

UCH-FC
DOC-Microbiología
B555
C. I.



Transferencia génica horizontal como mecanismo evolutivo
en *Vibrio parahaemolyticus*.

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:

Erika Nikitza Shiauha Harth Chu

Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo T.

Marzo del 2008

**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 el candidato.

ERIKA NIKITZA SHIAUHA HARTH CHU

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 de Tesis rendido el día 19 de marzo del 2008.

Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo T.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several vertical strokes followed by a horizontal line and a small flourish.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Rosalba Lagos" written in a cursive style.

Dra. Margarita Carú

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Margarita Carú" written in a cursive style.

Dr. Omar Orellana

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Omar Orellana" written in a cursive style.

Con todo mi cariño para:

Mis abuelitos ANDREA y DELFIN

Mi mamá MIRTHA y mi hermano JHON LIN

Mis tíos LEYDITH y JOSE LIN



Con mucho amor para:

JOSE LUIS



Nací en una ciudad pequeña del departamento de San Martín, Tarapoto, en la región amazónica del Perú, el 5 de marzo de 1979. Allí me crié con mis abuelitos, mi mamá, mi hermano y mi tía, hasta concluir la educación secundaria. Mis abuelitos fueron un pilar muy importante en mi desarrollo personal. En el año 1996, nos mudamos a la ciudad de Trujillo - en la costa norte peruana - para realizar mis estudios universitarios en la Universidad Nacional de Trujillo, decidida a estudiar Medicina, pues en Tarapoto no había la posibilidad de hacerlo. Durante la preparación para el ingreso a la universidad comencé a interesarme por una carrera distinta, que tuviera la posibilidad de investigar nuevas cosas sobre el mundo microbiano. Así, terminé la carrera de Microbiología y Parasitología el año 2001 y continué con la Maestría en Microbiología Clínica en la misma universidad. Al año siguiente, mientras me encontraba realizando un entrenamiento en un laboratorio de Parasitología en la Universidad de Georgia – EE.UU dirigido por la Dra. Ynés Ortega, pierdo a mi abuelita, siendo un gran dolor en mi vida. Pero a la vez conozco a una persona muy importante, que me acompañaría en todo momento y para siempre, José Luis. Luego postulo a una beca DAAD para hacer el Doctorado en Microbiología en la Universidad de Chile, incorporándome al laboratorio de Biotecnología del INTA, bajo la dirección del Dr. Romilio Espejo. Es así que emprendo una nueva experiencia académica y de vida durante 4 años. Durante mi permanencia en Santiago, mi abuelito fallece, lo que me lleva a aprender a valorar más la vida. A finales del 2006 tuve la oportunidad de hacer una pasantía en el Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung – Braunschweig, en Alemania, con el Dr. Manfred Höfle. Ahora, veo concluida esta etapa en mi vida, pero además comienza una nueva...

"Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano" (Isaac Newton)

Con todo mi cariño para:

Mis abuelitos ANDREA y DELFIN

Mi mamá MIRTHA y mi hermano JHON LIN

Mis tíos LEYDITH y JOSE LIN



Con mucho amor para:

JOSE LUIS



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar conmigo en los momentos de alegría y por ser mi fortaleza en los momentos de soledad y tristeza.

A mis abuelitos Andrea y Delfín, quienes me brindaron lo mejor de sus vidas y me enseñaron todo lo que soy...sé que estarían orgullosos de mí.

A mi mamá Mirtha y mi hermano Jhon Lin, por su constante apoyo y consejos, por estar conmigo en todo momento, les agradezco de todo corazón.

A mi tía Leydith, por estar siempre pendiente de mí, por todos los detalles que siempre ha tenido y tiene conmigo, y por todo su cariño.

A mis tíos José Lin y Luz, por ayudarme desinteresadamente, por brindarme su casa, su cariño y apoyo en los momentos difíciles.

A José Luis, por su amor incondicional, por todo el apoyo emocional que me ha brindado, y por estar a mi lado siempre a pesar de la gran distancia física a la que nos tuvimos que enfrentar.

Al profesor Romilio Espejo, por su persistente guía, su valiosa ayuda, sentido del humor, siempre sabios consejos y oportunas críticas, de las cuales aprendí y que ayudaron en mi desarrollo profesional.

A los profesores Rosalba Lagos, Margarita Carú y Omar Orellana, por sus críticas, sugerencias y comentarios a la presente tesis.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Claudia Acevedo, Jessica Toro, Gastón Higuera, Beatriz Zabala, Lorena Armijo, Katherine García, Rafael Torres y Roberto Bastías, por esos gratos momentos, por sus valiosas enseñanzas y sugerencias.

A Loreto Fuenzalida, por compartir conmigo sus conocimientos, su amistad, su familia y hacerme sentir como en casa en aquellos momentos en los que lo necesitaba.

A Julieta Orlando, por compartir estos 4 años de experiencias, porque juntas aprendimos a convivir, tolerar y respetar nuestras costumbres...gracias por todo el apoyo brindado, por la amistad, colaboración y complicidad.

A Lina Ruíz, por su amistad, por su compañía en las horas de estudio, por sus consejos, por esos momentos de alegrías y tristezas juntas.

A mis amigos de la "Confederación Latinoamericana", Andrés Villa, Diego Gaitán, Pilar Martínez, Mario Paez, Hugo Begazo, Cecilia Pabón, Sergio Gutiérrez, por su solidaridad, compañerismo y por esos momentos en los cuales compartimos nuestra diversidad cultural...gracias!

Al Dr. Manfred Höfle y a la Dra. Ingrid Brettar, por la ayuda brindada durante mi estadía en Braunschweig, y por el apoyo profesional y personal.

Al DAAD - Deutscher Akademischer Austausch Dienst- Servicio de intercambio académico alemán, por hacer posible mi estadía en Santiago y la realización del doctorado. Al proyecto FONDECYT 1040875 por su apoyo económico parcial a la realización de la presente tesis.

INDICE DE MATERIAS



	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE MATERIAS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCION	1
1. Epidemiología y diversidad de aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> en Chile.	2
2. Operones ribosomales y genes 16S rRNA en <i>V. parahaemolyticus</i> .	5
3. Evolución de genes repetidos en un genoma.	8
4. Generación de nuevas cepas por transferencia génica horizontal.	10
5. Islas de patogenicidad: importancia en la evolución bacteriana.	11
MATERIALES Y METODOS	16
1. Aislamiento de <i>V. parahaemolyticus</i> desde muestras ambientales y clínicas.	16
2. Cepas y condiciones de cultivo.	17
3. Caracterización fenotípica	20
4. Caracterización genotípica.	21
5. Extracción de DNA.	21
6. Amplificación por PCR del <i>rrs</i> .	22
7. Amplificación por PCR de genes y regiones de la isla de patogenicidad.	22
8. Amplificación por PCR de los genes "housekeeping".	23



9. Purificación de los amplicones y secuenciación.	27
10. Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)	27
11. Construcción de dendrogramas	28
12. Análisis de secuencias	29
RESULTADOS	30
1. Caracterización de los aislados ambientales de <i>V. parahaemolyticus</i> obtenidos durante los brotes ocurridos en Chile	30
1.1. Diversidad genómica de los aislados ambientales.	30
1.2. Heterogeneidad intragenómica en los genes <i>rrs</i> .	32
2. Caracterización de la heterogeneidad intragenómica de los <i>rrs</i> en aislados ambientales.	37
2.1. Secuencias <i>rrs</i> .	37
2.2. Estructura secundaria de los diferentes <i>rrs</i> .	42
3. Caracterización de aislados clínicos no pandémicos.	47
3.1. Presencia de marcadores de virulencia y heterogeneidad en sus <i>rrs</i> .	47
3.2. Presencia de la isla de patogenicidad.	50
3.3. Identificación de los sitios de inserción de la isla de patogenicidad	54
DISCUSION	57
1. Caracterización de la heterogeneidad intragenómica de los <i>rrs</i> en aislados ambientales.	57
1.1. Heterogeneidad intragenómica en los genes 16S rRNA (<i>rrs</i>).	57
1.2. Estructura secundaria de los diferentes <i>rrs</i> .	58
1.3. Posibles causas de la heterogeneidad en los <i>rrs</i> .	59
1.4. Significado de la heterogeneidad intragenómica de los genes <i>rrs</i> .	61
2. Epidemiología de los brotes por <i>V. parahaemolyticus</i> y ocurrencia de nuevas cepas clínicas no pandémicas.	63
3. Caracterización de aislados clínicos no pandémicos.	66
3.1. Presencia de genes del SSTT2 en un aislado ambiental.	66

3.2. Presencia de la isla de patogenicidad en PMC38.7.	67
4. Evolución de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante transferencia génica horizontal.	69
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA	73
ANEXO	85



LISTA DE TABLAS



	Página
Tabla 1. Características de aislados ambientales obtenidos desde mariscos durante 1998, 2004 al 2007 en Chile y pertenecientes a distintos grupos DGREA.....	18
Tabla 2. Características de aislados clínicos de <i>V. parahaemolyticus</i> obtenidos el 2007 desde Puerto Montt.	20
Tabla 3. Pares de partidores diseñados para amplificar por PCR el <i>rrs</i> y genes de la isla de patogenicidad.....	24
Tabla 4. Secuencias de los partidores usados para amplificar por PCR los genes del Sistema de Secreción Tipo III (SSTT2) contenidos sobre el cromosoma 2 de <i>V. parahaemolyticus</i>	25
Tabla 5. Pares de partidores empleados para amplificar por PCR distintos segmentos dentro de la isla de patogenicidad.....	26
Tabla 6. Secuencias de los segmentos <i>rrs</i> en VpKX y en los aislados con <i>rrs</i> heterogéneos, y sus porcentajes de coincidencias en la base de datos RDP.....	41
Tabla 7. Secuencias de los segmentos variables de los <i>rrs</i> en diferentes bandas PFGE observados luego de la hidrólisis de los aislados con la enzima de restricción ICeu-I.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Fig. 1. Análisis directo del genoma de <i>V. parahaemolyticus</i> con <i>NaeI</i> (DGREA) en las cepas tipo de cada uno de los 27 grupos correspondientes a muestras de mariscos recolectadas en los veranos de 1998, 2004 al 2007.....</p>	31
<p>Fig. 2. Histograma del número de muestras de mariscos conteniendo <i>V. parahaemolyticus</i>, correspondiente a los distintos grupos DGREA observados desde el verano del 2004 hasta el 2007.....</p>	33
<p>Fig. 3. DGREA con <i>NaeI</i> de la cepa tipo de cada grupo correspondientes a muestras clínicas y de mariscos recolectadas en los veranos de 1998, 2004 y 2005.....</p>	34
<p>Fig. 4. Productos de la amplificación por PCR del segmento variable de los <i>rrs</i> de diferentes aislados de <i>V. parahaemolyticus</i>.....</p>	34
<p>Fig. 5. Productos de la amplificación por PCR del segmento variable de los <i>rrs</i> en aislados ambientales pertenecientes a 3 grupos DGREA distintos.....</p>	36
<p>Fig. 6. Esquema que ilustra el patrón esperado luego de digerir el DNA genómico total de VpKX con <i>ICeu-I</i> y el ordenamiento cromosomal de las múltiples copias de <i>rrn</i>.</p>	38
<p>Fig. 7. Electroforesis en gel en campo pulsado de fragmentos de restricción (PFGE-RFLP) del DNA de VpKX y cepas tipo de <i>V. parahaemolyticus</i> representantes de los 13 grupos DGREA con <i>rrs</i> heterogéneos, digeridos con <i>ICeu-I</i>.....</p>	39

