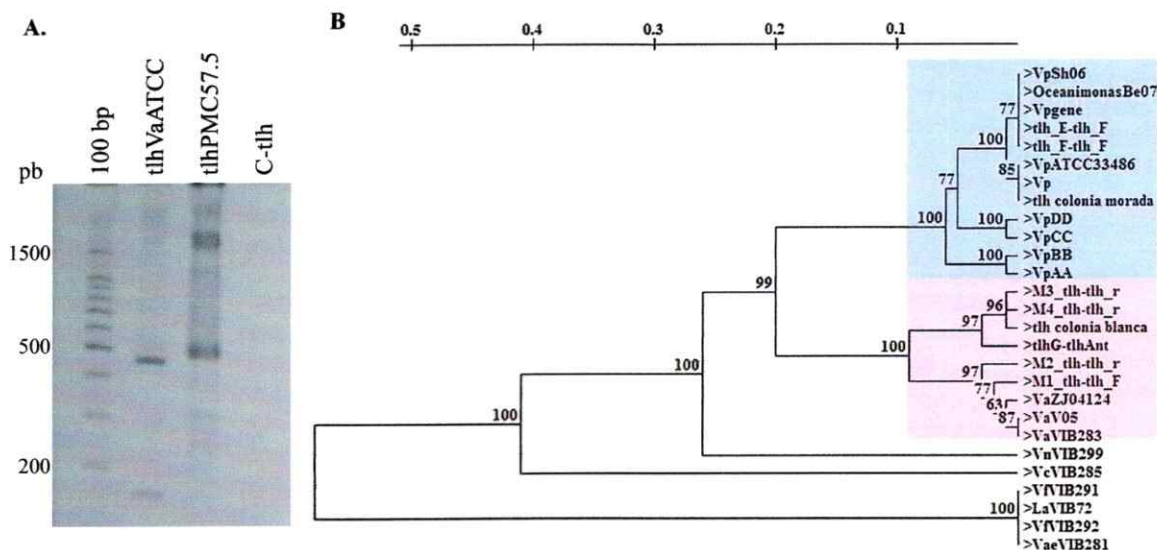


Figura 4. A. Gel de poliacrilamida donde se observa que el amplicón de *tlh* obtenido desde *V. alginolyticus* (VaATCC, 450 pb) presenta una mayor migración que el amplicón de *tlh* obtenido a partir de *V. parahaemolyticus* (PMC57.5, 500 pb). B. Dendrograma de disimilitud de las secuencias de *tlh*. Las secuencias provenientes de amplicones de *tlh* más pequeño (cepas M1-M4, cuadro rosado) agrupan con aquellos *tlh* reportados previamente en *V. alginolyticus*. Por el contrario, las secuencias que provienen de amplicones de *tlh* del tamaño esperado (cepas E y F, cuadro celeste) agrupan con aquellos *tlh* reportados previamente en *V. parahaemolyticus*. Los valores indicados en cada nodo corresponden a los valores de *bootstrap*. El eje superior de disimilitud corresponde a cambios por posición de nucleótidos.

Este último año, 2011, el análisis de muestras ambientales contempló 32 muestras. *V. parahaemolyticus* se detectó en un 88% de las muestras y ninguna de ellas contuvo *tdh* o *trh*. La carga de *V. parahaemolyticus* total fluctuó desde 0.3 g⁻¹ y 110 g⁻¹ con un promedio geométrico de 1.4 g⁻¹. El *tlh* de menor tamaño que se encontró en el 2010 no se detectó en el 2011. A partir de los cultivos enriquecidos en los que se amplificó *tlh*, se obtuvo colonias aisladas, las cuales fueron purificadas y caracterizadas por DGREA (Tabla 5).

1.3 Diversidad de *V. parahaemolyticus* en mariscos de la Región de Los Lagos.

Entre los años 2004 y 2007 se aislaron cepas que se pudieron distinguir por DGREA y agrupar en 23 grupos. (Fuenzalida y col., 2006; Fuenzalida y col., 2007; Harth y col., 2009). En 2008, los dieciséis aislados no pandémicos caracterizados por DGREA se distinguieron en 7 grupos. Cuatro de estos grupos ya habían sido observados en años anteriores. En el 2009 se caracterizaron 12 aislados de mariscos, que se diferenciaron en ocho grupos DGREA, seis de los cuales habían sido previamente observados. Los 18 aislados no pandémicos caracterizados en 2010, se diferenciaron en 5 grupos DGREA, 4 de los cuales habían sido observados previamente. Finalmente, los 28 aislados obtenidos desde mariscos en el 2011 fueron diferenciados en 4 grupos DGREA, 3 de los cuales habían sido detectados previamente. Los nuevos grupos observados entre 2008 y 2011 incrementaron finalmente el número de grupos DGREA aislados a la fecha a 30 (Figura 5), incluyendo el grupo KX que corresponde a la cepa pandémica. Como se observa en la figura 5, KX solo se observó en un pequeño porcentaje de las muestras que contenían *V. parahaemolyticus*.

Es interesante destacar que estos resultados muestran que la población de *V. parahaemolyticus* aislada desde mariscos comprende un gran número de cepas que pertenecen a diferentes grupos DGREA, cuya composición varía notoriamente cada verano. Sin embargo, el número de nuevos grupos DGREA que aparecen cada año ha ido disminuyendo sostenidamente en el tiempo hasta llegar a detectar sólo un grupo nuevo en los años 2010 y 2011.

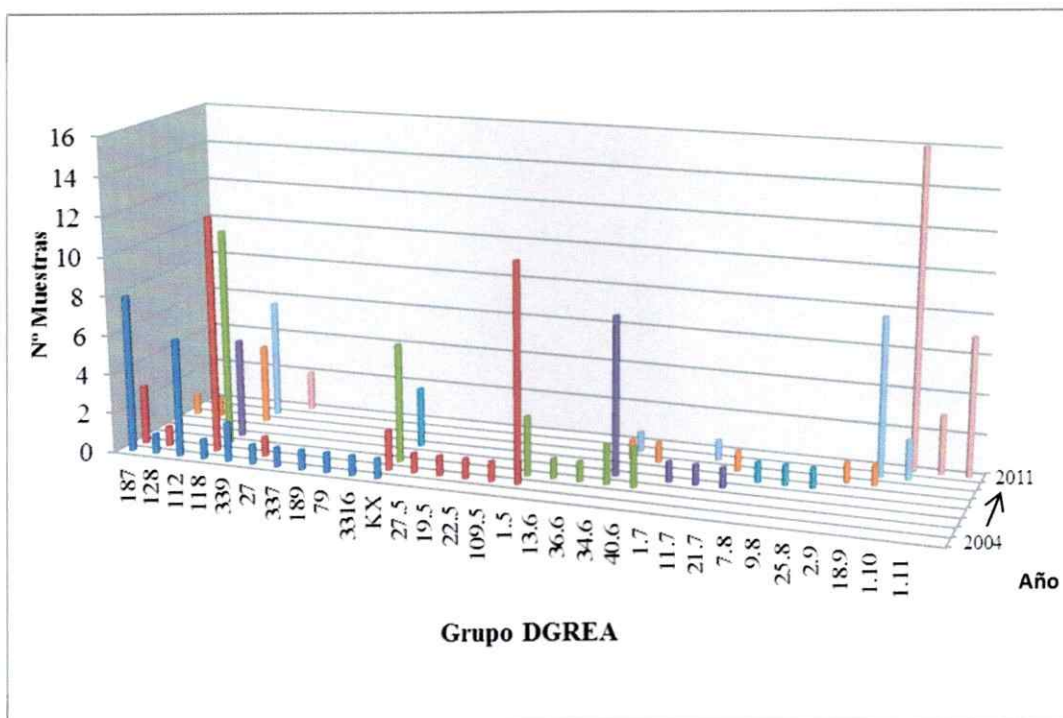


Figura 5. Histograma que muestra el número de muestras de mariscos que contienen *V. parahaemolyticus* que corresponden a diferente grupo DGREA observados desde el verano de 2004. La cepa pandémica se identifica como KX.

La mayoría de los grupos (60%) ha aparecido un solo año y no se ha vuelto a detectar, sin embargo, otros grupos como KX (pandémico), PMA187 y PMA118 han prevalecido por más tiempo. Otro grupo que llama la atención es PMA 18.9, puesto que desde su aparición en 2009 ha aumentado notoriamente en el tiempo.

El grupo PMA34.6 asociado a algunos casos de diarrea en 2009 fue detectado nuevamente en 2011, sin embargo, este año, al igual que en los años previos a 2009, no se asoció a ningún caso clínico.

2. Identificación de aislados variantes de *V. parahaemolyticus* pandémico.

2.1 Variantes en marcadores genéticos tradicionales, DGREA, serotipo y presencia de fago Vp58.5.

Durante este estudio se observaron algunas variantes del clásico aislado pandémico. En el 2008, un 98% de los casos clínicos (45 de 46 casos) correspondió a la cepa clonal pandémica de acuerdo a sus marcadores genéticos, su patrón de DGREA y serotipo. Ese año, once aislados de este grupo (KX) se diferenciaron de la cepa clonal pandémica clásica: ocho contenían un plasmidio de 42 kb que corresponde a un profago telomérico descrito previamente (Zabala y col., 2009), dos aislados fallaron en la amplificación de *toxRS/new* por PCR y uno no contenía un antígeno KUT, (UT por no tipificable, porque no reaccionó con ninguno de los antisueros provistos por Denka Seiken) en lugar del clásico antígeno K6 (Tabla 4). En el 2009, dos de los nueve aislados pandémicos de origen clínico contenían el profago telomérico de 42 kb (Tabla 4).

En relación a los aislados de origen ambiental, los tres aislados positivos para *tdh* obtenidos en el 2008 mostraron los marcadores genéticos característicos y el patrón de DGREA de la cepa pandémica sin mostrar ninguna variación. Ninguno de estos aislados contenía el fago Vp58.5 (Tabla 5). En tanto que en el año 2009 fue imposible aislar *V. parahaemolyticus* pandémico desde muestras ambientales y en consecuencia, no se detectó ninguna variante.

2.2 Variantes en CRISPR y VNTRs.

2.2.1 Detección de variantes en CRISPR.

La variación de la posible región CRISPR identificada en la secuencia del genoma de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 (http://crispr.u-psud.fr/cgi-bin/crispr/SpecieProperties.cgi?Taxon_id=223926), fue analizada por PCR en 29 aislados pandémicos clínicos y 21 aislados ambientales obtenidos en la región de Los Lagos (Tabla 1) y en la cepa del aislado VpKX mantenido en el laboratorio. En el 100% de las cepas analizadas se obtuvo una banda que migra alrededor de los 550 pb sin diferencias claras en la migración, como se observa en 10 cepas en la Figura 6.

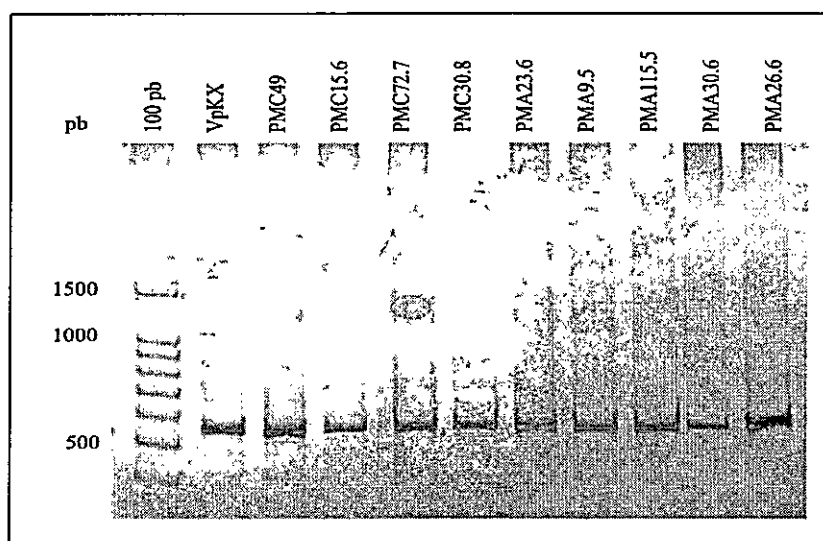


Figura 6. Análisis del amplicón de CRISPR (550 pb) en 10 cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* pandémico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Sin embargo, para detectar posibles variaciones en la secuencia de estas regiones genómicas, 10 productos de PCR escogidos al azar fueron enviados a secuenciar. Al igual que en el caso anterior, no se encontraron diferencias en las cepas analizadas, todas presentaron un 100% de identidad con la secuencia registrada para la cepa secuenciada RIMD2210633.

2.2.2 Detección de variantes en VNTRs.

La variación de ocho VNTRs identificadas en la secuencia del genoma de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633, fue analizada por PCR en los mismos 50 aislados pandémicos que no pudieron ser diferenciados por análisis de la región CRISPR. En contraste con lo observado en la región, se pudieron diferenciar 35 cepas (70%) de acuerdo a sus patrones de VNTRs (v1-v2-v3-v4-v5-v6-v7-v8; Tabla 6). El análisis de los VNTRs permitió observar el mayor grupo de cepas variantes dentro de la población clonal pandémica de *V. parahaemolyticus* aislada en el sur de Chile.

El patrón de VNTRs más común fue 36-42-7-8-7-14-6-7, observado en 12 cepas (PMA115.5, PMA15.6, PMA24.6, PMA21.6, PMA23.6, PMA25.6, PMA29.6, PMA30.6, PMC68, PMC18.5, PMC58.5 y PMA24.8). La mayoría de estas cepas corresponden a cepas ambientales observadas en el 2006. Este perfil también se observó en una cepa clínica el año 2004, y en una cepa ambiental en 2005 y 2008.

Tabla 6. Perfiles de VNTRs de cepas clínicas y ambientales obtenidas en Puerto Montt, Región de Los Lagos entre los años 2004 y 2009.