Fig. 8. Estructura secundaria del 16S rRNA de <i>V. parahaemolyticus</i> X56580 y estructuras secundarias de cuatro principales secuencias de los segmentos <i>rrs</i> encontradas en diferentes aislados ambientales de <i>V. parahaemolyticus</i>	43
Fig. 9. Electroferograma obtenido de la secuencia correspondiente al segmento variable del amplicón <i>rrs</i> de la cepa PMA19.5.	46
Fig. 10. DGREA con <i>NaeI</i> de aislados clínicos representantes de los distintos patrones observados durante los brotes del verano 2007 en Puerto Montt.....	48
Fig. 11. Productos de la amplificación por PCR de la región variable de los <i>rrs</i> en aislados clínicos no pandémicos.....	49
Fig 12. Dendrograma que muestra la relación filogenética de los aislados clínicos no pandémicos chilenos con aislados pandémicos.....	50
Fig. 13. Diagrama que ilustra las regiones amplificadas por PCR en la isla de patogenicidad de PMC38.7.....	53
Fig. 14. Productos de la amplificación por PCR de los límites de la isla de patogenicidad en VpKX y PMC38.7.....	55
Fig. 15. Esquema que ilustra las regiones cromosomales flanqueantes a la isla de patogenicidad en VpKX, que fueron amplificadas por PCR en PMC38.7.....	56

ABREVIATURAS

DGREA	: Análisis directo del genoma con enzimas de restricción
PMA	: Aislado ambiental de Puerto Montt
COA	: Aislado ambiental de Copiapó
ATA	: Aislado ambiental de Antofagasta
LIA	: Aislado ambiental de Lirquén
PMC	: Aislado clínico de Puerto Montt
ATC	: Aislado clínico de Antofagasta
<i>rrs</i>	: Gen del 16S rRNA
<i>rrn</i>	: Operón ribosomal
pb	: Pares de bases
Mbp	: Mega pares de bases
Kbp	: Kilo pares de bases
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
PFGE	: Electroforesis en gel en campo pulsado
MLST	: Tipificación en base a secuencias de múltiples loci
ST	: Secuencia tipo por MLST
SST2	: Sistema de secreción tipo III sobre el cromosoma 2
IPa	: Isla de patogenicidad

RESUMEN

Vibrio parahaemolyticus es una especie bacteriana marina asociada a mariscos capaz de causar diarrea en humanos. Las bacterias de esta especie contienen 11 copias de operones de RNA ribosomales (*rrn*). La presencia de tantos genes repetidos requiere un mecanismo para evitar que los genes 16S rRNA (*rrs*), 23S rRNA (*rrl*) y 5S rRNA (*rrf*) que conforman este operón se vayan diferenciando. El fenómeno de mantención de la misma secuencia en los genes repetidos, denominado “evolución concertada”, sólo ha podido ser explicado con teorías. Existen cepas de *V. parahaemolyticus*, como la RIMD2210633 (VpKX), con copias idénticas de los genes *rrs* presentes en los 11 *rrn*. Sin embargo, otras como la ATCC17802 (VpD), muestran heterogeneidad entre sus *rrs*.

Esta tesis caracterizó inicialmente la extensión y diversidad de la heterogeneidad en los *rrs* de *V. parahaemolyticus* en aislados clínicos y ambientales obtenidos de mariscos, y pertenecientes a grupos genotípicos distintos, diferenciados por sus patrones de restricción del genoma (DGREA). Aproximadamente el 62% de los aislados mostraron heterogeneidad intragenómica en sus *rrs*, conteniendo en total 16 secuencias diferentes dentro de un segmento de 25 nucleótidos ubicado entre los nucleótidos 455 - 479 del 16S rRNA (según el 16S rRNA de *Escherichia coli*). A pesar que los sitios diferentes pueden constituir 12 a 48% de los sitios nucleotídicos, cada segmento conserva la estructura de horquilla o “stem-loop” característica de esta región del *rrs*. La acumulación de tantas sustituciones con cambios compensatorios implica que la divergencia de los diferentes *rrs* es relativamente muy antigua.

La explicación más adecuada de nuestros resultados es que la heterogeneidad en los *rrs* se genera por recombinación entre segmentos de *rrs* que provienen de distintas bacterias. La alta proporción de aislados ambientales con heterogeneidad (62%) sugiere que la transferencia lateral y la recombinación son frecuentes entre cepas de *V.*

parahaemolyticus. Esta transferencia se daría entre especies del género *Vibrio* ya que las secuencias encontradas en las variantes se observan sólo en bacterias de este género.

La población de *V. parahaemolyticus* en mariscos es muy diversa, habiéndose encontrado desde el 2004 al 2007 un total de 23 cepas genotípicamente distintas sólo en el Seno de Reloncaví (región de Puerto Montt). En cambio, la población de *V. parahaemolyticus* en los casos clínicos sólo incluyó hasta el 2006 aislados de la cepa clonal pandémica que contiene *rrs* idénticos. El 2007 se detectó una nueva cepa clínica que a diferencia de las anteriormente encontradas mostraba diferencias entre sus *rrs*. Este nuevo grupo de aislados clínicos, cuya cepa tipo es PMC38.7, causó aproximadamente el 13% de los casos del brote de *V. parahaemolyticus* en Puerto Montt en el verano del 2007. El análisis de sus genes *rrs* mostró heterogeneidad con la presencia de 3 secuencias diferentes. La caracterización detallada de esta cepa, incluida en esta tesis, mostró que contiene genes de virulencia idénticos a VpKX (cepa pandémica) aunque pertenece a un complejo clonal distinto al pandémico, causante de la mayoría de los brotes antes reportados en esta misma región, Siete genes “housekeeping” muestran en cambio diferencias nucleotídicas de un promedio de 1.5%. Los genes de virulencia encontrados en esta cepa corresponden a genes del sistema de secreción tipo III ubicados en una isla de patogenicidad en el cromosoma 2 (SSTT2) de VpKX. La presencia de genes del SSTT2 idénticos a los de VpKX en bacterias que difieren en sus genes “housekeeping” y en sus patrones DGREA, sumada a la heterogeneidad de sus *rrs*, sugiere que la cepa PMC38.7 se originó por transferencia horizontal de la isla de patogenicidad desde VpKX a una cepa ambiental.

De acuerdo a estos resultados entendemos ahora que la población de *V. parahaemolyticus* en mariscos está conformada por grupos genotípicos distintos que pueden, por transferencia lateral, intercambiar con alta frecuencia genes *rrs* y genes relacionados con patogenicidad, generando nuevas cepas potencialmente patógenas.

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is a bacteria associated with shellfish and cause diarrhea in humans. Bacteria of this specie contain 11 copies of ribosomal RNA operons (*rrn*). The presence of so many repeated genes require a mechanism to prevent genes 16S rRNA, 23S rRNA and 5S rRNA, that conforms *rrn* operon, continue differentiating. The phenomenon for maintaining the same sequence in the repeated genes, called "concerted evolution", could only be explained with assumptions. There are strains of *V. parahaemolyticus*, as RIMD2210633 (VpKX) with identical copies of *rrs* genes present in the 11 *rrn*. However, others strains such as the ATCC17802 (VpD) show heterogeneity among its *rrs*.

This thesis initially characterized the extent and diversity of heterogeneity in the *V. parahaemolyticus* *rrs* genes in clinical and environmental isolates obtained from seafood that belonging to different genotypic groups, differentiated by their restricted genome (DGREA). Approximately 62% of isolates showed heterogeneity intragenomic in their *rrs*, containing a total of 16 different sequences within a segment of 25 nucleotides located between nucleotides 455 - 479 of the 16S rRNA (according to the 16S rRNA from *Escherichia coli*). Despite the different sites may constitute 12 to 48% of nucleotide sites, each segment retains the hairpin structure or "stem-loop" characteristic of this region of *rrs*. The accumulation of so many substitutions with compensatory variations means that the divergence of different *rrs* is relatively very ancient.

The most appropriate explanation of our results is that the heterogeneity in the *rrs* is generated by recombination between *rrs* segments from different bacteria. The high proportion of environmental isolates with heterogeneity (62%) suggested that the horizontal transfer and recombination are common among strains of *V. parahaemolyticus*. This transfer would be between species within the genus *Vibrio* because the sequences found in the variants are found only in bacteria of this genus.

V. parahaemolyticus population in seafood is very diverse, revealing from 2004 to 2007 a total of 23 strains genotypically different only in the Reloncaví Inlet (region of

Puerto Montt). In contrast, *V. parahaemolyticus* population in clinical cases included only the clonal pandemic strain isolates until 2006, which contain *rrs* identical. In 2007 was detected a new clinic strain that differ those previously found showed differences between their *rrs*. This new group of clinical isolates, whose type strain is PMC38.7, caused approximately 13% of cases in the *V. parahaemolyticus* outbreak in Puerto Montt in the summer of 2007. The analysis of their *rrs* genes showed heterogeneity and the presence of 3 different sequences. The detailed characterization of this strain, showed that contains virulence genes identical to VpKX (pandemic strain) but belongs to a different clonal complex than pandemic, the source of most of the outbreaks reported earlier in the same region. Seven gene "housekeeping" show nucleotide differences in average of 1.5%. The virulence genes found in this strain correspond to type III secretion system genes located on the pathogenicity island on the chromosome 2 (SSTT2) in VpKX. The presence of SSTT2 genes identical to those of VpKX in bacterial that differ in their "housekeeping" and their DGREA, coupled with the heterogeneity of their *rrs*, suggested that the strain PMC38.7 was originated by horizontal transfer of the pathogenicity island from VpKX to an environmental strain.

According to these results, we understand now that *V. parahaemolyticus* seafood population is conforming different genotypic groups that may, by lateral transfer, exchange to high frequency *rrs* genes and genes associated with pathogenicity, generating new potentially pathogenic strains.