Cepa	VNTR1	VNTR2	VNTR3	VNTR4	VNTR5	VNTR6	VNTR7	VNTR8
PMA114	36	20	7	8	7	16	6	7
PMA9.5	36	41	7	8	7	14	6	7
PMA115.5	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA24.5	36	43	7	8	7	14	6	7
PMA37.5	39	41	7	8	7	14	6	7
PMA39.5	38	43	7	8	7	6	6	7
PMA43.5	39	41	7	9	7	14	6	7
PMA44.5	40	38	7	8	7	14	6	7
PMA15.6	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA24.6	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA21.6	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA22.6	34	42	7	8	7	14	7	7
PMA23.6	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA25.6	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA26.6	38	45	7	8	7	14	6	7
PMA29.6	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA30.6	36	42	7	8	7	14	6	7
PMA38.6	36	41	7	8	6	14	6	7
PMA23.8	36	26	7	8	8	14	6	7
PMA18.8	34	41	7	8	7	14	6	8
PMA24.8	36	42	7	8	7	14	6	7
PMC36	36	43	7	8	7	14	6	7
PMC47	26	42	7	8	7	14	7	7
PMC49	34	42	7	8	7	14	6	7
PMC60	16	41	7	8	8	14	6	7
PMC65	22	43	7	8	7	14	6	7
PMC68	36	42	7	8	7	14	6	7
PMC2.5	36	33	7	8	7	14	6	7
PMC57.5	34	41	7	8	7	14	6	7
PMC58.5	36	42	7	8	7	14	6	7
PMC18.5	36	42	7	8	7	14	6	7
PMC10.5	16	40	7	8	7	14	6	7
PMC5.6	36	43	7	8	7	14	6	7
PMC10.6	36	45	7	8	7	14	6	6
PMC15.6	35	42	7	8	7	14	6	6
PMC19.6	36	42	7	8	7	14	6	6
PMC1.7	36	41	7	8	7	14	6	7
PMC15.7	36	55	7	8	7	15	6	7
PMC29.7	12	42	7	8	7	14	6	7
PMC72.7	36	43	7	8	7	14	6	6
PMC58.7	30	29	7	8	7	14	6	7
PMC7.8	30	26	7	8	7	14	6	7
PMC15.8	36	42	7	8	7	14	6	7
PMC20.8	36	43	7	8	7	14	6	6
PMC26.8	36	43	7	8	7	14	6	6
PMC30.8	36	42	7	8	7	15	6	7
PMC51.9	35	42	7	8	7	14	6	7
PMC69.9	36	42	7	8	7	14	6	7
PMC31.9	36	40	7	8	7	14	6	6
PMC29.9	29	43	7	8	7	14	6	6

3. Mecanismo de Variación de VNTRs

3.1 Diversidad de VNTRs entre clones de una misma cepa y sus tasas de mutación.

Con el objeto de analizar más apropiadamente las variaciones en VNTRs, se midió la tasa de mutación de seis VNTRs diferentes en cuatro clones provenientes de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*. Uno de estos clones fue obtenido desde una muestra de la cepa RIMD2210633 recibida en el año 2005, cuyo genoma está secuenciado (Makino y col., 2003). Este clon, denominado KX contenía el mismo número de repetidos reportados para la secuencia del genoma del clon secuenciado en cada VNTR analizado, excepto en VNTR3, que contenía siete unidades repetidas en vez de las seis reportadas. Los tres clones restantes provenían de la cepa PMC57.5 obtenida de una muestra clínica en el sur de Chile en 2005 y purificada por aislamiento de una sola colonia dos veces con el fin de obtener un solo clon (Fuenzalida y col., 2006). Sin embargo, aunque PMC57.5, la cepa pandémica tipo de las cepas aisladas en Chile, es indistinguible de KX en los marcadores genéticos comunes de la cepa pandémica, así como también en los patrones de RFLP-PFGE y DGREA, los clones analizados difieren de KX y además difieren entre sí en varios VNTRs. Al comparar diez clones o colonias obtenidas desde la cepa almacenada de KX, todos contenían exactamente el mismo patrón de VNTRs. Sin embargo, en diez clones examinados de la cepa PMC57.5 se encontraron algunas variantes; ocho contenían 34 y 14 unidades repetidas en sus VNTRs 1 y 6 respectivamente (de éstos, se escogió un clon denominado PMC57.5-1), uno contenía 38 unidades repetidas en VNTR1 (PMC57.5-2) y el último contenía sólo 6

unidades repetidas en VNTR1 (PMC57.5-3). Este último clon también difirió de los otros clones de la misma cepa por la presencia de 18 y 5 unidades repetidas en los VNTRs 6 y 8 respectivamente, en lugar de los 14 y 7 unidades repetidas encontradas en los otros clones (Tabla 7). Las cepas KX y PMC57.5 han sido guardadas en agar blando a temperatura ambiente desde 2005 y la posibilidad de *Vibrio* de crecer en este agar y a esa temperatura podría explicar la diversidad observada. Este hecho ha sido observado previamente en cepas clonales de *Salmonella spp.*, las cuales han mostrado diversidad al ser analizadas varios años después de haber sido almacenadas en agar blando (Rabsch y col., 2004; Sutton y col., 2000).

Tabla 7. Número de unidades repetidas de seis *loci* VNTR en cuatro clones obtenidos desde las cepas de VpKX y PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* pandémico y las tasas de mutación (en negrita) observadas después de prolongados subcultivos *in vitro*.

Cultivo	Número de unidades repetidas en el clon original y tasa de mutación (e^{-04})			
	Seriado		PSPE	
VNTR	VpKX	PMC57.5-1	PMC57.5-2	PMC57.5-3
1	28 3.7	34 4.2	38 6.0	6 0.0
3	7 0.0	7 0.8	7 0.0	7 0.0
5	7 0.0	7 0.4	7 0.0	7 2.4
6	17 0.1	14 0.7	14 2.8	18 2.4
7	6 0.0	6 0.3	6 0.0	6 0.8
8	7 0.0	7 0.4	7 0.0	5 0.0
Combinada	3.8	6.7	8.8	5.6

La tasa de mutación calculada para cada clon se mantuvo en el mismo orden (10^{-4} mutante/generación; Tabla 7). Sin embargo, las tasas de mutación individuales difieren entre los diversos VNTRs de cada clon y entre los diferentes clones, aparentemente, en relación al número de repetidos en el VNTR de cada clon estudiado (Figura 7). Esta relación, entre la tasa de mutación del VNTR y el número de repetidos que contiene, se hizo más evidente cuando se calculó para un mismo VNTR (VNTR1) con diferente número de unidades repetidas. Este resultado sugiere que el bajo número de unidades repetidas (sólo 6) en VNTR1 del clon PMC57.5-3, sería la causa probable de la tasa de mutación extremadamente baja observada para VNTR1 en este clon.

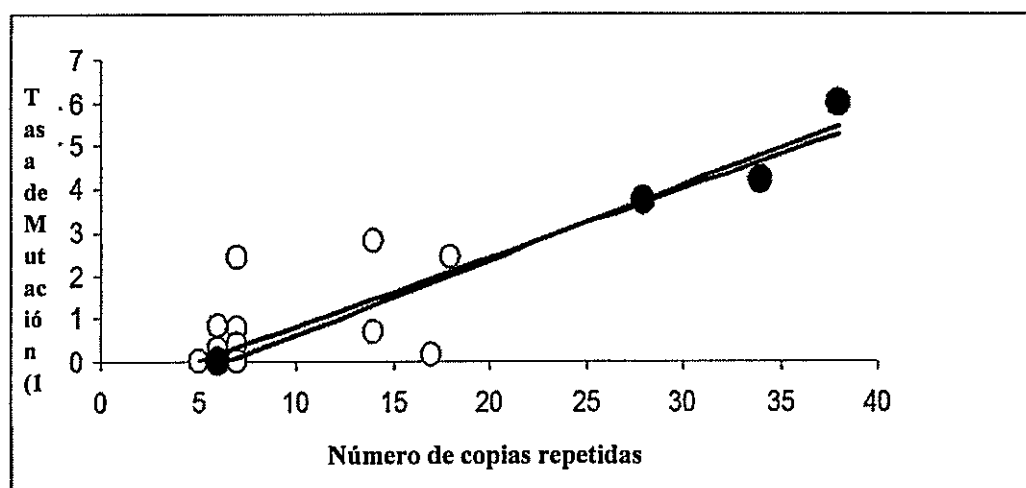


Figura 7. Tasa de mutación de VNTRs en relación al número de repetidos en cada VNTR. Los círculos blancos corresponden a la tasa de mutación observada para todos los VNTRs, círculos en negrita corresponden a la tasa de mutación observada exclusivamente en VNTR1 para los diferentes clones. Para todos los VNTRs: $y = 0,1598x - 0,7923$, $R^2 = 0,8052$; Para VNTR1: $y = 0,1736x - 1,1245$, $R^2 = 0,9674$.

3.2 Distribución de mutantes obtenidos luego de la subcultivación en serie.

La distribución del tipo de mutaciones que se observó en los diferentes clones de *V. parahaemolyticus* pandémico fue acorde a los datos publicados previamente para *E. coli* O157:H7 (Vogler y col., 2006) y *Y. pestis* (Vogler y col., 2007). En todos los casos, la frecuencia de mutantes con 1, 2, 3 y 4 unidades repetidas varió siguiendo las proporciones esperadas para una distribución geométrica. A pesar que en los experimentos realizados con los cuatro clones diferentes se observaron diferencias, la distribución promedio de todos ellos fue consistente con una distribución geométrica (Tabla 8 y Figura 8).

Tabla 8. Frecuencia de mutantes con cambios de 1, 2, 3 y 4 unidades repetidas para cada uno de los clones examinados. La frecuencia esperada de mutantes de acuerdo a la distribución geométrica se encuentra en negrita y cursiva.

Diferencia en unidades repetidas.	KX	PMC <i>57.5-1</i>	PMC <i>57.5-2</i>	PMC <i>57.5-3</i>	Promedio
1	64 -	74 -	86 -	47 -	68 -
2	25 23	23 19	7 12	33 25	22 20
3	11 8	3 5	0 2	7 13	5 7
4	0 0	0 0	7 0	13 7	5 2

La presencia de mutantes que poseen cambios de gran magnitud (mayor a cuatro unidades repetidas) prácticamente no sería observada si la distribución fuera geométrica.

Sin embargo, cuando ocurren, es más frecuente que correspondan a deleciones. En cambio, cuando los mutantes presentan cambios de baja magnitud (igual o menor a cuatro unidades repetidas) no hay mayor diferencia entre la frecuencia de inserciones o deleciones (Figura 8). Este fenómeno ha sido previamente observado en *Y. pestis* y *E. coli* (Vogler y col., 2006; Vogler y col., 2007).

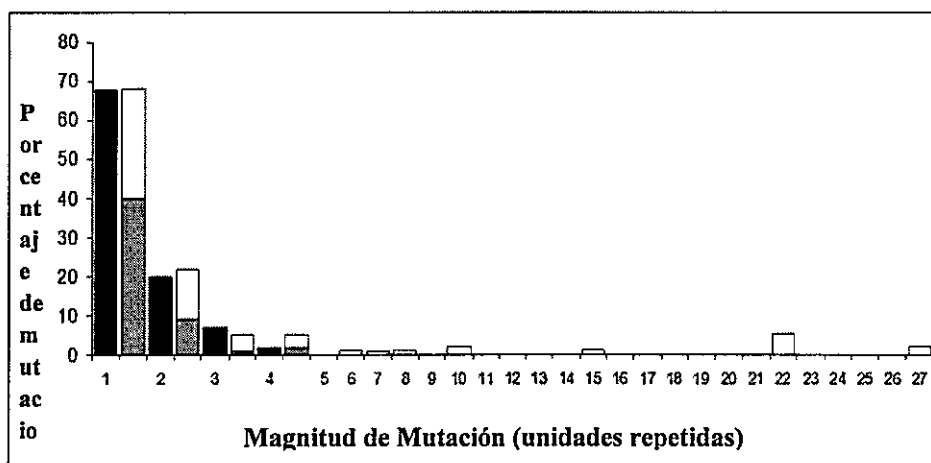


Figura 8. Distribución de la frecuencia de mutantes con diferente número de repetidos. Las barras negras corresponden al porcentaje de mutantes calculados de acuerdo a una distribución geométrica, mientras que las barras bicolor (blanco y gris) corresponden al porcentaje de mutantes observados. La parte gris de la barra muestra las inserciones observadas, mientras que la parte blanca muestra las deleciones observadas. Los porcentajes mostrados para los mutantes con diferencias mayores a 4 unidades repetidas corresponden al porcentaje calculado considerando el número total de mutantes y sólo corresponden a deleciones.

Se ha postulado previamente en análisis de diversidad para poblaciones bacterianas que incluyen un número similar de generaciones estudiadas en esta tesis (Vogler y col., 2006), que los mutantes con cambios menores a 4 repetidos son

generados por mutación de un solo paso (*Stepwise mutation model*, SMM), donde los cambios ocurren por inserción o deleción de una sola unidad de repetido a la vez, como se había propuesto inicialmente para microsatélites en eucariontes (Kimura y Ohta, 1978). Por otro lado, las mutantes observadas con cambios en más de cuatro unidades repetidas son probablemente generadas por recombinación. Sin embargo, en conjunto, los resultados obtenidos apoyan la teoría de que las mutaciones de VNTRs ocurren mayoritariamente por SMM (Vogler y col., 2006; Vogler y col., 2007).