INTRODUCCION

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria capaz de causar diarrea en humanos, que habita naturalmente en aguas marinas costeras, especialmente estuarios. Su concentración en el agua o mariscos se ve afectada por cambios en la temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y presencia de otros organismos marinos. Estas bacterias se asocian al plancton y moluscos bivalvos. Estos últimos las acumulan durante el proceso de filtración y alimentación, donde alcanzan concentraciones hasta 100 veces superiores a las del agua (Heitmann y col., 2005).

V. parahaemolyticus fue reconocido en el año 1950 como agente de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) en Japón. Desde entonces ha adquirido un rol más protagónico como agente causal de infección gastrointestinal relacionada con el consumo de mariscos crudos o insuficientemente cocidos (Sumner y col., 2001). La mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* encontradas en el mar son inocuas, menos del 1% de los aislados de origen ambiental (agua, mariscos) poseen la capacidad de producir infección entérica.

Las infecciones por *V. parahaemolyticus* causantes de la mayoría de gastroenteritis relacionadas con el consumo de alimentos marinos estaban asociadas con múltiples serotipos hasta 1996. Desde entonces, gran parte de los casos han sido causados por el serotipo O3:K6 (Bag y col., 1999), denominado clon pandémico, por corresponder a un grupo de bacterias con el mismo origen que se expandieron rápidamente por gran parte del mundo. La mayoría de aislados de este clon pandémico

muestran una secuencia única dentro del operón *toxRS* (*toxRS/new*) (Matsumoto y col., 2000) y poseen un único marco abierto de lectura, *orf8* (Nasu y col., 2000), el cual corresponde a un fago filamentoso temperado. Otras propiedades de las cepas pandémicas son la presencia del gen *tdh* (hemolisina directa termoestable) y la ausencia de *trh* (hemolisina relacionada a TDH) y del gen de la ureasa (Suthienkul y col., 1995).

1. **Epidemiología y diversidad de aislados de *V. parahaemolyticus* en Chile.**

Durante Noviembre de 1997 y Marzo de 1998, ocurrió el primer brote de *V. parahaemolyticus* en la ciudad de Antofagasta (23°39'S 70°24'W), observándose aproximadamente al menos 300 casos clínicos (Córdova y col., 2002). Un segundo brote que afectó aproximadamente 1500 personas (Unidad de Epidemiología, Servicio de Salud Llanquihue-Chiloé-Palena, Chile, comunicación personal), ocurrió durante Enero y Marzo del 2004, en la región de Puerto Montt (41°29'S 72°24'W). En el 2005, aproximadamente 3600 casos clínicos fueron reportados en esa misma región (Olea y col., 2005). Además, el 2005, la epidemia se extendió en todo el país con aproximadamente 11000 casos, probablemente causados por los mariscos de Puerto Montt ya que esta región produce cerca del 80% de los mariscos consumidos en las principales ciudades. Desde el 2004 al 2007 han ocurrido un número total aproximado de 7000 casos sólo en esta región. Prácticamente todos estos casos han sido causados por la cepa pandémica identificada originalmente en el Sudeste asiático en 1996 (Okuda y col., 1997).

Una especie bacteriana es un conjunto de aislados originados de un ancestro común, en el cual la divergencia genética de una generación constante resulta en clones (Maslow y col., 1993). Los clones son definidos como aislados relacionados que son indistinguibles uno de otro por una variedad de métodos de tipificación molecular (Farber, 1996). La divergencia genética de las cepas surge aleatoriamente, debido a mutaciones no letales que se acumulan con el tiempo (Maslow y col., 1993).

La especie *V. parahaemolyticus* está conformada por cepas evolutivamente cercanas pero que conforman diferentes complejos clonales (Matsumoto y col., 2000). Los clones se pueden distinguir por sus patrones obtenidos mediante el uso de diferentes técnicas, como son la PCR con partidores arbitrarios (AP-PCR) (Okuda y col., 1997; Matsumoto y col., 2000), tipificación en base a la secuencia de múltiples loci (MLST) (Chowdury y col., 2004), RFLP-PFGE (Wong y col., 2000) y análisis directo del genoma por restricción enzimática (DGREA) (Fuenzalida y col., 2006). Empleando este último método, se han descrito 23 clones distintos de *V. parahaemolyticus* obtenidos de mariscos del sur de Chile desde el 2004 hasta el 2007. La cepa pandémica representa sólo una fracción menor de esta población diversa que está cambiando constantemente en los mariscos de la región de Puerto Montt (González-Escalona y col., 2005, Fuenzalida y col., 2006 y 2007; Harth y col., manuscrito).

La serotipificación de *V. parahaemolyticus* ha mostrado ser poco fiable en el seguimiento de la dispersión del clon pandémico, ya que se han identificado al menos 11 serovariantes distintas al serotipo original O3:K6 (Ansaruzzaman y col., 2005;

Chowdury y col., 2004a, 2004b). Estas nuevas serovariantes son muy similares o indistinguibles de las cepas O3:K6 por una variedad de técnicas moleculares que incluyen: AP-PCR, PFGE, ribotipificación, análisis de ISR1 y DGREA (Chowdury y col., 2000; González-Escalona y col., 2005; Matsumoto y col., 2000; Okuda y col., 1997; Fuenzalida y col., 2006). Estas técnicas demuestran alta diversidad en *V. parahaemolyticus* y son útiles para el seguimiento de la incidencia y propagación del clon pandémico, pero proveen una información muy limitada acerca de la relación genética o la evolución de este clon y su interacción con otras cepas.

La tipificación por secuencias de múltiples loci (MLST) se basa en el análisis de secuencias de genes “housekeeping” seleccionados, y se está convirtiendo en el método de elección para determinar la epidemiología global de patógenos bacterianos (Maiden y col., 1998; Maiden, 2006). MLST provee una caracterización definitiva de aislados bacterianos y otros organismos, siendo los resultados consistentes entre uno y otro laboratorio. Estudios previos de MLST han conducido a un mejor entendimiento de la relación genética entre cepas de una especie y han identificado la importancia evolutiva de mutaciones y eventos de transferencia lateral (Feil y col., 1999 y 2003; Miragaia y col., 2007).

Un reciente estudio de MLST ha sido realizado utilizando 7 genes “housekeeping”: 3 para el cromosoma I (*recA*, *dnaE* y *gyrB*) y 4 para el cromosoma II (*dtdS*, *pntA*, *pyrC* y *tnaA*), y una colección geográficamente diversa de aproximadamente 100 cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicas y no pandémicas, lo

cual permitió establecer que en *V. parahaemolyticus* la recombinación puede producir mayor variación genética que las mutaciones puntuales (González-Escalona y col., manuscrito).

2. Operones ribosomales y genes 16S rRNA en *V. parahaemolyticus*.

Los genes que codifican los RNAs ribosomales (rRNA) 5S, 16S y 23S están típicamente organizados en un operón, en miembros del dominio Bacteria (Klappenbach y col., 2000). Los genes ribosomales en los operones ribosomales (*rrn*) se presentan en la siguiente secuencia: 16S (*rrs*) – 23S (*rrl*) – 5S (*rrf*). El transcrito único primario de cada operón es procesado posteriormente a su transcripción para generar los diferentes RNAs que se encuentran en los ribosomas (Condon y col., 1992; Gurtler y Stanisich, 1996).

El número de copias de operones *rrn* por genoma bacteriano es variable. Las diversas especies bacterianas pueden contener de una hasta 15 copias del gen *rrs* (Acinas y col., 2004). El número de operones *rrn* podría establecer la rapidez con la cual los microbios pueden sintetizar ribosomas y responder a cambios favorables en condiciones de crecimiento (Condon y col., 1995; Stevenson y Schmidt, 1998). Por lo tanto, el número de operones *rrn* en un genoma representaría un indicador genético de la estrategia ecológica de una bacteria para responder a la disponibilidad de recursos nutritivos (Klappenbach y col., 2000).

Hay 2 hipótesis principales para explicar la existencia de múltiples operones *rrn* dentro de un genoma. Estas múltiples copias de operones *rrn*: i) proveen un efecto multiplicador sobre la traducción, permitiendo a la bacteria crecer rápidamente en respuesta a un cambio ambiental (Klappenbach y col., 2000) y/o ii) existiría una diferenciación funcional entre operones rRNA con una expresión diferencial en respuesta a un cambio ambiental (Gunderson y col., 1987).

V. parahaemolyticus poseen 11 operones *rrn* que pueden contener *rrs* diferentes o iguales. Las diferencias se ubican en una región reconocida como hipervariable dentro de los *rrs* de diferentes géneros (Gray y col., 1984) así como de diferentes especies de *Vibrio* (Dorsch y col., 1992), que comprende los nucleótidos 440 – 496 (numeración del *rrs* de *Escherichia coli*). El genoma de la cepa secuenciada de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 (VpKX) consiste de 2 cromosomas circulares que incluyen 11 copias de *rrn*: 10 en el cromosoma 1 y una en el cromosoma 2 (Makino y col., 2003). El análisis de la secuencia en cada operón muestra que contiene alelos *rrs* casi idénticos. Sin embargo, otras cepas de *V. parahaemolyticus* como el ATCC17802 (VpD), muestran heterogeneidad intragenómica entre sus *rrs* (González-Escalona y col., 2005; Moreno y col., 2002). La cepa VpD contiene 2 clases de *rrs* (Moreno y col., 2002), que difieren en 10 sitios nucleotídicos dentro de un segmento de 25 bases. Este segmento codifica una horquilla (“stem loop”) hipervariable del 16S rRNA, el cual incluye los nucleótidos 455 - 479 (numeración de *E. coli*). En VpD, 7 operones *rrn* contienen alelos *rrs* con un tipo de secuencia y 4 con la otra (González-Escalona y col., 2005). Uno de estos segmentos difiere en 7 nucleótidos del segmento correspondiente en la cepa VpKX, y el otro difiere

en 10. Sin embargo, a pesar de la gran diferencia de secuencias, cada segmento conserva la estructura de horquilla que es característica de esta región en el RNA ribosomal.

El hecho de tener *rrs* polimórficos podría constituir una ventaja selectiva, involucrando la posibilidad de tener varias moléculas de *rrs* que respondan de manera diferente a la presencia de compuestos que interactúan con los ribosomas bacterianos, como por ejemplo algunos antibióticos (Recht y col., 1999; Vakulenko y Mobashery, 2003). Sin embargo, los sitios nucleotídicos en el *rrs* que están asociados con resistencia a antibióticos (Hu y Ochi, 2001; Recht y col., 1999) no muestran correspondencia con los sitios polimórficos observados en *V. parahaemolyticus*. Se ha mostrado que los sitios nucleotídicos 456-476 en el *rrs* de *E. coli*, coincidentes con la región variable de 25 bases en *V. parahaemolyticus*, son necesarios para la interacción específica con la proteína ribosomal S4, la cual es esencial para iniciar el ensamblaje del ribosoma (Sapag y col., 1990).