4. Relación entre aislados variantes

4.1 Modelos evolutivos y árboles filogenéticos.

Considerando que la mayoría de los mutantes emergen por SMM, los árboles filogenéticos se construyeron considerando las diferencias absolutas en el número de repetidos en cada uno de los VNTRs. Para comparar las diferencias en número de repetidos se utilizó un árbol de mínima expansión (*Minimum spanning tree*, MST) empleando la categoría Manhattan. Esta categoría construye el árbol considerando la suma de las diferencias en las unidades repetidas de cualquiera de los dos mutantes. Si no se considera el valor absoluto del repetido y se considera sólo si los VNTRs son iguales o diferentes, como ocurre cuando se utiliza la aproximación categórica en MST, los pares de mutantes con diferente número de unidades repetidas aparecen separados por la misma distancia. La diferencia resultante en los árboles filogenéticos cuando se

utilizan estas dos aproximaciones –Manhattan o categórica- queda en evidencia en la Figura 9, la cual muestra el árbol de MST obtenido para una población de KX que comprende 75.600 generaciones. Cuando las diferencias en VNTRs no consideran la diferencia en número de unidades repetidas (Figura 9B), aquellos mutantes que tienen una diferencia en más de un repetido son considerados variantes directamente relacionadas al fundador como ocurre en los grupos A (con 29 repetidos en VNTR1) y F (con 20 repetidos en VNTR1). Por otro lado, cuando el árbol construido considera la diferencia absoluta en las unidades repetidas (Figura 9A), solo aquellos mutantes que difieren en un solo repetido son considerados variantes directamente relacionados con el fundador (grupo B), como se esperaría si los mutantes fueran generados por variación de un repetido a la vez, siguiendo el modelo SSM.

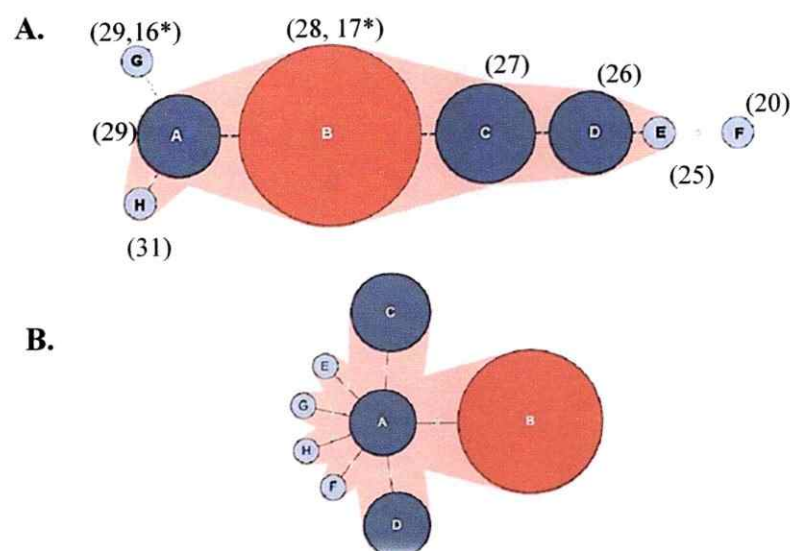


Figura 9. Árboles filogenéticos construidos para la población de KX utilizando coeficiente Manhattan (A) o coeficiente categórico (B). Entre paréntesis, se observa el número de unidades repetidas en VNTR1 () y en VNTR6 (*). El resto de los VNTRs no mostró variación.

Otro programa que permite discernir las relaciones entre grupos de bacterias que poseen genotipos relacionados es eBURST. La introducción de los datos en eBURST (o en su nueva versión, goeBURST) considerando cada VNTR como un alelo (*locus*) lleva al tratamiento categórico de las diferencias observadas con resultados muy similares a los obtenidos en la Figura 9B. Sin embargo, cuando los datos se introducen en este programa considerando cada repetido como un alelo se obtiene un resultados similares a la figura 9A. Considerando que una de las potenciales aplicaciones más interesantes de MLVA en *V. parahaemolyticus* pandémico es el rastreo de brotes, se analizaron en conjunto (utilizando MST coeficiente *Mahattan*) las cuatro poblaciones obtenidas para probar si las variantes podían ser relacionadas con la bacteria de la cual se generaron, después de los pasajes seriados o paralelos llevados a cabo *in vitro*. A pesar de las pequeñas diferencias de los clones fundadores en sus VNTRs, fue posible relacionar de esta manera, la mayoría de los mutantes con su fundador, distinguiendo de esta manera cuatro poblaciones con diferentes fundadores (Figura 10A), demostrándose en esta forma la utilidad de este método para rastrear brotes provocados por *V. parahaemolyticus* pandémico. Vale la pena destacar que si el análisis es llevado a cabo considerando la aproximación categórica, solo unos pocos mutantes de los diferentes fundadores pueden ser distinguidos (Figura 10B).

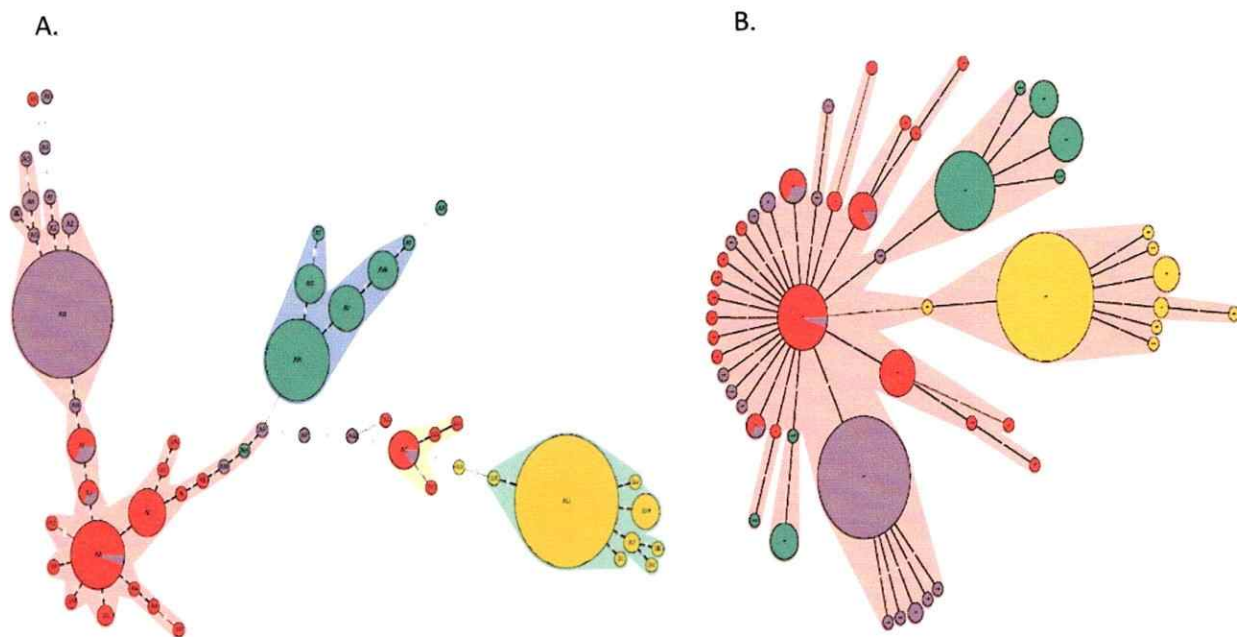


Figura 10. Árbol filogenético MST generado para las poblaciones obtenidas de cuatro clones diferentes de *V. parahaemolyticus* pandémico. El árbol filogenético considerando todos los mutantes fue obtenido utilizando el coeficiente Manhattan (A) y coeficiente categórico (B). En verde se encuentra la población de KX, en rojo PMC7.5-1, morado PMC57.5-2 y amarillo PMC57.5-3. Los complejos clonales son indicados en sombreados de color rosado, lila y verde claro y están definidos como un conjunto de cepas que difieren en no más de dos unidades repetidas por *locus*.

Filogenia de poblaciones nativas.

Otra interesante aplicación del MLVA es el estudio de microevolución de una cepa y también su epidemiología (Ansede-Bermejo y col., 2010; Li y col., 2009). Para estudiar las relaciones entre diversas cepas nativas pandémicas de *V. parahaemolyticus* se utilizó MST coeficiente Manhattan el cual incluyó el análisis de ocho VNTRs (Tabla 6 y 9).

Tabla 9. Perfil de VNTRs de cepas aisladas en el norte de Chile (ATC y COC) y Asia entre los años 1996 y 1999.

Cepa	VNTR1	VNTR2	VNTR3	VNTR4	VNTR5	VNTR6	VNTR7	VNTR8
ATC208	34	38	7	8	7	18	6	7
ATC210	34	38	7	8	7	18	6	7
ATC213	32	38	7	8	7	15	6	7
ATC218	31	35	7	8	7	18	6	7
ATC219	28	40	7	8	7	18	6	7
ATC220	31	38	7	8	7	18	6	7
ATC224	18	44	7	8	7	18	6	7
ATC296	32	39	7	8	7	18	6	7
COC276	31	38	7	8	7	18	6	7
COC284	31	38	7	8	8	25	6	7
AN5034	19	38	7	8	7	17	6	7
AN8373	37	37	7	8	8	17	6	7
JKYVP6	31	39	7	8	8	18	6	10
KX225	27	36	7	8	8	18	6	7
KXV737	29	30	7	8	9	17	6	7
OP424	20	40	6	8	7	18	6	7
Vp2	31	35	7	8	7	19	6	7
Vp47	29	22	6	8	7	18	6	7
Vp81	30	38	7	8	7	18	6	7
VpKX	28	41	7	9	7	17	6	7

Considerando que las cepas clínicas corresponden a una subpoblación de la cepa pandémica encontrada en mariscos, se compararon, en primer lugar 29 cepas clínicas y 21 cepas ambientales recolectadas en la Región de Los Lagos, Chile, desde 2004 a 2009 (Tabla 6). No se encontraron diferencias entre subpoblaciones de cepas clínicas o ambientales (Figura 11). Tampoco se encontraron diferencias entre cepas aisladas en diferentes años, sin embargo, en promedio, se examinaron solo 5 cepas por año y este número puede ser muy pequeño para observar diferencias menores.

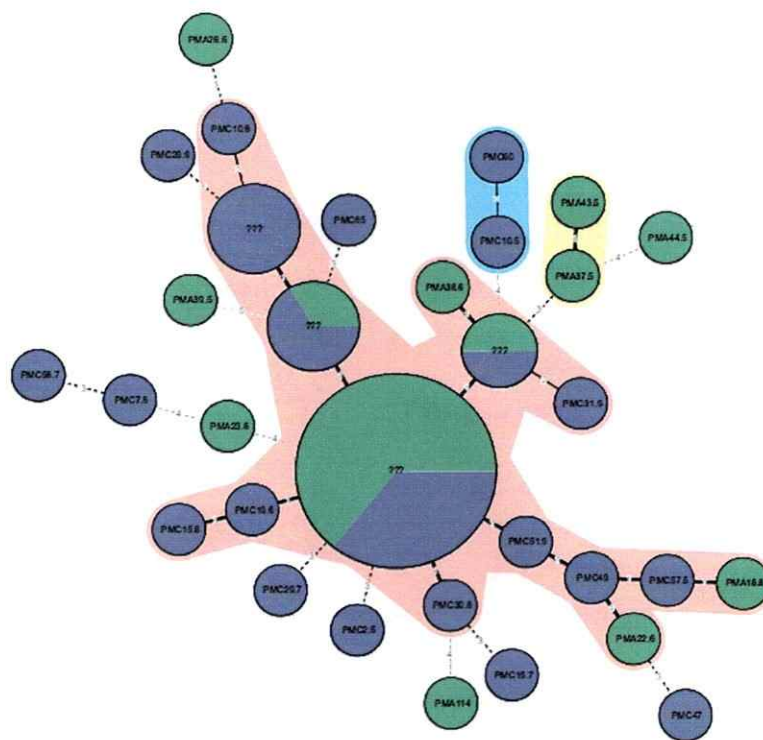


Figura 11. Árbol filogenético de aislados nativos de *V. parahaemolyticus* pandémico utilizando MST coeficiente Manhattan, obtenido para las poblaciones ambiental (verde) y clínica (violeta) del sur de Chile. Los complejos clonales son indicados en sombreados de color rosado, celeste y amarillo y están definidos como un conjunto de cepas que difieren en no más de dos unidades repetidas por *locus*.

El paso siguiente fue comparar estas mismas cepas clínicas, obtenidas en Puerto Montt, con otras cepas clínicas obtenidas en el norte de Chile, Antofagasta, donde se observó un brote causado por la cepa pandémica en el año 2008, y con cepas obtenidas en el sudeste asiático (SEA), con el objetivo de determinar si el MLVA con el MST y el coeficiente Manhattan permite discriminar entre cepas de acuerdo a su origen geográfico, y establecer posibles relaciones entre estas poblaciones. En esta comparación, se incluyó además una población de cepas aisladas en Tokio, utilizando los datos reportados por Kimura (Kimura y col., 2008). La figura 12 muestra que usando el coeficiente Manhattan es posible distinguir la mayoría de los mutantes de estas cuatro poblaciones de acuerdo a su origen geográfico (Figura 12).

De acuerdo a resultados anteriores (Ansedo-Bermejo y col., 2010), la población del brote en el norte de Chile parece estar más relacionada a la población de SEA que a la población del sur de Chile. Interesantemente, la población de cepas clínicas aisladas en pacientes en Tokio en el periodo de 1996 a 2003, se agrupa separada de los aislados obtenidos en diferentes locaciones de sudeste asiático (Figura 12).

La distancia genética $(\delta\mu)^2$ ha sido usada para determinar el tiempo de divergencia comparando microsatelites entre poblaciones de mamíferos (Calabrese y col., 2001). Se utilizó este parámetro, que considera las diferencias entre el número promedio de repetidos de los VNTRs de cada población (Tabla 10), para determinar el posible tiempo de divergencia entre las cuatro poblaciones analizadas por MST y construir un árbol filogenético, utilizando el principio del vecino más cercano (*Neighbor-Joining, NJ*), que se muestra en la figura 13. En este caso las poblaciones de aislados de Tokyo y Puerto Montt se dividieron en poblaciones más antiguas (a) y más recientes (r) de acuerdo al año de aislamiento de cada aislado.

Tabla 10. Distancia genética $(\delta\mu)^2$ entre las diferentes poblaciones de *V. parahaemolyticus* pandémico y sus fechas de aislamiento.

	ATC	PMCa	PMCr	SEA	TOKIOa	TOKIOr
ATC	1997-1998					
PMCa	0,098	2004-2006				
PMCr	0,102	0,008	2007-2009			
SEA	0,046	0,195	0,209	1996-1999		
TOKIOa	0,158	0,371	0,368	0,0571	1996-1999	
TOKIOr	0,347	0,630	0,624	0,167	0,041	2000-2003

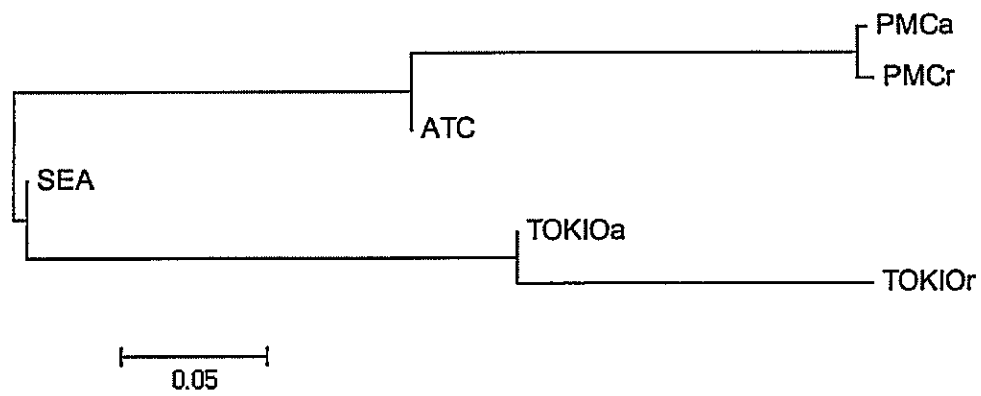


Figura 13. Árbol filogenético construido por el método del vecino más cercano (*Neighbor-Joining, NJ*) para diferentes poblaciones de *V. parahaemolyticus* pandémico, basado en la distancia génica $(\delta\mu)^2$ entre poblaciones del sur y del Norte de Chile, de SEA y de Tokio.

DISCUSION

1. Epidemiología de *Vibrio parahaemolyticus* pandémico en la Región de Los Lagos.

Los brotes de diarrea relacionados al consumo de mariscos crudos en Chile, alcanzaron un máximo en el año 2005 con 3.600 casos en la Región de Los Lagos y 10.984 casos a nivel nacional. Estos niveles fueron disminuyendo paulatinamente hasta el año 2007, cuando se registraron 477 casos en la Región de Los Lagos y sólo un 73% de ellos fue causado por la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* (Harth y col., 2009), en contraste con el 100% observado en los años previos (Cabello y col., 2007; Fuenzalida y col., 2006; Gonzalez-Escalona y col., 2005; Fuenzalida y col., 2007). Además, ese año, un 40% de los aislados pandémicos analizados presentó el serotipo O3:K59 en vez del O3:K6 convencional (Harth y col., 2009). Adicionalmente se observó una cepa patógena asociada a un 13% de los casos clínicos, aparentemente generada por transferencia de la isla de patogenicidad desde el clon pandémico (Harth y col., 2009) a otra cepa de *V. parahaemolyticus*. En conjunto, estos resultados parecían indicar un cambio en la epidemiología de los brotes de diarrea causados por *V. parahaemolyticus* pandémico. Sin embargo, el año 2008 los casos aumentaron a 1.143 y un 98% de ellos fue causado por la cepa pandémica (García y col., 2009). Cuando parecía retornar el patrón anterior, nuevamente el 2009 se observó un cambio; los casos disminuyeron a

441 y solo el 64% de ellos se relacionó con la cepa pandémica (García y col., 2009). Interesantemente, ese mismo año se reportaron 5 casos de diarrea producidos por cepas que no contenían los genes indicadores de patogenicidad *tdh* y *trh* y que pertenecían a un mismo grupo DGREA, diferente al grupo DGREA del clon pandémico. La ausencia de los genes *tdh* y *trh* sugiere que estas cepas no son virulentas, y que habrían proliferado junto a las cepas virulentas durante la infección. Sin embargo, también es posible que estas cepas tengan otros mecanismos de patogenicidad independientes de *tdh* o *trh*, o que presenten diferencias en estos genes que impidan su amplificación por PCR con los partidores utilizados. Este es un punto importante a considerar al realizar análisis de riesgo de brotes producidos por *V. parahaemolyticus*, debido a que estos dos genes *tdh* y *trh* son los clásicos marcadores de patogenicidad y se utilizan actualmente para calcular las cargas de las cepas patógenas en mariscos.

Una observación interesante es el hecho de que cada vez que disminuyó la cepa pandémica se detectaron otras cepas patógenas no pandémicas (como se observó en los años 2007 y 2009) lo cual parece indicar la existencia de un nivel basal de casos de diarrea relacionados a diversos grupos de cepas patogénicas, que no están relacionadas con el clon pandémico de *V. parahaemolyticus* y que sólo son detectables cuando los casos producidos por la cepa pandémica disminuyen notoriamente.

En conjunto, los resultados previamente publicados y estos más recientes incluidos en esta tesis, sugieren que la cepa pandémica llegó a la Región de Los Lagos en 2004 y se mantuvo como una subpoblación relativamente estable dentro de la población de *V. parahaemolyticus* presente en mariscos. Esta cepa fue evolucionando y sufriendo modificaciones en su genoma, cambios en serotipo, interacciones con fagos (Zabala y

col., 2009; Bastías y col., 2010) o con otras cepas no pandémicas (Harth y col., 2009), hasta que finalmente desapareció o disminuyó a niveles indetectables en 2010 y 2011. La carga de clon pandémico en mariscos, calculada de acuerdo al método del NMP, fue variando a lo largo de los años en forma paralela con la fluctuación en el número de casos clínicos, hasta que finalmente la desaparición de *V. parahaemolyticus* pandémico en 2010 y 2011 coincidió con la ausencia de brotes de diarrea en el país. La persistencia e intensidad de los brotes dependería entonces del mantenimiento y abundancia del clon pandémico en los mariscos, el cual, en un balance constante entre su tasa de duplicación y su tasa de muerte, debe llegar a una concentración suficiente para alcanzar una dosis infectiva. Este balance depende principalmente de la efectividad de la cepa pandémica para la utilización del espacio y los nutrientes con respecto al resto de la población de *V. parahaemolyticus* y de otras especies relacionadas. Esta eficiencia relativa podría cambiar según las condiciones físicas ambientales.

La población de *V. parahaemolyticus* en mariscos incluyendo la cepa pandémica es muy diversa con 30 grupos DGREA observados a la fecha. Interesantemente, desde el año 2004 el número de nuevos grupos DGREA ha declinado notoria y sostenidamente, y la mayoría de los patrones de DGREA observados han sido detectados en años previos lo que sugiere que se está alcanzando una posible saturación. De acuerdo al número de nuevos aislados observado en cada nuevo análisis, la riqueza de grupos DGREA ha sido estimada en 62 por Chao1 (Thompson y col., 2005). Sin embargo, el número de cepas diferentes de *V. parahaemolyticus* en mariscos es probablemente mucho mayor considerando que casi todos los mariscos estudiados fueron colectados en un área menor a 1 Km².

En mariscos, los diferentes tipos de *V. parahaemolyticus* están cambiando continuamente. Probablemente estas cepas tan similares al estar compartiendo el hábitat y los recursos se encuentran, aparentemente, compitiendo por nutrientes y espacio. Esto queda en evidencia cuando se analiza el histograma que incluye todos los grupos DGREA desde el 2004 (Figura 5), donde se observa claramente que hay un alto recambio y la mayoría de las cepas aparecen y desaparecen cada año. *V. parahaemolyticus* pandémico se comporta como la mayoría de las cepas, aunque parece haber sido una de las más estables durante estos 8 años de observación.

Un 60% de los grupos DGREA ha sido detectado solo una vez. Sin embargo hay otros grupos que han sido más abundantes y persistentes. Interesantemente, los grupos DGREA 187 y 128 han sido detectados nuevamente luego de tres años de ausencia. Es posible que lo mismo pueda ocurrir con la cepa pandémica, que hace tres años que no se ha detectado en el ambiente, con la consecuente reanudación de los brotes de diarrea. Esto apoya firmemente la necesidad de seguir monitoreando las áreas de extracción de mariscos para determinar la presencia de *V. parahaemolyticus* pandémico en el ambiente y de esta manera prevenir los brotes de diarrea.

Uno de los grupos DGREA más frecuentemente encontrado ha sido PMA 118, el cual se ha mantenido relativamente estable en el tiempo, probablemente porque las condiciones ambientales lo han favorecido. Este es un factor importante a considerar debido a que en el año 2007 se identificó una cepa patogénica que parece haber adquirido la isla de patogenicidad a partir de la cepa pandémica. Si la cepa pandémica reapareciera nuevamente, esta podría intercambiar genes con otras cepas como PMA118

y podría generar nuevas cepas patógenas que sean altamente favorecidas y posiblemente abundantes en la naturaleza.

Otro hecho que sugiere que las cepas de *V. parahaemolyticus* están constantemente en una aparente competencia por recursos, y no sólo con otras cepas de su misma especie sino además, con otras cepas de especies diferentes, es el hecho de que al mismo tiempo que se detectaron bajas cargas de *V. parahaemolyticus* en el ambiente durante el verano de 2010, se detectó en mayor magnitud *V. alginolyticus* o cepas muy cercanas a esta especie, de acuerdo a la secuencia de su gen *tlh* y al aspecto de las colonias, hecho que no había sido observado en años previos en la Región de Los Lagos.

Otros agentes de gran importancia en la regulación de la abundancia de *V. parahaemolyticus* son los fagos. Estos son muy abundantes y se acepta que tienen un papel regulador en la cantidad de bacterias en el mar (Bergh y col., 1989; Fuhrman, 1999). Uno de los fagos asociado a la cepa pandémica, Vp58.5, tienen un rango de hospedero acotado y lisa sólo cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*. La presencia de este profago incrementa la sensibilidad a la luz UV (incluyendo la radiación solar) y de esta manera tendría un importante papel en la reducción de la sobrevivencia y la capacidad de propagación de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en el mar (Zabala y col., 2009). El aumento de sensibilidad a la infección por fagos podría disminuir la carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* pandémico en los mariscos y de esta manera tener un impacto negativo en la intensidad de los brotes de diarrea asociados al consumo de mariscos.

Sin embargo, no todos los fagos tienen un efecto negativo en la propagación de *V. parahaemolyticus*. Otro fago, VP93, podría, al contrario de Vp58.5, tener un efecto positivo en la cepa pandémica. VP93 es capaz de infectar cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus*, algunas de ellas con mayor eficiencia que a la cepa pandémica (Bastías y col., 2010). Estudios de co-cultivos de cepas pandémicas con no pandémicas mostraron que la presencia de VP93 favorece la prevalencia de la cepa pandémica. En ausencia del fago sin embargo, la cepa no pandémica se ve favorecida (Bastías y col. 2010).

Con todos los actores involucrados entonces, es difícil determinar exactamente qué fue lo que causó la aparente desaparición del clon pandémico. Lo que si queda claro es que en el balance entre la tasa de crecimiento y de muerte de la cepa pandémica en los últimos años, la tasa de muerte fue mayor, provocando finalmente la desaparición o al menos una disminución importante de las cargas del clon pandémico hasta niveles indetectables en las costas del sur de Chile. Sin embargo, las fluctuaciones observadas desde el año 2007 hacen difícil predecir el comportamiento del clon pandémico en los próximos años. Los cambios en el medio ambiente podrían inducir la proliferación de esta cepa y en consecuencia, provocar nuevamente la reaparición de los brotes de diarrea

2. Aislados variantes en la población clonal de *V. parahaemolyticus* pandémico.

No solo factores extrínsecos definen la concentración del clon pandémico, ya que en la naturaleza, estas bacterias están sufriendo constantes cambios genéticos y posterior selección. La llegada y posterior proliferación masiva de *V. parahaemolyticus* pandémico en la Región de los Lagos ofreció una oportunidad única para estudiar los cambios que sufrió esta población clonal de *V. parahaemolyticus* en su ambiente de propagación natural. Estos organismos considerados genéticamente monomórficos (Achtman y Wagner, 2008), permiten detectar mecanismos evolutivos que son indetectables en poblaciones bacterianas que poseen una gran diversidad de secuencia ya que durante millones de años de historia evolutiva, muchos de los cambios genómicos son borrados por eventos de recombinación o reducción genómica.

La búsqueda de variantes en una población altamente monomórfica como es el complejo clonal de *V. parahaemolyticus* permitió la detección de algunas mutantes: mostró que dos cepas carecían del marcador *toxRS_{new}*, una mostraba un cambio en serotipo, de O3:KUT en lugar de O3:K6, y cuatro contenían el profago Vp58.5 (García y col., 2009). Ninguna de estas variantes, excepto las que contenían el fago Vp58.5, persistió en el tiempo y sólo se observaron esporádicamente. No obstante, la emergencia y desaparición de variantes en serotipo es un fenómeno que ya ha sido observado y reportado previamente (Chowdhury y col., 2004b).

La vigilancia y control de los patógenos bacterianos requiere el desarrollo de herramientas que permitan una identificación precisa de las cepas a nivel de subespecie.

Sin embargo, la variación en *V. parahaemolyticus* pandémico se observa raramente con los métodos tradicionalmente utilizados (DGREA, RFLP-PFGE, AP-PCR, etc) . Por tal razón se estudiaron potenciales variantes en dos regiones genómicas de alta variabilidad (CRISPR y VNTRs) en *V. parahaemolyticus* pandémico. La región CRISPR no mostró variación en tamaño ni en secuencia en las cepas estudiadas, revelando que esta región no se modificaría en la cepa pandémica. El sistema CRISPR no sólo está compuesto por la región CRISPR, además comprende los genes *cas*.