Varias características del gen 16S rRNA, tal como su función esencial y sus propiedades evolutivas, le han permitido ser uno de los marcadores moleculares más usados en ecología microbiana. Sin embargo, un hecho que ha sido pasado por alto es que múltiples copias de este gen están comúnmente presentes en ciertas bacterias y que estas copias intragenómicas pueden diferir en secuencia, conduciendo a la identificación de múltiples ribotipos para un solo organismo.

3. Evolución de genes repetidos en un genoma.

Los genes repetidos en un cromosoma, como es el caso de los *rrn*, pueden ir diferenciándose entre sí al sufrir independientemente cambios en su secuencia ocasionados por distintos eventos. Éstos pueden ser: mutaciones, rearrreglos en el DNA cromosomal y adquisición de DNA externo transferido lateralmente (Arber, 2000). La evidencia acumulada en los últimos años sugiere que de estos tres mecanismos, el más significativo es la recombinación con fragmentos transferidos lateralmente. Originalmente se creyó que la transferencia lateral de genes de RNA ribosomal era muy improbable, debido a la larga coevolución de los RNA ribosomales con otros cuarenta o más genes con cuyos productos debe interactuar (Jain y col., 1999). Sin embargo, actualmente se ha visto que la transferencia lateral de genes ribosomales entre especies evolutivamente cercanas, puede ser muy frecuente (Strätz y col., 1996, Asai y col., 1999). Los cambios en los genes de RNA ribosomal, ocasionados por la transferencia lateral, se verían facilitados porque no requieren cambio del gen completo y pueden involucrar sólo fragmentos pequeños de estos genes (Wang y Zhang, 2000). La transferencia lateral puede ocurrir por transformación, conjugación y transducción. En bacterias marinas como los *Vibrio*, la transducción podría ser particularmente frecuente, dada la alta concentración de bacteriófagos en agua de mar (Wommack y Colwell, 2000).

Las distintas copias de operones *rrn* se diferenciarían y evolucionarían de manera concertada, debido a la existencia de un mecanismo denominado conversión génica

(Liao, 2000). Sin embargo, en algunos aislados de varias especies uno o más de los múltiples loci *rrs* intragenómicos pueden diferir considerablemente del resto, y su presencia se considera debida a recombinación homóloga con bacterias relacionadas (Morandi y col., 2005; Sneath, 1993; Ueda y col., 1999; Yap y col., 1999).

En la evolución de los *rrn* repetidos existen cambios que generan diferenciación (Hashimoto y col., 2003) y un mecanismo que mantiene los *rrn* coevolucionando con los mismos cambios, para evitar su diferenciación como ocurriría si evolucionaran independientemente. Dependiendo de la intensidad de una u otra, podrán obtenerse dos resultados: genes repetidos idénticos si la homogeneización es mayor, o genes repetidos polimórficos si la presión hacia la diferenciación es mayor. Esta homogeneización parece proceder por conversión génica, en la cual una copia del gen es convertida a la secuencia presente en la otra. La conversión génica sería el resultado de un evento de recombinación no-recíproca que no está claro (Liao, 2000; González-Escalona y col., 2005).

La presencia de genes *rrs* repetidos iguales o diferentes en una cepa bacteriana, las causas y potenciales consecuencias de uno u otro, constituyen un problema nuevo que despertará mayor interés en el futuro. Se piensa que el polimorfismo en los genes *rrs* puede ser importante para comprender mejor la historia evolutiva de una cepa como su capacidad para sobrevivir en hábitats muy distintos. Además, la variabilidad intragenómica, tiene importantes implicaciones prácticas para la identificación bacteriana.

4. Generación de nuevas cepas por transferencia génica horizontal.

Cada organismo se adapta a un hábitat particular y los patógenos no son la excepción. Todos los genomas microbianos han evolucionado mediante 3 procesos principales: 1) modificación de genes existentes, 2) pérdida de genes, y 3) ganancia de genes, que confieren beneficio en el nicho ecológico actual (Gal-Mor y Finlay, 2006). Mientras que las mutaciones puntuales conducen a un lento desarrollo evolutivo, la adquisición y escisión de grandes fragmentos genómicos rápidamente genera nuevas variantes (Flakow, 1996). Fagos, plásmidos e islas de patogenicidad están involucrados en aquellos procesos de rápido movimiento evolutivo.

La adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal, ya sea por transformación con DNA libre, transducción con fagos o introducción de plásmidos o fragmentos cromosomales por conjugación, puede resultar en la generación de nuevas variantes de patógenos (patotipos). La transferencia génica horizontal representa la piedra angular de la evolución bacteriana, y conduce a cambios dramáticos en la composición de los genomas microbianos en períodos de tiempo relativamente cortos (Ochman y col., 2000).

Es difícil asegurar que la capacidad de una bacteria para explotar nuevos ambientes ocurra sólo por la acumulación de mutaciones puntuales. Por el contrario, hay evidencias crecientes de que la transferencia génica horizontal ha tenido un rol importante en la evolución de genomas bacterianos, así como en la diversificación y especiación bacteriana (Ochman y col., 2000). El significado de la transferencia

horizontal para la evolución bacteriana fue reconocido en los años 50, cuando la resistencia a múltiples drogas emergió a gran escala a nivel mundial (Davies, 1996). La facilidad con la cual ciertas bacterias desarrollan resistencia al mismo espectro de antibióticos indica que esta característica está siendo transferida entre grupos, más que siendo generada “de novo” por cada grupo. Estudios recientes han demostrado que las islas de patogenicidad adquiridas horizontalmente contribuyen de manera importante a la naturaleza virulenta de muchas bacterias patógenas (Groisman y Ochman, 1996; Hacker y col., 1997).

Es poco probable que la transformación sea de importancia en *Vibrio*, puesto que no se conocen representantes del grupo que sean naturalmente competentes. Por el contrario, hay muchos plásmidos conjugativos y fagos asociados con varias especies de *Vibrio*, haciendo probable que la conjugación y transducción sean los principales modos de transferencia génica horizontal en este género (Beumer y Robinson, 2005).

El análisis genómico comparativo y las investigaciones sobre los mecanismos involucrados en la transferencia de genes de virulencia, ayudarán a profundizar aspectos evolutivos de *V. parahaemolyticus*. Los resultados de esta tesis muestran cómo la transferencia horizontal de grandes segmentos conteniendo genes de virulencia conduciría en tiempos relativamente cortos a la ocurrencia de nuevas cepas patógenas.

5. Islas de patogenicidad: importancia en la evolución bacteriana.

La mayoría del DNA transferido horizontalmente es parte del grupo de genes denominados flexibles. Además de fagos y plásmidos, los genes flexibles comprenden

transposones, integrones, islotes genómicos e islas genómicas (Hacker y Carniel, 2001). Las islas genómicas que codifican factores de virulencia son denominadas islas de patogenicidad (IPa). Estas islas fueron descritas por primera vez en el genoma de *E. coli* patógenas (Blum y col., 1994) y su caracterización ha cambiado la manera de pensar acerca de la evolución de la patogenicidad bacteriana. Las IPa son componentes de los genomas de muchos Gram positivos y Gram negativos. Su presencia contribuye al “fitness in vivo” de aquellas bacterias que lo poseen, incrementando su supervivencia y/o transmisión a nuevos hospederos (Hacker y Kaper, 2000; Hurley y col., 2006).

Las IPa tienen uno o más genes asociados a virulencia y pueden ocupar regiones relativamente grandes en el cromosoma, variando de 10 a más de 100 kb. Algunas cepas tienen pequeñas regiones de DNA (1 a 10 Kb) que se han denominado “islotes de patogenicidad”. Comúnmente las IPa tienen un contenido GC y una frecuencia de uso de codones que difiere del resto del genoma. Las IPa están frecuentemente flanqueadas por secuencias repetidas directas y un gen tRNA. Además, poseen genes relacionados con la movilidad genética, como integrasas, transposasas y genes de fagos (Gal-Mor y Finlay, 2006). Recientemente se ha demostrado la presencia de una isla de patogenicidad relacionada a una secuencia de DNA viral en *V. cholerae* y *Helicobacter pylori* (Figura y col., 1998). El análisis de las secuencias flanqueantes demostró que la isla había sido adquirida por un evento de transducción.

Las IPas se han seleccionado durante la evolución ya que su presencia confiere ventajas selectivas a sus hospederos bacterianos. Sin embargo, en algunas ocasiones, la



adquisición de las IPas podría orientar la evolución de su bacteria hospedera. Este puede haber sido el caso de *Yersinia pestis*, especie que emergió recientemente (1500 a 20000 años) desde *Y. pseudotuberculosis* (Achtmann y col., 1999). Probablemente la IPa sirvió como uno de los factores clave en la emergencia de este microorganismo. En otras palabras, *Y. pestis* probablemente no hubiese evolucionado a partir de *Y. pseudotuberculosis* si el genoma de éste no hubiese contenido la IPa. (Hacker y Carniel, 2001).

Hurley y col. (2006), identificaron en la secuencia del genoma de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 un total de 9 regiones de más de 10 Kb cada uno, con un contenido G+C aberrante, que codifican genes de integrasas o transposasas. Estas 9 regiones incluyen un profago y un integrón, así como 7 regiones adicionales denominadas isla 1 (VPaI-1) a isla 7 (VPaI-7). Las 7 islas genómicas varían de 10 a 81 kb, y están flanqueadas por repetidos directos, con contenidos G+C más bajos (38 a 43%) que el contenido del genoma total (45%) en 6 de ellas. Todas las islas genómicas codifican un gen de integrasa, con excepción de VPaI-7, la cual contiene varios genes de transposasa. VPaI-7 es una región de 81 kb del cromosoma 2 con un contenido G+C de 39.8% más bajo que el total del genoma entero de 45% (Makino y col., 2003), identificada como una potencial isla de patogenicidad, en la cual se encuentran dos copias del gen *tdh*, que codifican la hemolisina termoestable directa asociada con cepas patógenas (Hurley y col., 2006; Makino y col., 2003). VPaI-7 contiene además genes que codifican un sistema de secreción tipo III (SSTT2), el cual en otras bacterias patógenas exporta proteínas bacterianas directamente en las células hospederas. El

SSTT2 mostró estar presente sólo en aislados de *V. parahaemolyticus* recuperados luego de 1995 (Makino y col., 2003).

Las enfermedades infecciosas constituyen una causa significativa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Este problema se ha visto realzado con la emergencia de nuevos patógenos. Por lo tanto, identificar factores de virulencia usados por estos patógenos y entender su evolución probablemente desde progenitores no patógenos es un aspecto importante para la ciencia básica y los actuales retos médicos. Entender el concepto de isla de patogenicidad cambia la forma de percibir la virulencia bacteriana y la evolución microbiana.

En este trabajo se formularon las siguientes hipótesis:

1) La extensión del polimorfismo en los genes 16S rRNA (*rrs*) difiere ampliamente entre cepas de *V. parahaemolyticus*, y 2) La transferencia génica horizontal es un mecanismo importante de evolución de *V. parahaemolyticus* capaz de generar variantes tanto en los genes *rrs* como en genes de virulencia.

El objetivo general fue:

Determinar la extensión del polimorfismo en los *rrs* de cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas desde diferentes ambientes y la importancia de la transferencia génica

horizontal como mecanismo de diversidad genómica y ocurrencia de nuevas cepas patógenas en *V. parahaemolyticus*.

Los objetivos específicos fueron:

1. Identificar aislados de *V. parahaemolyticus* desde diferentes ambientes (océano, casos clínicos) y determinar posibles diferencias en las secuencias de sus 16S rRNAs (*rrs*).
2. Caracterizar las diferencias entre los *rrs* de cepas que muestren polimorfismo (sitios nucleotídicos polimórficos en los *rrs*).
3. Determinar la posible relación entre la adquisición de nuevo DNA y la ocurrencia de nuevos aislados pandémicos.
4. Identificar los sitios de inserción de la isla de patogenicidad en PMC38.7.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento de *V. parahaemolyticus* desde muestras ambientales y clínicas.

Las muestras de mariscos fueron colectadas de la costa de la región de Antofagasta durante el verano de 1998, y del seno de Reloncaví (Puerto Montt) entre los veranos del 2004 al 2007. Los mariscos fueron empacados en bolsas de polietileno 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 homogeneizados en 450 mL PBS. El homogeneizado fue sembrado a diferentes concentraciones en una serie de 3 tubos conteniendo agua peptonada alcalina (Alkaline Peptone Water, APW). Luego se incubaron toda la noche a 37°C y aquellos tubos que mostraron crecimiento en la superficie fueron plaqueados en Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa). La incubación se hizo por toda la noche a 37°C, y aquellas colonias verdes o azuladas fueron purificadas e identificadas mediante API-20E para Enterobacterias (BioMerieux, Hazelwood, MO) según las especificaciones del fabricante. Cada homogeneizado obtenido de 10 especímenes constituye lo que denominamos una muestra.

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, según lo descrito anteriormente (González-Escalona y col., 2005a). El

aislamiento y crecimiento de los aislados a partir de estas muestras fueron realizados también en TCBS según lo mencionado anteriormente.

2. Cepas y condiciones de cultivo.

Las cepas de *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 (VpKX) y ATCC17802 (VpD) fueron obtenidas del Instituto de Investigación para enfermedades microbianas (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan) y de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, Manassas, VA), respectivamente.

Nueve aislados de los brotes ocurridos en 1998 (González-Escalona y col., 2005a) fueron analizados por DGREA y divididos en 5 grupos. Aislados de cada uno de estos grupos fueron elegidos como representantes: ATA30 (ATC230 pertenece al mismo grupo), COA62, ATA65, LIA138 y ATC297. Las cepas ATC230 y ATC297 corresponden a aislados clínicos no pandémicos. Además, se utilizaron aislados ambientales genotípicamente diferentes, obtenidos a partir de muestras de mariscos del sur de Chile durante el 2004 (PMA79, PMA112, PMA189, PMA337, PMA339, PMA3316), 2005 (PMA1.5, PMA2.5, PMA3.5, PMA 16.5, PMA19.5, PMA22.5, PMA27.5, PMA37.5, PMA 45.5, PMA109.5), 2006 (PMA13.6, PMA34.6, PMA36.6, PMA40.6), y 2007 (PMA1.7, PMA11.7, PMA21.7) (Tabla 1). Asimismo, se incluyeron los siguientes aislados de muestras clínicas del 2007: PMC38.7, PMC53.7, PMC60.7, PMC75.7, correspondientes a diferentes grupos DGREA (Tabla 2).

Tabla 1. Características de aislados ambientales obtenidos desde mariscos durante 1998, 2004 al 2007 en Chile y pertenecientes a distintos grupos DGREA.

Cepa	Serotipo	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS</i>	API	Origen	Fecha de llegada	Heterogeneidad en sus <i>rrs</i>
ATA30	ND	-	-	+	-	ND	ND	Cholgas, Antofagasta	09-02-98	No
COA62	ND	-	-	+	-	ND	ND	Ostiones, Copiapó	07-04-98	No
ATA65	ND	-	-	+	-	ND	ND	ND, Antofagasta	22-04-98	Si
LIA138	ND	-	-	+	-	ND	ND	Navajuelas, muelle Lirquén	26-04-00	Si
PMA79	O2:ND	-	-	+	-	-	Vp	Ostras, Huaihue	01-02-04	No
PMA112	O3:K6	-	-	+	-	-	Vp	Navajuelas, Cohihuen	01-02-04	Si
PMA189	O3:K6	-	-	+	-	-	ND	Almejas, Contao	01-02-04	Si
PMA337	O7:ND	-	-	+	-	-	Vp	Almejas, ND	01-02-04	Si
PMA339	O4:ND	-	-	+	-	-	Vp	Almejas, ND	01-02-04	Si
PMA3316	O3:K6	-	-	+	-	-	Vp	Almejas, ND	01-02-04	Si
PMA1.5	O3:K6	-	-	+	-	-	Vp	Choritos, cultivo caleta La Arena	28-01-05	No
PMA2.5	O4:ND	-	-	+	-	-	Vp	Choritos, cultivo sector Quillaipe	28-01-05	Si
PMA3.5	O4:ND	-	-	+	-	-	Vp	ND, Puerto Montt	28-01-05	No
PMA16.5	O4:K12	-	-	+	-	-	Vp	ND, Puerto Montt	28-01-05	Si
PMA19.5	O8:ND	-	-	+	-	-	Vp	Choritos, Coihuin	09-02-05	Si

PMA22.5	O2:ND	-	-	+	-	-	Vp	Choritos, Coihuin	09-02-05	Si
PMA27.5	O6:K46	-	-	+	-	-	Vp	Choritos, playa sector Quillaibe	09-02-05	Si
PMA37.5	O3:K6	+	-	+	+	+	Vp	Choritos, cultivo caleta La Arena	15-02-05	No
PMA45.5	O3:K6	-	-	+	-	-	Vp	Choritos, cultivo caleta La Arena	15-02-05	Si
PMA109.5	O3:K6	+	-	+	+	+	Vp	Choritos, cultivo sector Quillaibe	11-03-05	No
PMA13.6	ND	-	-	+	ND	ND	ND	ND, La Arena	12-01-06	ND
PMA34.6	ND	-	-	+	ND	ND	ND	ND, Sector Quillaibe	01-03-06	ND
PMA36.6	ND	-	-	+	ND	ND	ND	ND, La Arena	22-02-06	ND
PMA40.6	ND	-	-	+	ND	ND	ND	ND, Coihuin	01-03-06	ND
PMA1.7	ND	-	-	+	ND	ND	ND	ND, Puerto Montt	01-02-07	ND
PMA11.7	ND	-	-	+	ND	ND	ND	ND, Puerto Montt	01-02-07	ND
PMA21.7	ND	-	-	+	ND	ND	ND	ND, Puerto Montt	01-02-07	ND

-: ausencia, +: presencia, ND: no determinado

API: método de identificación bacteriana a nivel de especies.

Vp: *Vibrio parahaemolyticus*

Tabla 2. Características de aislados clínicos de *V. parahaemolyticus* obtenidos el 2007 desde Puerto Montt.

Aislado	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	Grupo DGREA	ST MLST
PMC 50.7, 51.7, 55.7, 56.7, 58.7, 28.7, 29.7, 41.7, 42.7, 44.7, 59.7, 70.7, 63.7, 64.7, 65.7, 66.7, 73.7, 1.7, 11.7, 14.7, 15.7, 16.7, 18.7, 19.7, 20.7, 22.7	+	+	-	+	+	VpKX	3
PMC 38.7, 47.7, 57.7, 68.7, 72.7	+	+	-	-	-	38.7	63
PMC 60.7, 25.7, 26.7, 27.7	+	+	+	-	-	60.7	64
PMC 53.7	+	-	-	-	-	1.5	28
PMC 75.7	+	-	-	-	-	75.7	65

DGREA: caracterización por restricción del genoma total con *NaeI*.

MLST: tipificación en base a secuencias de múltiples loci.

ST: Secuencia tipo, disponibles en <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>

-: ausencia, +: presencia, ND: no determinado

3. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica fue realizada utilizando API-20NE (Bio Merieux, Halzelwood, MO) según las especificaciones del fabricante. La determinación de los antígenos O y K de las cepas de *V. parahaemolyticus* fue realizado por aglutinación en lámina utilizando antisueros de conejo obtenidos de Seiken (Denka Seiken, Japan). El serovar K fue determinado para K 1, 6, 8, 12, 25, 26, 41, 46, 56 y 68.

4. Caracterización genotípica.

Los aislados fueron caracterizados e identificados como *V. parahaemolyticus* en base a la presencia o ausencia de algunos marcadores genéticos (*tlh*, *tdh* y *trh*), y como pandémicos por la presencia de *orf8* y *toxRS/new*. Reacciones de PCR fueron realizadas utilizando aproximadamente 10 ng de DNA por tubo de reacción y las amplificaciones para *tdh*, *trh*, *tlh*, *orf8* y *toxRS/new* se realizaron según lo indicado (Bej y col., 1999; Lachaprerththisan y col., 2003, Matsumoto y col., 2000).

La caracterización por restricción del genoma total fue realizada por DGREA utilizando *NaeI* según lo indicado por Fuenzalida y col. (2006). Brevemente, el DNA fue extraído desde 1 mL de un cultivo de toda la noche y suspendido en 50uL de TE (Tris 0.01 M, EDTA 0.001 M, pH 8.0). Una alícuota de 10uL 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 7uL de la digestión se mezcló con 2uL de buffer de carga y la electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 7.5%, por 3 h a 100 V. La tinción se realizó con nitrato de plata. Fragmentos de 500 a 2500 pb fueron analizados.