V. cholera O395 y otros patógenos entéricos relacionados poseen los componentes esenciales del sistema CRISPR (Chakraborty y col., 2009) pero éstos no han sido reportados aún en *V. parahaemolyticus* pandémico. Probablemente, la cepa pandémica posee la región CRISPR pero no los genes *cas* necesarios para la funcionalidad de esta región.

La situación con MLVA es diferente. Kimura (Kimura y col., 2008) mostró que MLVA es una valiosa técnica de tipificación para caracterizar cepas pandémicas altamente homogéneas de *V. parahaemolyticus*. En esta tesis, se logró diferenciar un 70% de las cepas estudiadas analizando 8 VNTRs diferentes, siendo éste el mayor grupo de variantes identificadas en la población clonal de *V. parahaemolyticus* en el sur de Chile. Por lo tanto, según este resultado, la tipificación de cepas clonales de *V. parahaemolyticus* por MLVA podría ser de gran utilidad para distinguir cepas implicadas en brotes y estudios epidemiológicos. Sin embargo, para establecer y aumentar el uso de los VNTRs como marcadores epidemiológicos y permitir su uso en

el desarrollo de modelos probabilísticos mutacionales era necesario conocer, con evidencia cómo y cuánto mutan los VNTRs, lo que se discute en la siguiente sección.

3. Estudio de la variación de los VNTRs y su aplicabilidad.

Los VNTRs que presentan mayor variabilidad ofrecen una oportunidad única para estudiar la microevolución de una población altamente monomórfica como *V. parahaemolyticus* pandémico. Sin embargo, para poder interpretar el significado de los cambios en los VNTRs y utilizar estos datos en estudios de microevolución y epidemiología, es absolutamente necesario conocer sus tasas de mutación y también entender cómo se generan las mutaciones.

3.1 Variaciones en los VNTRs durante almacenamiento en agar blando a temperatura ambiente.

Las diferencias observadas en el número de unidades repetidas entre el clon RIMD2210633 (VpKX) analizado en este trabajo y lo reportado en la secuencia del genoma (Makino, 2003) probablemente ocurrieron durante la sostenida propagación de esta cepa en el laboratorio. Este fenómeno se hizo más evidente cuando se analizaron clones provenientes de diferentes colonias purificadas de *V. parahaemolyticus* pandémico obtenidas de la cepa PMC57.5 almacenada en agar blando. La emergencia de las variaciones observadas probablemente ocurrió durante el crecimiento de las cepas en

agar blando. Esta observación de la variación en las cepas (y no solamente en sus VNTRs) durante su almacenamiento en agar blando, ha sido reportada previamente en bacterias como *Salmonella spp.* (Rabsch, 2004; Sutton, 2000). Estos datos indican la necesidad de almacenar las cepas en glicerol y a baja temperatura para evitar el crecimiento y de considerar las posibles consecuencias de la conservación de cepas en agar blando al comparar cepas, tanto por regiones genómicas muy variables (VNTRs), como por genomas completos, que es lo que se ha estado realizando este último tiempo.

3.2. Tasa de mutación y número de repetidos en los VNTRs

Las tasas de mutación encontradas en *Vibrio parahaemolyticus* se encontraron en el orden de 10^{-4} mutantes/generación, muy similares a aquellas reportadas previamente en *E. coli* O157:H7 y *Y. pestis* (Vogler, 2006; Vogler, 2007). Un resultado importante fue observar que existe una relación entre las tasas de mutación y número de repetidos iniciales en VNTRs, tal como fue descrito para *E. coli* O157:H7 y *Y. pestis* (Vogler, 2006; Vogler, 2007). Más aún, en esta tesis se mostró que esta relación es más precisa cuando se comparan las tasas de mutación en clones con diferente número de unidades repetidas en el mismo VNTR.

El mecanismo de variación de los VNTRs ha sido mayormente explorado y discutido mirando la variación de las unidades repetidas de los microsatélites en eucariontes. El mecanismo aceptado para explicar la variación en el número de copias repetidas propone que las secuencias repetidas cambian en número porque se introducen

o salen debido a apareamientos fallidos que ocurren por desplazamientos de una hebra durante la replicación del DNA (*slipped strand mispairing*, SSM) (Schlötterer y Tautz, 1992). La variación será una inserción o una delección dependiendo si el bucle de repetidos se forma en la hebra naciente o en la hebra templado.

El modelo más antiguo y más simple que se ha propuesto para explicar cómo ocurren estas variaciones es el modelo de mutación en pasos secuenciales (*stepwise mutation model*, SMM). Según este modelo, un VNTR tiene la misma probabilidad de ganar o perder una unidad repetida a una tasa que es independiente del largo del microsatélite (Kimura, 1978). Desde entonces, se ha propuesto una serie de modelos entre los cuales destacan el “de infinitos alelos”, que considera que cada mutante que surge es nuevo y no se encuentra previamente en la población y también el modelo propuesto por Calabrese que considera un modelo conjunto de mutación de pasos secuenciales y mutaciones puntuales (Calabrese, 2001). Uno de los argumentos que mejor sustenta el modelo de SMM es el que sostiene que la distribución de mutantes con diferencias en 1, 2, 3 ó 4 unidades repetidas corresponde a una distribución geométrica. Los resultados de esta tesis muestran que existe una distribución geométrica de los variantes en VNTRs con 1, 2 y 3 unidades repetidas de diferencia, y en consecuencia, avalan el modelo de SMM al igual que los datos de Vogler (Vogler y col., 2006; Vogler y col., 2007). Anteriormente, este modelo fue validado también en cepas pandémicas nativas de *V. parahaemolyticus*, donde un 71% de ellas mostró diferencias en una unidad repetida con sus vecinas más cercanas (Ansede-Bermejo, 2010), y en *E coli* donde este porcentaje fue de un 75% (Vogler y col., 2006).

Aunque el modelo de SMM es aceptado, algunos de los análisis disponibles para MLVA consideran las diferencias en cada alelo (VNTR) siguiendo un sistema binario o categórico, sin considerar las diferencias en el número de unidades repetidas. Sin embargo, considerar las diferencias en número de repetidos es esencial si se acepta que los VNTRs varían acorde al modelo de SMM. El método más apropiado entonces para analizar los datos de MLVA es el MST de *Bionumerics* usando la categoría Manhattan. De esta manera, se incorpora el valor absoluto en las diferencias en el número de unidades repetidas para la construcción de los árboles filogenéticos. Estos resultados también se pueden obtener si se utiliza el programa gratuito goeBURST, considerando en la introducción de los datos cada unidad repetida informativa (en vez del VNTR) como un *locus*. goeBURST (Francisco, 2009) (<http://goeburst.phyloviz.net/>) es una versión modificada de eBURST, un método basado en parsimonia que se utiliza para determinar relaciones genéticas de poblaciones bacterianas que han divergido en un tiempo evolutivo corto, a partir de resultados obtenidos por MLVA o MLST.

El árbol de MST que se obtiene cuando no se consideran las diferencias en el número de unidades repetidas parece improbable, debido a que muestra relaciones iguales para cepas con diferencias en el número de repetidos del VNTR. A primera vista parece mucho más probable el árbol que considera las diferencias en el número de unidades repetidas (MST-Manhattan). Una comparación más objetiva de la probabilidad de ambos árboles se obtuvo calculando la probabilidad de estos árboles alternativos de acuerdo a $P = \prod \mu_i$ (Vogler y col., 2007) donde μ es la probabilidad de una mutación dada y n es el número de pasos mutacionales. El resultado obtenido para el árbol cuando

no se considera las diferencias en unidades repetidas (coeficiente categórico) fue $4.0E-36$ versus $5.7E-22$ para el árbol MST-Manhattan cuando se supone SMM. Por lo tanto, el árbol construido considerando Manhattan tiene una mayor probabilidad de ocurrir.

En un análisis anterior de MST-Manhattan con 69 cepas provenientes de Asia, Perú y Chile, se lograron distinguir dos grupos. Un grupo incluyó todas las cepas de Asia y cepas de Perú y norte de Chile. El otro grupo incluyó cepas de Perú y cepas del sur de Chile (Ansede-Bermejo, 2010). En esta tesis, se utilizó un conjunto de diferentes VNTRs y una colección de 98 cepas, las cuales incluyeron cepas de Tokio analizadas por Kimura (Kimura y col., 2008), con el propósito de ampliar la epidemiología de la población de *V. parahaemolyticus* pandémico. El árbol MST Manhattan mostró, al igual que en publicaciones previas, que las cepas del norte de Chile se agrupan con las cepas del sudeste asiático y que este grupo se distingue claramente de las cepas aisladas en el sur de Chile. Inesperadamente, las cepas aisladas en Tokio se diferenciaron de las cepas de sudeste asiático, aunque se encuentran estrechamente relacionadas.

El árbol MST-Manhattan y la distancia génica obtenidos sugieren que la cepa de *V. parahaemolyticus* que causó los brotes de diarrea en el norte de Chile está estrechamente relacionada con las cepas del sudeste asiático y se han diferenciado independientemente por un corto periodo de tiempo. Las cepas encontradas en el sur de Chile probablemente derivan de cepas que llegaron al norte de Chile y no corresponden a una introducción independiente desde el sudeste asiático. Por otro lado, las cepas de Tokio están más relacionadas con las de sudeste asiático. La división más antigua entre

las poblaciones pandémicas estudiadas parece haber ocurrido entre la población del sur de Chile y la población de Tokio.

Una correcta interpretación de los árboles filogenéticos debe considerar que además de la diferencia en origen geográfico, las cepas difieren en su fecha de aislamiento. Las diferencias en la fecha de aislamiento parecen ser más evidentes en las cepas de Tokio aisladas antes (Tokio a) y después (Tokio r) de 1999. La división más antigua en las poblaciones pandémicas analizadas se observa entre las poblaciones más antiguas de Tokio y Chile. Goldstein (Goldstein y col., 1999) usó la distancia genética $(\delta\mu)^2$ para estimar tiempos de divergencia en primates considerando la tasa de mutación promedio de los microsatélites y el tiempo generacional. Si se asume que los aislados encontrados en el sur de Chile entre los años 2004 y 2009 provienen de una población que derivó de la población de sudeste asiático aislada entre 1996 y 1999 y evolucionó independientemente por 10 años, se puede estimar que el clon pandémico de *V. parahaemolyticus* se ha reproducido con un tiempo generacional de 3.6 días. Además, suponiendo que las distancias genéticas que sustentan el árbol son lineales en el tiempo, la separación de las poblaciones de Tokio y del sur de Chile de la población del sudeste asiático habría ocurrido al mismo tiempo. De la misma manera, se estimó que la población del sur de Chile se separó de la población del norte hace 5 años. Sin embargo, es importante destacar que estos cálculos no consideran eventos de selección por la generación de “cuellos de botella”, que podrían haber ocurrido durante la migración y/o establecimiento de la cepa pandémica, cambiando la composición de los VNTRs de la población colonizadora.

CONCLUSIONES

La población pandémica de *V. parahaemolyticus* se mantuvo como una subpoblación relativamente estable dentro de la población de *V. parahaemolyticus* hasta su aparente desaparición en 2010 y 2011.

La población pandémica de *V. parahaemolyticus* es altamente monomórfica. Sin embargo, las cepas clonales pueden ser diferenciadas por cambios en sus VNTRs.

El mecanismo de variación de los VNTRs en el clon pandémico de *V. parahaemolyticus* se ajusta al modelo de SMM, con aumento o disminución de unidades repetidas a la vez. Considerando este modelo, el análisis de la relación entre las variantes utilizando el MST coeficiente *Manhattan*, permite relacionar de mejor manera los aislados variantes y la identificación de su clon fundador.

Los análisis MST-Manhattan permiten diferenciar entre cepas del brote de Puerto Montt y de Tokio y entre cepas del brote de Puerto Montt y Antofagasta pero no entre las cepas de Antofagasta y SEA.

La distancia génica $\delta\mu^2$ calculada entre estas poblaciones mostró que las poblaciones más cercanas entre sí son SEA-Antofagasta, luego SEA-Tokio, Antofagasta-Puerto

Montt y las más alejadas entre sí son Puerto Montt-Tokio, lo que sugiere una posible ruta de colonización del clon pandémico de *V. parahaemolyticus*.

El análisis de los VNTRs permite genotipificar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* y puede ser utilizado en programas de vigilancia epidemiológica global. El estudio detallado de los VNTRs permite estudiar la microevolución de la población pandémica de *Vibrio parahaemolyticus*.

BIBLIOGRAFIA

Achtman M, Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (6):431-440.

Ansedo-Bermejo J., Gavilan R.G., Trinanes J., Espejo R.T., Martinez-Urtaza J. 2010. Origins and colonization history of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in South America. *Mol. Ecol.* 19 (18): 3924-3937.

Bag P.K., Nandi S., Bhadra R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Nishibuchi M., Hamabata T., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B. 1999. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J. Clin. Microbiol.* 37 (7): 2354-2357.

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 315 (5819): 1709-1712.

Bastías R., Higuera G., Sierralta W., Espejo R.T. 2010. A new group of cosmopolitan bacteriophages induce a carrier state in the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Environ. Microbiol.* 12 (4):990-1000.

Bej A. K., Patterson D. P., Brasher C. W., Vickery M. C., Jones D. D., Kaysner, C. A. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods.* 36 (3): 215-225.

Bergh O., Børsheim K.Y., Bratbak G., Heldal M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*. 340 (6233):467-468.

Blake P.A., Weaver R.E., Hollis D. G. 1980. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annu. Rev. Microbiol.* 34: 341-367.

Boucher Y, Stokes H. 2006. The roles of lateral gene transfer and vertical descent in *Vibrio* evolution. *The Biology of Vibrios: Genome Evolution*. pp 84 - 95. *ASM Press*, Washington, D.C

Cabello F.C., Espejo R.T., Hernández M.C., Rioseco M.L., Ulloa J., Vergara J.A. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (4):655-656.

Calabrese P.P., Durrett R. T., Aquadro C.F. 2001. Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. *Genetics*. 159 (2): 839-852.

Chakraborty S., Waise T.M., Hassan F., Kabir Y., Smith M.A., Arif M. 2009. Assessment of the evolutionary origin and possibility of CRISPR-Cas (CASS) mediated RNA interference pathway in *Vibrio cholerae* O395. *In Silico Biol.* 9 (4):245-254.

Chowdhury N.R., Chakraborty S., Eampokalap B., Chaicumpa W., Chongsa-Nguan M., Moolasart P., Mitra R., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Nishibuchi M., Takeda Y., Nair G.B. 2000. Clonal dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* displaying similar DNA fingerprint but belonging to two different serovars (O3:K6 and O4:K68) in Thailand and India. *Epidemiol. Infect.* 125 (1): 17-25.

Chowdhury N.R., Stine O.C., Morris J.G., Nair G.B. 2004a. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 42 (3): 1280-1282.

Chowdhury, A., Ishibashi M., Thiem V. D., Tuyet D. T. N., Van Tung T., Chien B. T., von Seidlein L., Canh D. G., Clemens J., Trach D. D., Nishibuchi M. 2004b. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol. Immunol.* 48 (4): 319-327.

Córdova J.L., Astorga J., Silva W., Riquelme C. 2002. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997- 1998 Chilean outbreak. *Biol. Res.* 35 (3-4): 433-440.

Daniels N.A., Ray B., Easton A., Marano N., Kahn E, McShan A.L. 2nd, Del Rosario L., Baldwin T., Kingsley M.A., Puhr N.D., Wells J.G., Angulo F.J. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *JAMA.* 284 (12): 1541-1545.

DePaola A., Nordstrom J.L., Bowers J.C., Wells J.G., Cook D.W. 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (3): 1521-1526.

Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: D. B. Goldstein y C. Schötterer (eds.). *Microsatellites Evolution and Applications*. Pp 34-48. Oxford University Press, New York, N.Y.

Farber J.M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food. Prot.* 59 (10):1091-1101.

Feil EJ. 2004. Small change: keeping pace with microevolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(6): 483-495.

Francisco, A. P., Bugalho, M., Ramirez, M., Carrico J. A. 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 18 (10):152.

Fuenzalida L., Hernández C., Toro J., Rioseco M.L., Romero J., Espejo R.T. 2006. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ. Microbiol.* 8 (4): 675-683.

Fuenzalida L., Armijo L., Zabala B., Hernández C., Rioseco M.L., Riquelme C., Espejo R.T. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food. Microbiol.* 117 (3): 270-275.

Fuhrman J.A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature.* 399 (6736):541-548.

Gal-Mor O, Finlay BB. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8 (11):1707-1719.

Garcia K., Torres R., Uribe P., Hernandez C., Rioseco M.L., Romero J., Espejo R.T. 2009. Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (23): 7482-7487.

Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackerbrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L, Swings J. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9): 733-739.

Ghosh R., Nair G.B., Tang L., Morris J.G., Sharma N.C., Ballal M., Garg P., Ramamurthy T., Stine O.C. 2008. Epidemiological study of *Vibrio cholerae* using variable number of tandem repeats. *FEMS. Microbiol. Lett.* 288 (2): 196-201.

Girard J.M., Wagner D.M., Vogler A.J., Keys C., Allender C.J., Drickamer L.C., Keim P. 2004. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (22): 8408-8413.

Godde, J. S., Bickerton A. 2006. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J. Mol. Evol.* 62 (6): 718-729.

Goldstein D.B., Ruiz L.A., Cavalli-Sforza L.L., Feldman M.W. 1995. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (15): 6723-6727.

Goldstein, D. B., Roemer, G. W., Smith, D. A., Reich, D. E., Bergman, A. Wayne R. K. 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics.* 151 (2): 797-801.

González-Escalona N., Cachicas V., Acevedo C., Rioseco M.L., Vergara J.A., Cabello F., Romero J., Espejo R.T. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (1):129-131.

González-Escalona N., Martínez-Urtaza J., Romero J., Espejo R.T., Jaykus L.A., DePaola A. 2008. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J. Bacteriol.* 190 (8): 2831-2840.

Groenen, P.M., Bunschoten, A.E., Van Soolingen, D., Van Embden, J.D. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 10 (5): 1057-1065.

Hall B.G., Salipante S.J. 2010. Molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae* as determined by structure-neighbor clustering. *J. Clin. Microbiol.* 48 (6): 1997-2008.

Han H., Wong H.C., Kan B., Guo Z., Zeng X., Yin S., Liu X., Yang R., Zhou D. 2008. Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group'. *BMC Genomics.* 28 (9):570-582.

Harth E., Matsuda L., Hernández C., Rioseco M.L., Romero J., Gonzalez-Escalona N., Martinez-Urtaza J., Espejo R.T. 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (2): 163-168.

Harth-Chu E., Espejo R.T., Christen R., Guzmán C.A., Höfle M.G. 2009. Multiple locus variable number tandem repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (12):4079-4088.

Jain R., Rivera M.C., Moore J.E., Lake J.A. 2002. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor. Popul. Biol.* 61 (4): 489-495.

Jain R., Rivera M.C., Moore J.E., Lake J.A. 2003. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 20 (10): 1598-1602.

Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous

detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35 (4): 907-914.

Kaysner C., DePaola A. (2004). Bacteriological Analytical Manual FDA Online. Cap. 9: *Vibrio*. <http://www.cfscan.fda.gov>.

Kimura M., Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 75 (6): 2868-2872.

Kimura B., Sekine Y., Takahashi H., Tanaka Y., Obata H., Kai A., Morozumi S., Fujii T. 2008. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Methods.* 72 (3): 313-320.

Laohaprerthisan V., Chowdhury A., Kongmuang U., Kalnauwakul S., Ishibashi M., Matsumoto C., Nishibuchi M. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 130 (3): 395-406.

Levinson G., Gutman G. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4 (3): 203-221.

Lindstedt B.A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis.* 26 (13): 2567-2582.

Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M., Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361 (9359): 743-749.

Martinez-Urtaza J., Lozano-Leon A., DePaola A., Ishibashi M., Shimada K., Nishibuchi M., Liebana E. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42 (10): 4672-4678.

Maslow J.N., Mulligan M.E., Arbeit R.D. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infec. Dis.* 17 (2): 153-164.

Matsumoto C., Okuda J., Ishibashi M., Iwanaga M., Garg P., Rammamurthy T., Wong H.C., Depaola A., Kim Y.B., Albert M.J., Nishibuchi M. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38 (2): 578-585.

Monteil M., Durand B., Bouchouicha R., Petit E., Chomel B., Arvand M., Boulouis H.J., Haddad N. 2007. Development of discriminatory multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae*. *Microbiology.* 153 (Pt 4): 1141-1148.

Nair G.B., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Dutta B., Takeda Y., Sack D.A. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (1): 39-48.

Nasu H., Iida T., Sugahara T., Yamaichi Y., Park K.S., Yokoyama K., Makino K., Shinagawa H., Honda T. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38 (6): 2156-2161.

Olea A.M., González C., Chiu M., Vallebuona C., Labraña M., Martiniello F. 2005. Brote de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Chile. *Rev. Chil. Salud Pública.* 9 (1): 51-53.

Okuda J., Ishibashi M., Hayakawa E., Nishino T., Takeda Y., Mukhopadhyay A.K., Garg S., Bhattacharya S.K., Nair G.B., Nishibuchi M. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35 (12): 3150-3155.

Okura M., Osawa R., Tokunaga A., Morita M., Arakawa E., Watanabe H. 2008. Genetic analyses of the putative O and K antigen gene clusters of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* 52 (5): 251-264.

Papadopoulos D., Schneider D., Meier-Eiss J., Arber W., Lenski RE., Blot M. 1999. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96 (7): 3807-3812.

Pei Y., Terajima J., Saito Y., Suzuki R., Takai N., Izumiya H., Morita-Ishihara T., Ohnishi M., Miura M., Iyoda S., Mitobe J., Wang B., Watanabe H. 2008. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61 (1): 58-64.

Price E.P., Hornstra H.M., Limmathurotsakul. D., Max T.L., Sarovich D.S., Vogler A.J., Dale J.L., Ginther J.L., Leadem B., Colman R.E., Foster J.T., Tuanyok A., Wagner D.M., Peacock S.J., Pearson T., Keim P. 2010. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* in four cases of acute melioidosis. *PLoS Pathog.* 6 (1): e1000725.

Rabsch W., Helm R.A., Eisenstark A. 2004. Diversity of phage types among archived cultures of the Demerec collection of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2): 664-669.

Shirai H., Ito H., Hirayama T., Nakamoto Y., Nakabayashi N., Kumagai K., Takeda Y., Nishibuchi M. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect. Immun.* 58 (11): 3568-3573.

Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* 109 (6): 365-371.

Schlötterer C., Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20 (2): 211-215.

Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. 2008. CRISPR, a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat.Rev.Microbiol.* 6 (3): 181-186.

Sozhamannan S., Deng Y.K., Li M., Sulakvelidze A., Kaper J.B., Johnson J.A., Nair G.B., Morris J.G. Jr. 1999. 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 (10): 5033-5040.

Suthienkul O, Iida T, Park KS, Ishibashi M, Supavej S, Yamamoto K, Honda T. (1996) Restriction fragment length polymorphism of the *tdh* and *trh* genes in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. *J.Clin.Microbiol.* 34 (5): 1293-1295.

Sutton A., Buencamino R., Eisenstark A. 2000. *rpoS* mutants in archival cultures of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* 182 (16): 4375-4379.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8):1596-1599.

Thompson, J. R., Pacocha S., Pharino C., Klepac-Ceraj V., Hunt D. E., Benoit J., Sarma-Rupavtarm R., Distel D. L., Polz M. F. 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* 307 (5713):1311-1313.

van Belkum A. 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 49 (1): 22-27.

van Belkum A., Scherer S., van Alphen L., Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2): 275-293.

Van de Peer, Y., De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10 (5): 569-570.

Vogler A.J., Keys C., Nemoto Y., Colman R.E., Jay Z., Keim P. 2006. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 188 (12): 4253-4263.

Vogler A.J., Keys C.E., Allender C., Bailey I., Girard J., Pearson T., Smith K.L., Wagner D.M., Keim P. 2007. *Mutat Res.* 616 (1-2): 145-158.

Wong H.C., Liu S.H., Wang T.K, Lee C.L, Chiou C.S, Liu D.P, Nishibuchi M., Lee B.K. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (9): 3981-3986.

Zabala B., García K., Espejo R.T. 2009. Enhancement of UV light sensitivity of a *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic strain due to natural lysogenization by a telomeric phage. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (6):1697-1702.

Dynamics of Clinical and Environmental *Vibrio parahaemolyticus* Strains during Seafood-Related Summer Diarrhea Outbreaks in Southern Chile[∇]

Katherine García,¹ Rafael Torres,¹ Paulina Uribe,¹ Cristina Hernández,² M. Luisa Rioseco,³ Jaime Romero,¹ and Romilio T. Espejo^{1*}

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Líbano 5524, Macul, Santiago 6903625, Chile¹; Laboratorio del Ambiente Llanquihue, Secretaría Regional Ministerial de Salud, O'Higgins 276, Puerto Montt, Chile²; and Hospital Regional de Puerto Montt, Seminario s/n, Puerto Montt, Chile³

Received 14 July 2009/Accepted 28 September 2009

Seafood consumption-related diarrhea became prevalent in Chile when the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 reached a region in the south of Chile (Region de los Lagos) where approximately 80% of the country's seafood is produced. In spite of the large outbreaks of clinical infection, the load of *V. parahaemolyticus* in shellfish of this region is relatively low. The pandemic strain constitutes a small but relatively stable group of a diverse *V. parahaemolyticus* population, composed of at least 28 genetic groups. Outbreaks in Region de los Lagos began in 2004 and reached a peak in 2005 with 3,725 clinical cases, all associated with the pandemic strain. After 2005, reported cases steadily decreased to a total of 477 cases in 2007. At that time, 40% of the clinical cases were associated with a pandemic strain of a different serotype (O3:K59), and 27% were related to *V. parahaemolyticus* isolates unrelated to the pandemic strain. In the results published here, we report that in the summer of 2008, when reported cases unexpectedly increased from 477 to 1,143, 98% of the clinical cases were associated with the pandemic strain serotype O3:K6, a change from 2007. Nevertheless, in 2009, when clinical cases decreased to 441, only 64% were related to the pandemic strain; the remaining cases were related to a nonpandemic *tdh*- and *trh*-negative strain first identified in shellfish in 2006. Overall, our observations indicate that the pandemic strain has become a relatively stable subpopulation and that when the number of diarrhea cases related to the pandemic strain is low, previously undetected *V. parahaemolyticus* pathogenic strains become evident.

Diarrhea associated with seafood consumption is caused primarily by pathogenic *V. parahaemolyticus*. This species includes marine bacterial strains, only a few of which are pathogenic in humans (13). The load of pathogenic strains in shellfish depends on physical environmental variables, such as temperature and salinity, and on biological variables including the presence of protozoan predators, competing nonpathogenic bacteria, and bacteriophages capable of killing *V. parahaemolyticus* (21). Therefore, diarrhea outbreaks caused by *V. parahaemolyticus* are mainly an environmental problem. Records of the Public Health Institute of Chile indicate that from 1992 to 1997 diarrhea cases related to seafood consumption were not widespread in Chile in spite of the large consumption of raw shellfish. Cases of seafood-related diarrhea increased greatly with the arrival of the pandemic strain O3:K6, originally observed in Southeast Asia (9). This strain corresponds to a clonal complex. The clonal nature of the *V. parahaemolyticus* pandemic isolates obtained worldwide has been ascertained by the high degree of similarity among their genomes. This comparison includes the presence of specific genetic markers and similarity of the restriction patterns of their genomes, demonstrated by genome restriction fragment

length polymorphism-pulsed-field gel electrophoresis (22), direct genome restriction enzyme analysis (DGREA) (8), arbitrarily primed PCR (15, 18), and multilocus sequence typing (6, 10). Characteristics of isolates of the O3:K6 pandemic clone are the O3:K6 antigens, a distinctive *toxRS* sequence (*toxRS*_{new}) (15), *orf8* (17) and *tdh* genes, and the absence of the *trh* gene found in some pathogenic strains. However, numerous serovariants have apparently emerged since 1996 (16). Genome sequencing of the RIMD 2210633 pandemic strain revealed two sets of gene clusters encoding a type III secretion system apparatus, one in each of its two chromosomes (14).