5. Extracción de DNA.

El DNA bacteriano fue extraído desde cultivos de toda la noche en Caldo Luria Bertani con 3% de 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, luego de realizar una electroforesis en gel de agarosa y

tinción con bromuro de etidio, con cantidades conocidas de DNA de λ HindIII como estándar.

6. Amplificación por PCR del *rrs*.

La amplificación del *rrs* fue realizada en la forma descrita por Espejo y Romero (1997), utilizando los partidores 27F y 1492R para amplificar el *rrs* completo, y los partidores 357F y 518R (Tabla 3) para amplificar la región variable del *rrs* descrita para VpD (Moreno y col., 2002). Los amplicones fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata (Espejo y col., 1998).

7. Amplificación por PCR de genes y segmentos de la isla de patogenicidad.

Los genes del SSTT2 (VPA1335, VPA1338, VPA1339, VPA1341, VPA1342, VPA1346, VPA1349, VPA1354, VPA1355, VPA1362, y VPA1367) fueron amplificados usando los partidores descritos por Meador y col. (2007) (Tabla 4) utilizando las siguientes condiciones de PCR: denaturación a 94°C por 1 min, alineamiento a 61°C por 1 min y extensión a 72°C por 1min 30s, por 35 ciclos, con un tiempo de extensión final de 7 min a 72 °C. Los genes VPA1321 y VPA1376, localizados adyacentes a cada una de las copias del gen *tdh* fueron amplificados bajo las mismas condiciones mencionadas arriba con los partidores VPA1321F, VPA1321R, VPA1376F y VPA1376R (Tabla 3) diseñados utilizando el programa Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net>).

Amplificaciones por PCR superponiendo diferentes segmentos de la isla utilizando combinaciones de pares de partidores (Tabla 5) fueron realizados también con las condiciones de PCR ya mencionadas, excepto que los tiempos de extensión fueron de 4 a 7 min., según el tamaño del producto esperado (aprox. 1 min/kb).

Dos pares de partidores fueron diseñados para amplificar cada una de las regiones cromosomales flanqueantes de la isla de patogenicidad. La región izquierda de aproximadamente 1572 pb abarcó las posiciones nucleotídicas 1389887 a 1391386, lo cual incluye al gen VPA1312, descrito como el primer gen de la isla (Hurley y col., 2006). La región derecha de 997 pb abarcó desde los nucleótidos 1468601 al 1469523, e incluyó el gen VPA1398, descrito como el último gen de la isla (Hurley y col., 2006). Los partidores empleados para la región izquierda fueron VPA1311-1312F y VPA1311-1312R, y para la región derecha VPA1398-1399F y VPA1398-1399R (Tabla 3).

8. Amplificación por PCR de los genes “housekeeping”.

Los genes “housekeeping” para MLST *recA*, *dnaE*, *gyrB*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC* y *tnaA* (esquema MLST desarrollado por Narjol González-Escalona) fueron amplificados utilizando los partidores descritos en el sitio web del MLST de *V. parahaemolyticus* MLST (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus>) desarrollado por Keith Jolley (Universidad de Oxford) (Jolley y col., 2004). Las condiciones de PCR empleadas fueron: denaturación a 96°C por 1 min, alineamiento a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 1min, por 30 ciclos, con un tiempo de extensión final de 10 min a 72 °C.



Tabla 3. Pares de partidores diseñados para amplificar por PCR el *rrs* y genes de la isla de patogenicidad.

Nombre del partidor	Secuencia (5' - 3')	Producto amplificado	Tamaño del producto(pb)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	gen <i>rrs</i> casi completo	1470
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
357F	CTCCTACGGGAGGCAGCAG	segmento variable del <i>rrs</i>	161
518R	CGTATTACCGCGGCTGCTGG		
VPA1321F	TGACATGCACGGCAATAGAT	gen adyacente a una copia de <i>tdh</i>	412
VPA1321R	ACAGAGTTGGTTTCGCAGGT		
VPA1376F	CATCGAGCGATCTTTCACAA	gen adyacente a otra copia de <i>tdh</i>	700
VPA1376R	ACCGGTTTCCAACCTTCTCT		
VPA1311-1312F	GGAGCCAAAATTCAGAAACCA	región flanqueante izquierda de la isla de patogenicidad	1572
VPA1311-1312R	GATTGTTTGCCGAAAACCTGG		
VPA1398-1399F	CCACTTTTGCCCAACCTGTTT	región flanqueante derecha de la isla de patogenicidad	997
VPA1398-1399R	TGCTCTATACGGGTTGTTCCG		

Tabla 4. Secuencias de los partidores usados para amplificar por PCR los genes del Sistema de Secreción Tipo III (SST12) contenidos sobre el cromosoma 2 de *V. parahaemolyticus*

Gen	Denominación del partidor	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia del partidor 5' - 3' ^A	Longitud	T _m	%GC
VPA1335	VPA1335-F	194	TACCACCTACCAAACTGTGTGTCAG	22	61	45
	VPA1335-R		GACGGTTATTGATGTAACGGCGG	23	65	52
VPA1338	VPA1338-F	487	CGACAACCTCACGAGCCGG	19	66	68
	VPA1338-R		GGCAAGAGTGTCTTGTGC	19	62	57
VPA1339	escC-F(1339F)	364	TCTTGGTATGATAGTGGTGGCTAAATGG	30	62	47
	escC-R(1339R)		CGGCGGTCTATTGCTATCCTCATATCATC	30	62	43
VPA1341	VPA1341-F	438	CCACAGCACATAGTATGATGACCAG	23	65	52
	VPA1341-R		TACCAGTAGTTGGCTATCGC	21	61	47
VPA1342	VPA1342-F	418	CACTGTCGGTGATAACATGGTC	22	63	50
	VPA1342-R		CAAACCTATTGGCGGCTCTG	19	62	57
VPA1346	YopP-F(1346F)	393	CAATGTGGCTATTCCGGTTGCAGTCTGFATG	31	62	45
	YopP-R(1346R)		CGTCCAACCTCTATTGTGTGGATATGGCGTTG	31	62	45
VPA1349	VPA1349-F	169	CTACAGCGACCGGCATATTGG	20	62	55
	VPA1349-R		GTGATTGCCCAITGGCCAGC	19	62	57
VPA1354	VPA1354-F	522	CTGGCGAGCCTCCGTCTC	19	66	68
	VPA1354-R		CTGGTGAATGGTTCCTCCGCAG	21	65	57
VPA1355	VPA1355-F	432	CGAGGGTCACTCTCTACGC	19	64	63
	VPA1355-R		GTCGTTATGGGACAAGCC	19	62	58
VPA1362	VPA1362-F	397	GAGCAACCCGAACGCATCGC	19	64	63
	VPA1362-R		GCAGGTATCGCATCTTCAGC	20	62	55
VPA1367	VPA1367-F	493	CACACCACCTGAACGAAG	18	60	55
	VPA1367-R		CAGGTGCCCCGTGATTCCAGG	19	62	57

Las secuencias de los partidores fueron obtenidas de Meador et al. (2007) J. Clin. Microbiol.

Tabla 5. Pares de partidores empleados para amplificar por PCR distintos segmentos dentro de la isla de patogenicidad.

Par de partidores ^a	Nombre de los partidores	Tamaño del producto esperado (pb)
1	1362F-1367R	3957
2	1349F-1354R	3901
3	1338F-1339R	780
4	1335F-1338R	2442
5	1341F-1342R	1024
6	1354F-1355R	1503
7	1335F-1342R	5410
8	1338F-1342R	3436
9	1349F-1355R	4883
10	1341F-1349R	6508
11	1342F-1349R	5901

^a :Los números indican la combinación de partidores utilizados, la cual está referida con el mismo número en la Fig. 13 (Resultados).

9. Purificación de los amplicones y secuenciación.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit "Wizard SV Gel or PCR Clean-Up System" (Promega, USA) y secuenciados en ambas direcciones por MacroGen (South Korea) o por MCLAB (South San Francisco, CA, USA.) utilizando los mismos partidores empleados en las amplificaciones, excepto para el caso de los loci MLST donde se emplearon M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13RpUC (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3').

10. Electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE).

Para separar los *rrs* individuales, el DNA total genómico se trató con la enzima de restricción *ICeu-I* que corta una secuencia específica de los genes 23S rRNA en *V. parahaemolyticus*. La separación de los fragmentos generados se hizo por electroforesis en campo pulsado, debido al gran tamaño de los fragmentos (Yamaichi y col., 1999). Luego, la región variable se amplificó a partir de las bandas escindidas, como lo describió previamente González-Escalona y col. (2005b).

Para la secuenciación directa de los productos, éstos fueron purificados con Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) y secuenciados en MacroGen.

Para la secuenciación de los alelos *rrs* individuales, éstos fueron separados en los diferentes fragmentos de restricción mediante PFGE como lo describió González-Escalona y col., (2005b). Brevemente, el DNA genómico contenido en moldes de

agarosa de bajo punto de fusión al 1.6% ("low melting point") (Iida y col., 1997), fueron tratados con lisozima y proteinasa K, para posteriormente ser digerido con la enzima de restricción *ICeu-I* (New England Biolabs) por 16 h a 37°C utilizando 50U/molde. La electroforesis fue realizada en el sistema CHEF-DRII (Bio-Rad Laboratories) empleando agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Promega) en buffer TBE 0.5X (0.45mM Tris-borato, 1mM EDTA-Na, pH 8.0). El tiempo de pulso empleado fue 1-80 s a 200 V por 20 h a temperatura constante de 14°C. Luego de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio por 30 min. Cinco o 6 bandas con mayor migración fueron escindidas del gel con bisturíes estériles y luego se disolvieron a 65°C en el doble de volumen de TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-NaCl, pH 8.0). Una muestra de 10 uL de la solución conteniendo el DNA de cada banda fue usada como templado para la amplificación de los *rrs*, como se describió anteriormente.

La presencia de diferentes secuencias en distintos grupos taxonómicos fue evaluada usando el "probe match" de la base de datos RDP y restringiendo la búsqueda a secuencias de aislados con más de 1200 nucleótidos secuenciados y datos de secuencias que comprendan de los nucleótidos 400 a 500 (según numeración de *E. coli*) (Cole y col., 2005).

11. Construcción de dendrogramas.

Los patrones de los aislados de grupos DGREA correspondientes a los años 1998, 2004 y 2005, fueron analizados con GelCompar II (Applied Maths, Sint-Martens-

Latern, Belgium) y sus distancias genéticas se calcularon en base al número de bandas comunes entre los aislados. Matrices de similitud se calcularon usando el coeficiente de Dice y el agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

Para la construcción del dendrograma PFGE-RFLP, se identificaron las bandas con similar y diferente migración en el gel de electroforesis, y se generó una matriz de similitud donde la ausencia de bandas se indicó como "0" y la presencia como "1". Esta matriz fue calculada usando el coeficiente de Nei y Li (Nei y Li, 1979) y finalmente utilizada para obtener el dendrograma aplicando el agrupamiento WPGMA en Treecom (Van de Peer y DeWachter, 1994).