Since 2004, we have characterized the strains of *V. parahaemolyticus* in both clinical cases and shellfish in a southern region of Chile (Region de los Lagos) in an effort to understand the proliferation of the pathogenic strains in the environment (7, 8, 11). Region de los Lagos extends from 40°13'S to 44°3'S and produces approximately 80% of the seafood in Chile (Anuario 2008 Sernapesca [http://www.sernapesca.cl]). It is generally accepted that the seafood from this region causes most of the clinical cases of *V. parahaemolyticus*-associated diarrhea observed in the entire country. The large diarrhea outbreaks related to seafood consumption started in this region in 2004. In 2005, cases reported by the Ministry of Health reached a peak of 3,600 and 10,984 in Region de los Lagos and the whole country, respectively. Since then, the number of cases has oscillated between 450 and 1,100 cases annually in Region de los Lagos and between 1,500 and 3,500 in the country as a whole (19).

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Líbano 5524, Macul, Santiago 6903625, Chile. Phone: 56 2 9781426. Fax: 56 2 2214030. E-mail: romilio.espejo@gmail.com.

[∇] Published ahead of print on 2 October 2009.

Until 2007, more than 95% of the cases were related to the classical pandemic *V. parahaemolyticus* strain O3:K6 (7, 8). Variants of the pandemic strain were recovered in the summer of 2007, when the outbreaks diminished to 477 reported cases in Region de los Lagos. That year, many cases were caused by a new serovar of the pandemic strain, O3:K59 (11). This same year, a larger percentage of cases analyzed (27%) were due to nonpandemic strains. Some of these last cases corresponded to a strain apparently generated by transference of the pathogenicity island containing the type III secretion island from the pandemic clone to an indigenous *V. parahaemolyticus* strain (11). Another example of interactions between the pandemic strain and native microflora is the finding of variants containing a 42-kb plasmid corresponding to a telomeric temperate phage (24). The observations in 2007 suggested that the changes in the epidemiology of seafood-related diarrhea represented an inflection point in outbreak trends and a decreased prevalence of the pandemic strain in clinical cases. We present here the results of the analysis of *V. parahaemolyticus* in clinical cases and shellfish samples obtained during the summer of 2008, when reported cases unexpectedly increased from 477 to 1,143, and the summer of 2009, when clinical cases decreased to 441 (<http://epi.minsal.cl/epi/html/elvigia/elvigia.htm>). The number of cases observed in 2009 was the lowest since the beginning of large outbreaks in 2004. Overall, our observations illustrate the dynamics of *V. parahaemolyticus* population in outbreaks of diarrhea. They show the following: (i) that the pandemic strain has become a relatively stable subpopulation of the *V. parahaemolyticus* population in shellfish, (ii) that pandemic strain variants have emerged, and (iii) that *V. parahaemolyticus* pathogenic strains unrelated to the pandemic strains become evident when the number of diarrhea cases due to the pandemic strain are low. These data will be helpful in the understanding of *V. parahaemolyticus* ecology and improving the risk analysis of seafood related diarrhea.

MATERIALS AND METHODS

Strains. *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 (also called VpKX) was obtained from the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan. Strains identified with the prefix PMC (see Table 1) correspond to isolates from clinical samples obtained from people seeking attention at the Hospital Regional de Puerto Montt. The last digit of the designation corresponds to the year of isolation. The environmental strains, identified by the prefix PMA (see Table 1), were obtained from shellfish samples taken during the season in which outbreaks occurred (December to March). Isolates from preceding years have been described previously (7, 8, 11).

Analysis. Samples from clinical cases and shellfish were obtained and analyzed as described previously (8). Briefly, samples of shellfish soft tissue were enriched for *V. parahaemolyticus* in three-tube serial dilutions in alkaline peptone water for assessment of bacterial load by the most probable number (MPN) method; tubes with bacterial growth were tested for *tlh*, *tdh*, or *trh* by multiplex PCR (2). Total and pandemic *V. parahaemolyticus* loads were calculated according to the number of tubes positive for *tlh* and for *tdh* and *trh*, respectively. Positive enrichment tubes were plated on CHROMagar Vibrio (CHROMagar Microbiology, Paris, France), and bacterial colonies with the morphology and color expected for *V. parahaemolyticus* were purified. Isolates were characterized for different properties, as described previously: the O and K antigens of the *V. parahaemolyticus* strains were determined by slide agglutination with rabbit antiserum obtained from Seiken (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan), as described by the supplier; PCR assays were performed for *tlh*, *tdh*, and *trh* (2); *orf8* (17); and *toxRS_{new}* (15). PCR was performed using approximately 10 ng of total bacterial DNA per reaction tube. DGREAs were performed as described previously (8). Each of the DGREA patterns found in 2008 and 2009 was compared to patterns described in previous years, and when similarities were observed,

their identities were evaluated by comparing the patterns obtained during the same electrophoresis run. The presence of the 42-kb plasmid was examined by alkaline extraction and electrophoresis in agarose gel, as described previously (24).

RESULTS

***V. parahaemolyticus* associated with clinical cases in 2008 and 2009.** Isolates from diarrhea cases that occurred in Region de los Lagos during the summers of 2008 and 2009 were analyzed and grouped according to serotype, the presence of genetic markers (*orf8*, *toxRS_{new}*, *tlh*, *tdh*, and *trh*), and the distinctiveness of their DGREA patterns. Forty-six cases were analyzed in 2008, and 14 were analyzed in 2009. One isolate from each patient was characterized (Table 1). In 2008, isolates from 45 cases (98%) corresponded to the pandemic clonal group according to the genetic markers and their DGREA patterns. That year 11 isolates from this group could be differentiated from the classical pandemic strain: eight contained a 42-kb plasmid consisting of a previously described telomeric prophage (24), two failed to PCR amplify *toxRS_{new}*, and one did not contain the classical K6 antigen but instead showed a K antigen that did not react with any of the antisera provided by Denka Seiken. The single nonpandemic isolate obtained in 2008 from a clinical case was negative for the genes associated with pathogenicity, *tdh* and *trh*. In contrast to the observations in 2008, only 64% of the 14 cases observed in 2009 were associated with the pandemic strain. The nonpandemic isolates obtained from the other five cases lacked the pathogenesis-related genes *tdh* and *trh*, and all corresponded to the same DGREA group 34.6. This group, observed in relative abundance in shellfish since 2006, had not been previously observed in clinical cases of infection. Two of the nine pandemic isolates contained the 42-kb telomeric prophage.

***V. parahaemolyticus* associated with shellfish.** Twenty-seven and 17 shellfish samples were analyzed in 2008 and 2009, respectively. *V. parahaemolyticus* enrichment parallel serial dilutions of the soft meat in alkaline peptone water were tested for MPN estimation. The presence of *tlh*, which is specific to the species, and *tdh* and *trh*, which are associated with pathogenic strains, was tested by multiplex PCR (2). In 2008, *V. parahaemolyticus* (*tlh*⁺) was detected in every sample; only eight contained *tdh*. None of the samples contained *trh*. The MPN of *tdh*-positive bacteria in the shellfish fluctuated from undetectable (<0.3 g⁻¹) to 24 g⁻¹. On the other hand, total *V. parahaemolyticus* (*tlh*⁺) ranged from 1.5 g⁻¹ to >110 g⁻¹, generally 10 to 100 times higher than pandemic isolates (*tdh*⁺). In 2009, *V. parahaemolyticus* was detected in only 14 of the 17 samples, and *tdh* was found in only 4. None of the samples contained *trh*. The load of *tdh*-positive bacteria fluctuated from undetectable to 1.1 g⁻¹, while total *V. parahaemolyticus* ranged from <0.3 g⁻¹ to 24 g⁻¹. In general, samples from 2009 contained a smaller load of *V. parahaemolyticus* than those from 2008.

Single colonies were obtained from the enrichment cultures and characterized after purification; their properties are described in Table 2. Isolates positive for *tdh* were obtained from only four of the eight *tdh*-positive samples observed in 2008 and from none of four *tdh*-positive samples observed in 2009. Failure to obtain *tdh*-positive isolates from *tdh*-positive enrich-

TABLE 1. Properties of *V. parahaemolyticus* clinical isolates collected during the summers of 2008 and 2009 in Puerto Montt, Chile

<i>V. parahaemolyticus</i> isolate(s) by year and isolate type ^a	Genetic profile ^b					Serotype	DGREA profile	42-kb phage ^b
	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS_{new}</i>			
Isolates from 2008								
Classical pandemic isolates								
PMC3.8, <u>7.8</u> , 12.8, <u>15.8</u> , 17.8, 20.8, 24.8, 26.8, <u>30.8</u> , 34.8, 41.8, 42.8, 45.8, 47.8, 2.8, 6.8, 8.8, 9.8, 11.8, 13.8, 16.8, 18.8, 19.8, 21.8, <u>23.8</u> , <u>29.8</u> , 31.8, 32.8, 33.8, <u>35.8</u> , 37.8, 43.8, 44.8, <u>46.8</u>	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	-
Other pandemic isolates								
<u>PMC1.8</u> , 10.8, 22.8, 36.8, <u>38.8</u> , 48.8, 49.8, 50.8	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	+
<u>PMC4.8</u> , 14.8	+	+	-	+	-	O3:K6	KX	-
<u>PMC5.8</u>	+	+	-	+	+	O3:KUT	KX	-
Nonpandemic isolate								
<u>PMC39.8</u>	+	-	-	-	-	OUT:KUT	39.8	-
Isolates from 2009								
Classical pandemic isolates								
<u>PMC31.9</u> , 33.9, 47.6, 64.9, <u>69.9</u> , 70.9, 72.9	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	-
Other pandemic isolates								
<u>PMC29.9</u> , <u>51.9</u>	+	+	-	+	+	O3:K6	KX	+
Nonpandemic isolates								
<u>PMC25.9</u> , 34.9, <u>40.9</u> , 41.9, <u>44.9</u>	+	-	-	-	-	O3:KUT	34.6	-

^a Underlining, DGREA performed; italics, serotyping not performed.

^b +, present; -, absent.

ments was probably due to their low frequency among total *V. parahaemolyticus* bacteria. Only 4 to 10 colonies were tested for *tdh* from each sample, and among these the probability of finding isolates present in a proportion lower than 1:10 was

very low. Twenty and 12 pandemic and nonpandemic isolates obtained from shellfish in 2008 and 2009, respectively, were characterized in detail for the presence of genetic markers (*orf8*, *toxRS_{new}*, *tlh*, *tdh*, and *trh*) and the distinctiveness of their

TABLE 2. Properties of *V. parahaemolyticus* isolates collected from shellfish during the summers of 2008 and 2009 in Región de Los Lagos, Chile

<i>V. parahaemolyticus</i> isolate by year of collection and DGREA group ^a	Genetic profile ^b					Serotype	DGREA group
	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS_{new}</i>		
Isolates from 2008							
PMA18.8, 23.8, 24.8	+	+	-	+	+	O3:K6	KX
PMA6.8, 13.8, 16.8, 20.8, 21.8, 26.8	+	-	-	ND ^c	ND	ND	118
PMA1.8, 2.8, 4.8, 5.8	+	-	-	ND	ND	ND	1.8
PMA3.8, 8.8, 10.8, 11.8, 14.8, 15.8, 17.8, 18.8	+	-	-	ND	ND	ND	3.8
PMA7.8	+	-	-	ND	ND	ND	7.8
PMA9.8	+	-	-	ND	ND	ND	9.8
PMA25.8	+	-	-	ND	ND	O3:KUT	25.8
Isolates from 2009							
PMA 10.9, 26.9, 31.9, 33.9	+	-	-	-	-	ND	118
PMA6.9	+	-	-	-	-	ND	128
PMA21.9	+	-	-	-	-	ND	187
PMA11.9	+	-	-	-	-	ND	34.6
PMA29.9	+	-	-	-	-	ND	40.6
PMA4.9	+	-	-	-	-	ND	21.7
PMA2.9	+	-	-	-	-	ND	2.9
PMA18.9	+	-	-	-	-	ND	18.9

^a Boldface, strain corresponds to the prototype strain of each DGREA group.

^b +, present; -, absent.

^c ND, not determined.

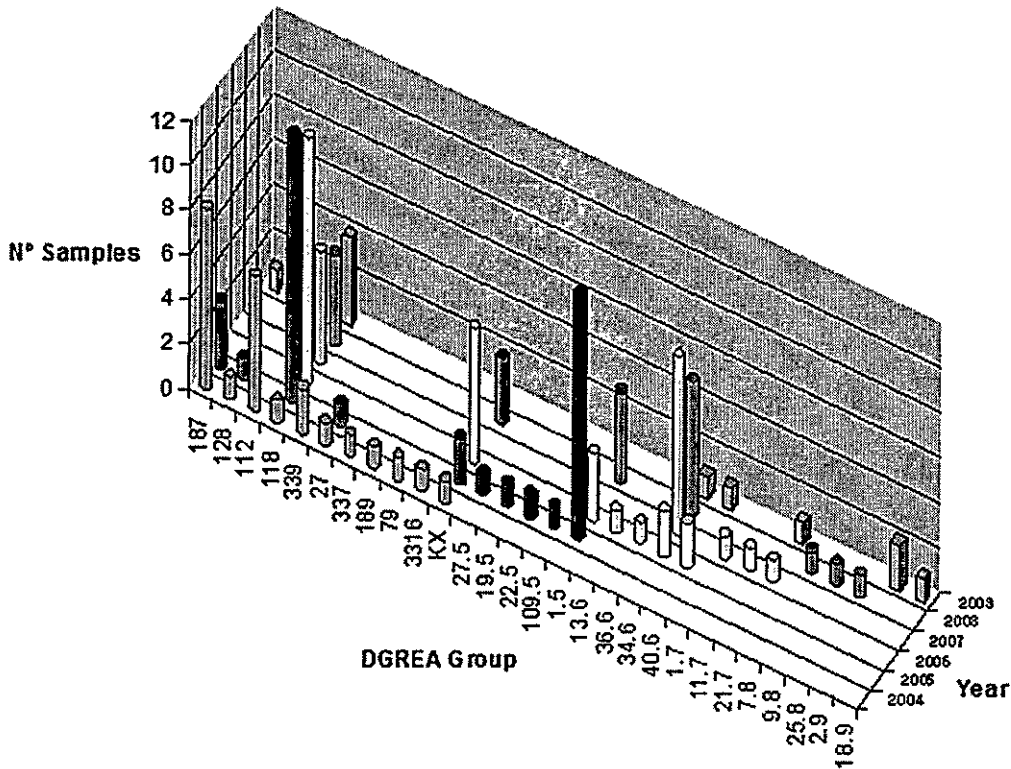


FIG. 1. Histogram showing the number of shellfish samples containing *V. parahaemolyticus* corresponding to the different DGREA groups observed each summer since 2004.

DGREA patterns. Serotyping was performed only for selected isolates (Table 2). The three *tdh*-positive isolates obtained in 2008 showed the characteristic genetic markers and DGREA pattern of the pandemic strain. None of these isolates contained the 42-kb plasmid.

***V. parahaemolyticus* population diversity in shellfish.** The *V. parahaemolyticus* population isolated from shellfish in Region de los Lagos comprises a large number of strains belonging to different DGREA groups that change considerably each summer (7, 8, 11). Isolates belonging to 23 DGREA groups have been isolated from 2004 to 2007. Sixteen nonpandemic isolates characterized in 2008 were differentiated into seven DGREA groups. Four groups had been observed in previous years. The 12 isolates obtained from shellfish in 2009 were differentiated into eight DGREA groups, six of which were previously observed. The new groups observed in 2008 and 2009 increase the number of DGREA groups isolated to date to 28, including the group KX corresponding to the pandemic strain. Figure 1 shows the number of samples containing isolates from the different DGREA groups since 2004 using the data reported here and previously (7, 8, 11).

DISCUSSION

Seafood-related diarrhea outbreaks reached a peak in 2005, with 3,600 and 10,984 cases reported by the Ministry of Health in Region de los Lagos and the whole country, respectively. Levels subsequently declined to reach their lowest numbers in 2007 with 477 and 1,008 cases in Region de los Lagos and the

whole country, respectively. In 2007, only 73% of the *V. parahaemolyticus* infections were caused by the pandemic strain, in contrast to almost 100% of these infections observed in previous years (11). Furthermore, 40% of the pandemic isolates analyzed in 2007 had the serotype O3:K59 instead of O3:K6. These results seemed to indicate a shift in the epidemiology of outbreaks caused by *V. parahaemolyticus*, which was expected to continue in the following years. However, in 2008 the reported cases unexpectedly increased from 477 to 1,143. At the same time, the epidemiology returned to the pattern observed in years prior to 2007 (Table 3). In 2007, in addition to the new O3:K59 serotype observed, a strain apparently generated by transference of the pathogenicity island from the pandemic clone to an indigenous *V. parahaemolyticus* strain (11) was found in 13% of clinical cases. However, in 2008 none of the changes observed in 2007 were maintained. Instead, 98% of clinical cases were related to the canonical pandemic strain, as observed prior to 2007, and neither the new pathogenic strains nor the serovar O3:K59 observed in 2007 was detected. In 2009 only 441 cases were reported, in contrast to the more than 1,000 cases reported in other years (with the exception of 2007). Also, similar to the observations in 2007, only 64% of the clinical cases (9 of 14 cases analyzed) were related to the pandemic strain. The other five cases corresponded to a single DGREA group and lacked the pathogenicity-associated genes *tdh* and *trh*. Since the same isolates were found in the five clinical cases, it is unlikely that they correspond to nonvirulent strains. This is an important observation for risk analysis since

TABLE 3. *V. parahaemolyticus* isolates in clinical and shellfish samples in Región de los Lagos, Chile, from 2004 to 2009^a

Yr	Clinical case data							Shellfish data					
	Total no. of cases	No. of cases analyzed	No. of pandemic strain-positive cases (%)	Pandemic isolate characteristic (no. of isolates [%]) ^b				Sample data (no. [%])			<i>V. parahaemolyticus</i> load ^c	Pandemic strain load ^c	No. of pandemic strain isolates
				O3:K6 negative	<i>orf8</i> negative	<i>toxRS</i> _{new} negative	42-kb phage positive	Total analyzed	<i>V. parahaemolyticus</i> positive	Pandemic strain positive			
2004	1,500	24	23 (96)	*	*	*	0/9 (0)	NI	NI	NI	NI	NI	1
2005	3,725	40	40 (100)	0	0	0	1/9 (11)	NI	NI	NI	NI	NI	2
2006	1,083	19	19 (100)	0	0	0	6/11 (54)	20	17 (85)	10 (50)	255	9.3	6
2007	477	37	27 (73)	13	0	0	0/27 (0)	20	16 (80)	4 (20)	22.6	2.5	0
2008	1,153	46	45 (98)	1	0	2	2/8 (25)	27	27 (100)	8 (30)	5.0	2.2	3
2009	441	14	9 (64)	0	0	0	2/13 (15)	17	14 (82)	4 (24)	3.3	0.5	0

^a Data for 2004 to 2007 was extracted or calculated from data from previous publication of our group (8, 9, 11). NI, data were not incorporated because the analysis was performed by a different and less sensitive method than that used since 2006.

^b Asterisk, 5 of 24 clinical strains were reported as variants of the pandemic strain (9), but further examination of these isolates showed that they corresponded to a pandemic strain contaminated with other *V. parahaemolyticus* strains. The data reported for the 42-kb phage represent the number of isolates positive/total number of pandemic strain isolates.

^c Total and pandemic *V. parahaemolyticus* loads were calculated according to the number of enrichment tubes positive for *ilh* and for *tdh* and *trh*, respectively; numbers correspond to the average geometric mean of bacteria/g in positive samples.

these two genes are considered markers of pathogenic strains and are used to estimate the load of pathogenic strains in seafood. The pandemic strain serovar O3:K59 and the other nonpandemic strains observed in clinical cases of 2007 were not detected in 2009. These overall results suggest the existence of a background level of diarrhea cases related to a diverse group of nonpandemic strains of pathogenic *V. parahaemolyticus*, which become evident when there are relatively few cases produced by the pandemic strain. This assertion is supported by observations in Japan and Taiwan in 1996, when the large diversity of *V. parahaemolyticus* serotypes observed in clinical cases was surpassed by the predominance of serotype O3:K6 (4, 23). The load of *V. parahaemolyticus* in shellfish and the number of pandemic isolates recovered from the enrichments seemed to parallel the extent of the outbreaks, but the sample number analyzed was too low to confirm a definite relationship.

The arrival and massive proliferation of the *V. parahaemolyticus* pandemic strain in Región de los Lagos offered us an exceptional opportunity to study the evolution of a clonal strain in its natural environment. As stated by Achtman and Wagner (1), these genetically monomorphic organisms may reveal evolutionary mechanisms undetectable in bacterial populations with greater sequence diversity, in which millions of years of evolutionary history have blurred genomic signals of phylogenetic history through recombination or have eliminated them through genomic reduction. Substantiating this claim, we found that two of the pandemic strains from clinical patients lacked the *toxRS*_{new} marker, one had serotype O3:KUT, and four contained a 42-kb linear prophage plasmid observed in pandemic strains since 2005 (24). However, except for the lysogenized variants, most of the variants seem to persist for short times and are observed only sporadically (Table 3). The emergence and disappearance of serotype variants have been reported previously (5).

Taking into account the five additional new DGREA groups found in 2008 and 2009, a total of 28 groups have now been detected in shellfish. According to the number of isolates observed at a single time and those observed more than once, the richness of *V. parahaemolyticus* DGREA groups in shellfish (mainly mussels) may be estimated by Chao1 analysis to be 60

(12). However, the number of different *V. parahaemolyticus* strains in shellfish is probably much larger since most of the samples analyzed correspond to a single shellfish species extracted from an area of less than 1 km². Using the Chao1 method, Thompson et al. (20) estimated that 1,287 *Vibrio splendidus* genotypes, as determined by pulsed-field gel electrophoresis patterns, occur in the water column.

The systematic follow-up of the *V. parahaemolyticus* strains in shellfish and clinical cases (summarized in Table 3) has contributed to a better description of the ecology of this species in seafood. The results presented here complement previous findings (7, 8, 11) and offer new observations that increase our knowledge of *V. parahaemolyticus* outbreaks in southern Chile. Overall, they show that the pandemic strain has become a relatively stable bacterial subpopulation of the diverse *V. parahaemolyticus* population present in shellfish in Chile. However, the pandemic strain is evolving by serotype changes and interactions with phages (24) and other *V. parahaemolyticus* subpopulations (11). The load of pandemic strain in shellfish seems to fluctuate yearly, and this oscillation could be related to the fluctuation of clinical cases. The results reported here together with those obtained from the summer of 2007 (11) indicate that there are other *V. parahaemolyticus* pathogenic strains that become evident when the prevalence of diarrhea cases related to the pandemic strain declines. Some of these pathogenic strains may consist of strains that are negative for *tdh* and *trh*. The isolation of the same strains—considering their grouping in the same DGREA group—from five clinical cases suggests that these isolates are not nonvirulent strains that proliferate during infection with a virulent strain, as has been suggested when isolates negative for *tdh* and *trh* are obtained (3). This is an important observation for risk analysis since these two genes are considered markers of pathogenic strains and are used to estimate the load of pathogenic strains in seafood.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gastón Higuera, Roberto Bastías, and Beatriz Zabala for their help with sample collection, isolation, and characterization of bacterial strains. We thank B. Suarez for access to his laboratory for collection of shellfish samples in 2008.

This work was supported in part by grant 1070658 from FONDECYT, Chile.

REFERENCES

- Achtman, M., and M. Wagner. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:431-440.
- Bej, A. K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. Vickery, D. D. Jones, and C. A. Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* 36:215-225.
- Bhoopong, P., P. Pallitapongarnpim, R. Pomwised, A. Kiatkittipong, M. Kamruzzaman, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, M. Ishibashi, and V. Yud-dhakul. 2007. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients. *J. Clin. Microbiol.* 45:1544-1550.
- Chiou, C. S., S. Y. Hsu, S. I. Chiu, T. K. Wang, and C. S. Chao. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 38:4621-4625.
- Chowdhury, A., M. Ishibashi, V. D. Thiem, D. T. N. Tuyet, T. Van Tung, B. T. Chien, L. von Seidlein, D. G. Canh, J. Clemens, D. D. Trach, and M. Nishibuchi. 2004. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol. Immunol.* 48:319-327.
- Chowdhury, N. R., O. C. Stine, J. G. Morris, and G. B. Nair. 2004. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 42:1280-1282.
- Fuenzalida, L., L. Armijo, B. Zabala, C. Hernandez, M. L. Riosco, C. Riquelme, and R. T. Espejo. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 117:270-275.
- Fuenzalida, L., C. Hernandez, J. Toro, M. L. Riosco, J. Romero, and R. T. Espejo. 2006. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ. Microbiol.* 8:675-683.
- Gonzalez-Escalona, N., V. Cachicas, C. Acevedo, M. L. Riosco, J. A. Vergara, F. Cabello, J. Romero, and R. T. Espejo. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11:129-131.
- Gonzalez-Escalona, N., J. Martinez-Urtaza, J. Romero, R. T. Espejo, L. A. Jaykus, and A. Depaola. 2008. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J. Bacteriol.* 190:2831-2840.
- Harth, E., L. Matsuda, C. Hernandez, M. L. Riosco, J. Romero, N. Gonzalez-Escalona, J. Martinez-Urtaza, and R. T. Espejo. 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 163-168.
- Hughes, J. B., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. Bohannan. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4399-4406.
- Iida, T., K. S. Park, and T. Honda. 2006. *Vibrio parahaemolyticus*, p. 340-348. In F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (ed.), *The biology of vibrios*. ASM Press, Washington, DC.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743-749.
- Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Ramamurthy, H. C. Wong, A. Depaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38:578-585.
- Nair, G. B., T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda, and D. A. Sack. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:39-48.
- Nasu, H., T. Iida, T. Sugabara, Y. Yamaichi, K. S. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa, and T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2156-2161.
- Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.
- Olea, A. M., C. González, M. Chiu, C. Vallebuona, M. Labraña, and F. Martiniello. 2005. Brote de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Chile. *Revista Chilena Salud Pública* 9:51-53.
- Thompson, J. R., S. Pacocha, C. Pharino, V. Klepac-Ceraj, D. E. Hunt, J. Benoit, R. Sarma-Rupavtarm, D. L. Distel, and M. F. Polz. 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* 307: 1311-1313.
- Urakawa, H., and I. N. Rivera. 2006. Aquatic environment, p. 175-189. In F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (ed.), *The biology of vibrios*. ASM Press, Washington, DC.
- Wong, H. C., S. H. Liu, T. K. Wang, C. L. Lee, C. S. Chiou, D. P. Liu, M. Nishibuchi, and B. K. Lee. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3981-3986.
- World Health Organization. 1999. *Vibrio parahaemolyticus*, Japan, 1996-1998. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 74:361-363.
- Zabala, B., K. Garcia, and R. T. Espejo. 2009. Enhancement of UV light sensitivity of a *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic strain due to natural lysogenization by a telomeric phage. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1697-1702.