Las secuencias MLST fueron concatenadas utilizando la opción indicada en http://pubmlst.org/perl/mlstdbnet/mlstdbnet.pl?page=concat&file=vp_profiles.xml, y luego se construyó un dendrograma con el programa MEGA4, usando el método del "Minimum Evolution" con un "bootstrap" de 1000 réplicas, y utilizando el método de Kimura-2 para estimar las distancias evolutivas (Kimura, 1980; Tamura y col., 2007).

12. Análisis de secuencias

Las secuencias de DNA fueron analizadas individualmente y ensambladas manualmente. Los alineamientos y similitud de secuencias se obtuvieron usando BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank bajo los siguientes números de acceso: DQ868329 – DQ868341 y EU185060 – EU185092.

RESULTADOS.

1. Caracterización de los aislados ambientales de *V. parahaemolyticus* obtenidos durante los brotes ocurridos en Chile.

1.1. Diversidad genómica de los aislados ambientales.

Inicialmente, previo al análisis de la heterogeneidad en los alelos *rrs*, aproximadamente 200 diversos aislados ambientales se clasificaron en grupos de acuerdo a los patrones de restricción de sus DNAs con *NaeI*, obtenidos mediante DGREA (Fuenzalida y col., 2006). Éstos aislados habían sido obtenidos de mariscos durante los brotes ocurridos en el norte de Chile el año 1998, y en el sur desde el 2004 al 2007 (ver Tabla 1 en Material y Métodos). Los aislados se clasificaron en 28 grupos correspondiendo a: 3 grupos en el 2007, 4 en el 2006, 9 en el 2005, 6 en el 2004 y 5 en 1998; incluyendo aquellos con el mismo patrón de la cepa pandémica VpKX (Fig. 1).

Los aislados obtenidos en Puerto Montt han sido analizados durante cada año desde el 2004. El patrón DGREA de cada aislado fue comparado tanto con los patrones del mismo año como con aquellos obtenidos en años anteriores. Cuando se observó un patrón similar la posible identidad fue confirmada mediante electroforesis del DNA digerido con *NaeI* realizada en un mismo gel.

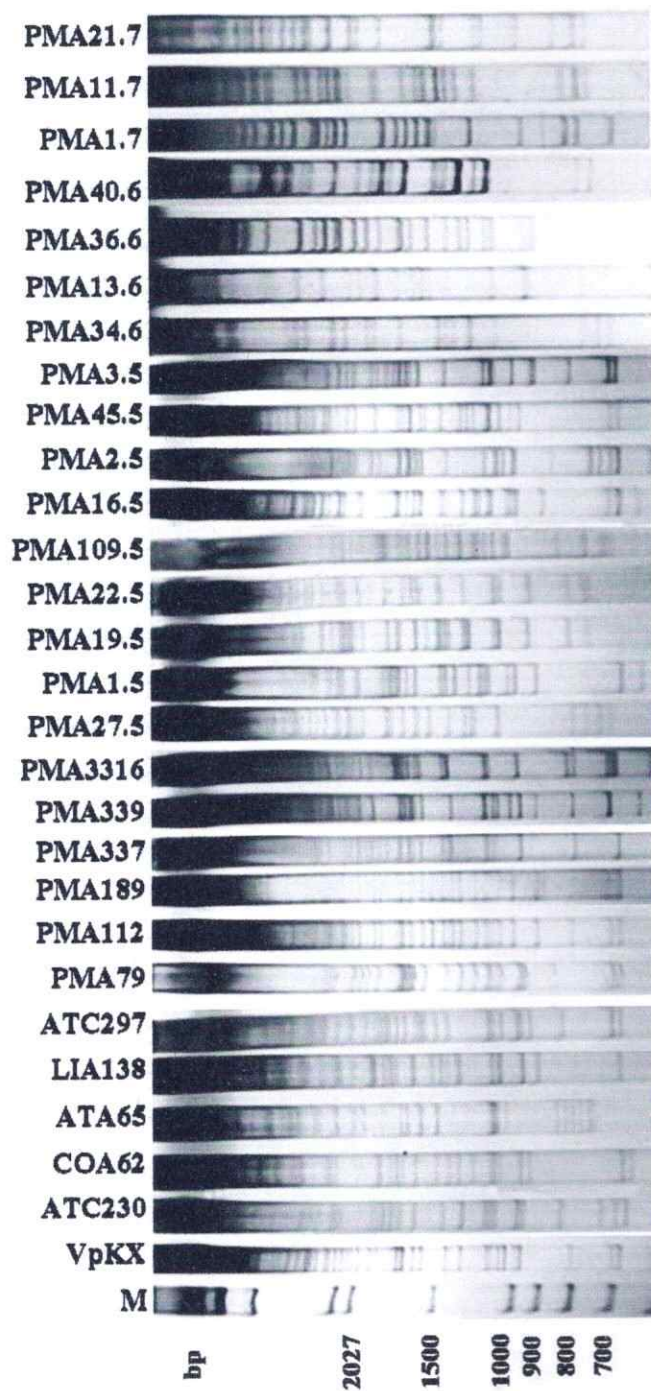


Fig. 1. Análisis directo del genoma de *V. parahaemolyticus* con *NaeI* (DGREA) en las cepas tipo de cada uno de los 27 grupos correspondientes a muestras de mariscos recolectadas en los veranos de 1998, 2004 al 2007. Se analizaron distintos aislados y luego se agruparon según su perfil por DGREA, eligiendo un aislado tipo por cada grupo DGREA el cual se muestra en cada carril. Aquellos aislados correspondientes a los brotes de los años 2005, 2006 y 2007 son indicados con el nombre del aislado seguido de un punto y un número que representa el año de aislamiento (por ejemplo, PMA2.5: aislado 2 del año 2005). Aislados del año 2004 son mostrados únicamente con el nombre de éstos. M: Marcador de peso molecular BenchTop 100 bp ladder + λ HindIII (1.5:1). VpKX: Cepa pandémica del Sudeste asiático RIMD2210633. PMA: Aislado ambiental obtenido de Puerto Montt. ATC: Aislado clínico no pandémico obtenido de Antofagasta. COA: Aislado ambiental obtenido de Copiapó. ATA: Aislado ambiental obtenido de Antofagasta. LIA: Aislado ambiental obtenido de Lirquén. Un aislado ambiental es aquel obtenido a partir de una muestra de mariscos.

En Antofagasta, los brotes desaparecieron después de 1998 y no se han obtenido nuevos aislados. La Fig. 2 muestra el número de muestras de mariscos obtenidos en Puerto Montt conteniendo cada uno de los grupos DGREA desde el 2004 al 2007, Una muestra representa un grupo de aproximadamente 10 especímenes de mariscos, la cual fue homogeneizada y cultivada según se indica en Material y Métodos. En cada muestra varios grupos DGREA pueden estar presentes. Algunos de estos grupos están presentes en cantidades detectables durante más de un verano y muy pocos lo están durante más de uno. Sólo uno de los grupos, el 118, se ha observado de manera continua desde el 2004. El grupo KX, de la cepa pandémica, no fue detectado en mariscos recolectados el 2007, pese a mantenerse presente durante los 3 años previos consecutivos.

Los resultados indican que la población indígena de *V. parahaemolyticus* es genótipicamente diversa y que su composición cambia cada verano.

1.2. Heterogeneidad intragenómica en los genes *rrs*.

Se analizó la heterogeneidad intragenómica en los múltiples alelos *rrs* de los diferentes aislados de *V. parahaemolyticus* obtenidos de mariscos entre los años 1998, 2004 y 2005. Para este análisis se escogió una cepa designada como representante (cepa tipo) de cada uno de los grupos diferenciados por sus patrones de restricción genómico (DGREA) descritos anteriormente y cuyos patrones están mostrados en la Fig. 3.

La posible heterogeneidad intragenómica de los *rrs* se comprobó examinando la formación de heterodupletes luego de la amplificación por PCR de los genes 16S rRNA (Espejo y col., 1998; Moreno y col., 2002). Inicialmente se examinó la heterogeneidad amplificando el gen *rrs* casi completo, utilizando los partidores universales 27F y 1492R. Trece de los 21 aislados mostraron los característicos heterodupletes.

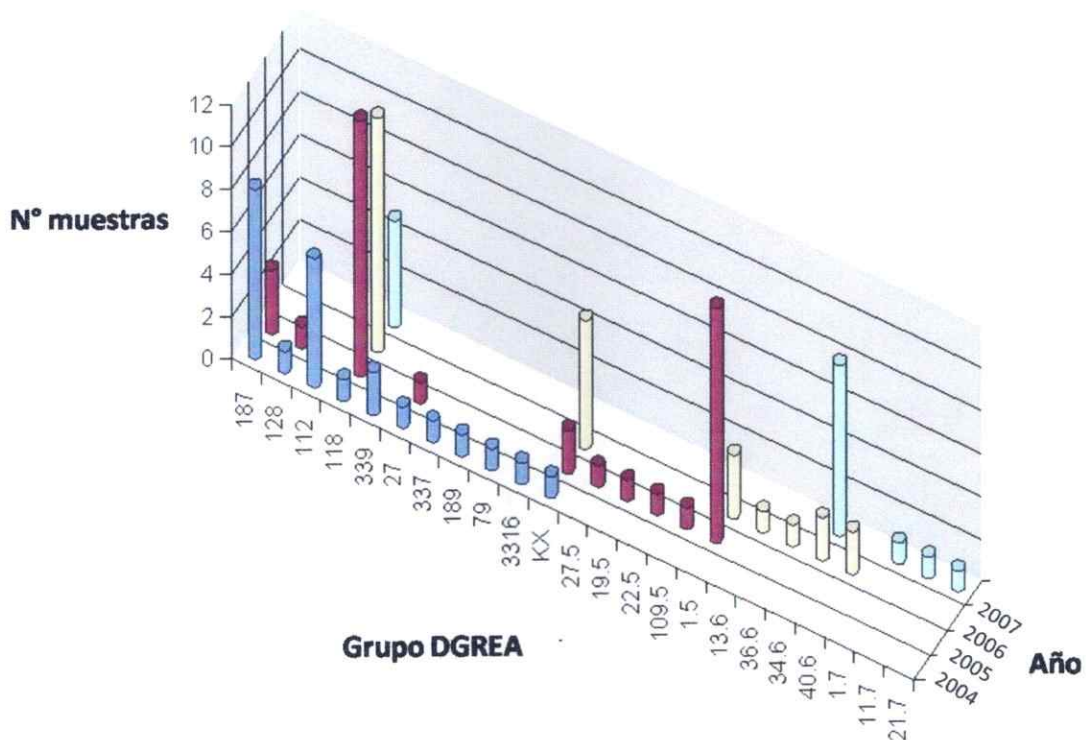


Fig. 2. Histograma del número de muestras de mariscos conteniendo *V. parahaemolyticus*, correspondiente a los distintos grupos DGREA observados desde el verano del 2004 hasta el 2007. Cada barra representa la abundancia de los grupos DGREA contenidos en muestras de mariscos en relación al tiempo, donde muchas de las muestras contenían varios grupos en diferente proporción. El grupo DGREA representa el nombre del aislado tipo del grupo. Aquellos grupos con un punto seguido de un número indican que se encontraron en el año 2005 (27.5, 19.5, 22.5, 109.5, 1.5), 2006

(13.6, 36.6, 34.6, 40.6) y 2007 (1.7, 11.7, 21.7). El resto de aislados corresponden a aquellos obtenidos en el año 2004. El grupo KX representa a aislados idénticos al patrón DGREA de la cepa pandémica encontrados en el 2004, 2005 y 2006.

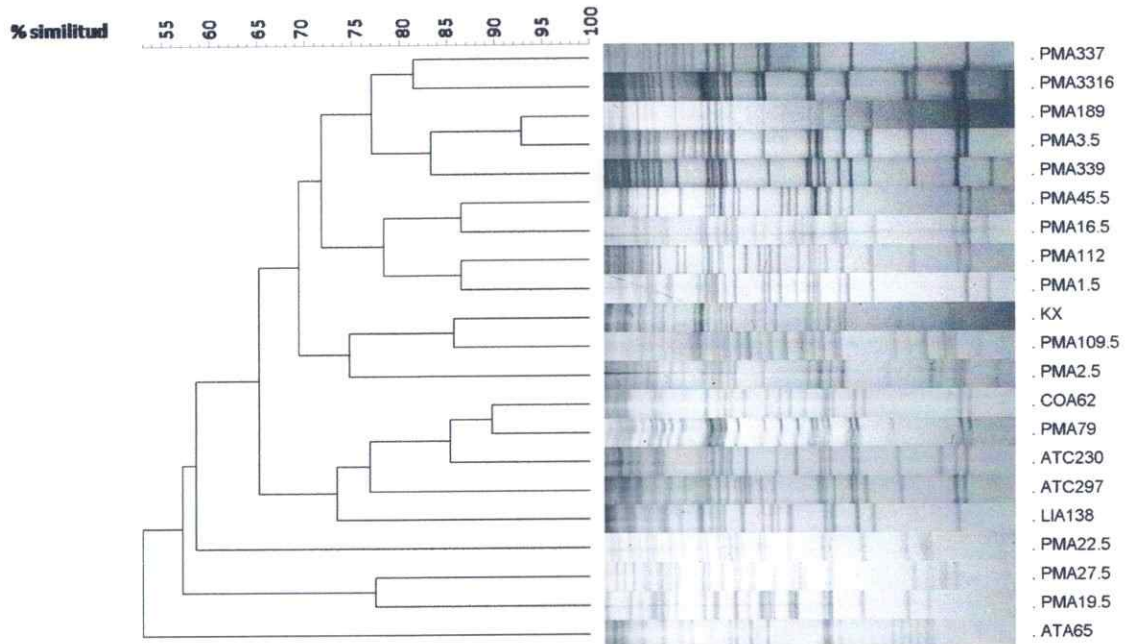


Fig. 3. DGREA con *NaeI* de la cepa tipo de cada grupo correspondientes a muestras clínicas y de mariscos recolectadas en los veranos de 1998, 2004 y 2005. A la derecha, se muestran los patrones DGREA de los aislados representantes de los diferentes grupos en los años antes indicados en los cuales se analizó la heterogeneidad de sus *rrs*. A la izquierda, el dendrograma que ilustra el agrupamiento de los patrones de similitud de los DGREA entre cada aislado analizado. KX corresponde a la cepa pandémica del Sudeste asiático RIMD2210633. PMA: Aislado ambiental obtenido de Puerto Montt. COA: Aislado ambiental obtenido de Copiapó. ATC: Aislado clínico no pandémico obtenido de Antofagasta. LIA: Aislado ambiental obtenido de Lirquén. ATA: aislado ambiental obtenido de Antofagasta. Un aislado ambiental es aquel obtenido a partir de una muestra de mariscos.

Para explorar si la heterogeneidad observada en estos 13 aislados ocurría entre los nucleótidos 455 a 479 (numeración del *rrs* de *Escherichia coli*) como se había observado anteriormente para la cepa tipo de la especie *V. parahaemolyticus*, VpD (Moreno y col., 2002), se examinó la formación de heterodupletes al amplificar por PCR el segmento variable del gen 16S rRNA, utilizando los partidores 357F y 518R (González-Escalona y col., 2005). Se observaron los heterodupletes en los 13 aislados que mostraron heterogeneidad intragenómica por amplificación del *rrs* casi completo (Fig. 4), indicando que la heterogeneidad estaba localizada, probablemente en forma exclusiva, en el mismo segmento donde se había encontrado en la cepa heterogénea VpD. El número de bandas con menor migración (heterodupletes) que la banda principal (homoduplete), refleja el posible número de secuencias diferentes (alelos *rrs*). La menor migración del heteroduplete refleja el grado de disimilitud entre los alelos *rrs* (Espejo y col., 1998).

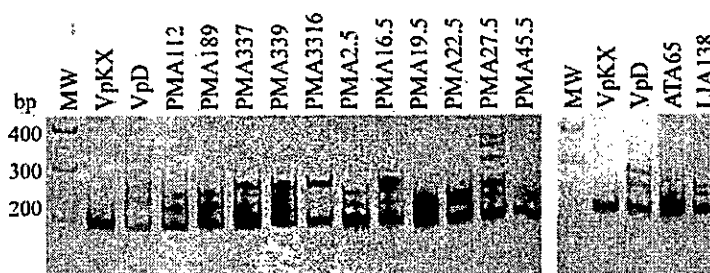


Fig. 4. Productos de la amplificación por PCR del segmento variable de los *rrs* de diferentes aislados de *V. parahaemolyticus*. Los segmentos variables de un aislado representante de cada grupo DGREA fueron amplificados por PCR y separados por electroforesis en geles de poliacrilamida. MW: Marcador de peso molecular, BenchTop 100 bp Ladder. VpKX: Cepa pandémica del Sudeste asiático RIMD2210633. VpD: cepa tipo de la especie ATCC17802. Las otras cepas corresponden a aislados chilenos. PMA:

Aislado ambiental obtenido de Puerto Montt. ATA: aislado ambiental obtenido de Antofagasta. LIA: Aislado ambiental obtenido de Lirquén. Un aislado ambiental es aquel obtenido a partir de una muestra de mariscos.

Con el objeto de determinar si la heterogeneidad observada en la cepa tipo era común a todos los miembros de cada grupo DGREA, se analizaron varios aislados en aquellos grupos DGREA más numerosos. Los resultados mostraron que aislados pertenecientes al mismo grupo compartían el patrón de heterodupletes observado en la cepa tipo, sugiriendo que aislados del mismo grupo DGREA tienen una heterogeneidad idéntica en sus *rrs*. Este análisis incluyó 7 aislados del grupo 2.5 y 6 de cada uno de los grupos 112 y 45 (Fig. 5). La alta incidencia de la heterogeneidad en los *rrs* de los aislados de *V. parahaemolyticus* obtenidos de mariscos fue concordante con la observación de Moreno y col. (2002) de que la mayoría de cepas del género *Vibrio* muestran heterogeneidad intragenómica en sus *rrs*.

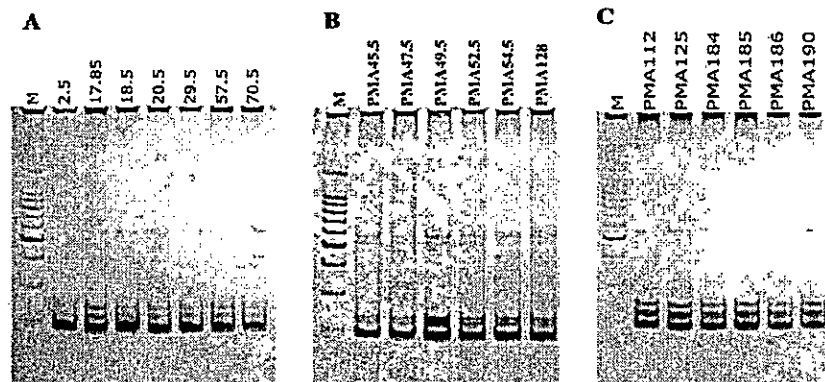


Fig. 5. Productos de la amplificación por PCR del segmento variable de los *rrs* en aislados ambientales pertenecientes a 3 grupos DGREA distintos. Aislados de los grupos DGREA 2.5 (A), 45.5 (B) y 112 (C) muestran compartir el mismo patrón de heterodupletes que el aislado

tipo respectivo de cada grupo, PMA: aislado ambiental obtenido de Puerto Montt. M: Marcador de peso molecular, BenchTop 100 bp Ladder.

2. Caracterización de la heterogeneidad intragenómica de los *rrs* en aislados ambientales.

2.1. Secuencias *rrs*.

Para realizar un análisis más detallado de la heterogeneidad, se determinó la secuencia de los segmentos heterogéneos en cada una de las cepas tipo de los grupos DGREA identificados hasta el 2005. Las secuencias en los aislados sin heterogeneidad en *sus rrs* fueron determinadas directamente del producto de PCR obtenido desde el DNA bacteriano total. Para determinar las secuencias en los aislados conteniendo diferentes alelos *rrs*, los distintos operones *rrn* fueron separados mediante digestión del DNA genómico con *ICeu-I* y posterior separación de los fragmentos utilizando electroforesis en campo pulsado (PFGE). *ICeu-I* cliva una secuencia de 19 pb en el gen 23S rRNA (Liu y col., 1993), generando fragmentos con un único *rrs*, excepto en aquellos que contienen operones *rrn* adyacentes en dirección opuesta. De acuerdo al genoma de la cepa secuenciada VpKX (Makino y col., 2003), *ICeu-I* genera 11 fragmentos (Fig. 6). Sin embargo, bajo las condiciones empleadas, sólo 6 bandas fueron suficientemente claras para ser escindidas desde el gel para su posterior secuenciación. Los tamaños esperados para estos 6 fragmentos se indican al lado izquierdo de los asteriscos en la Fig. 7.

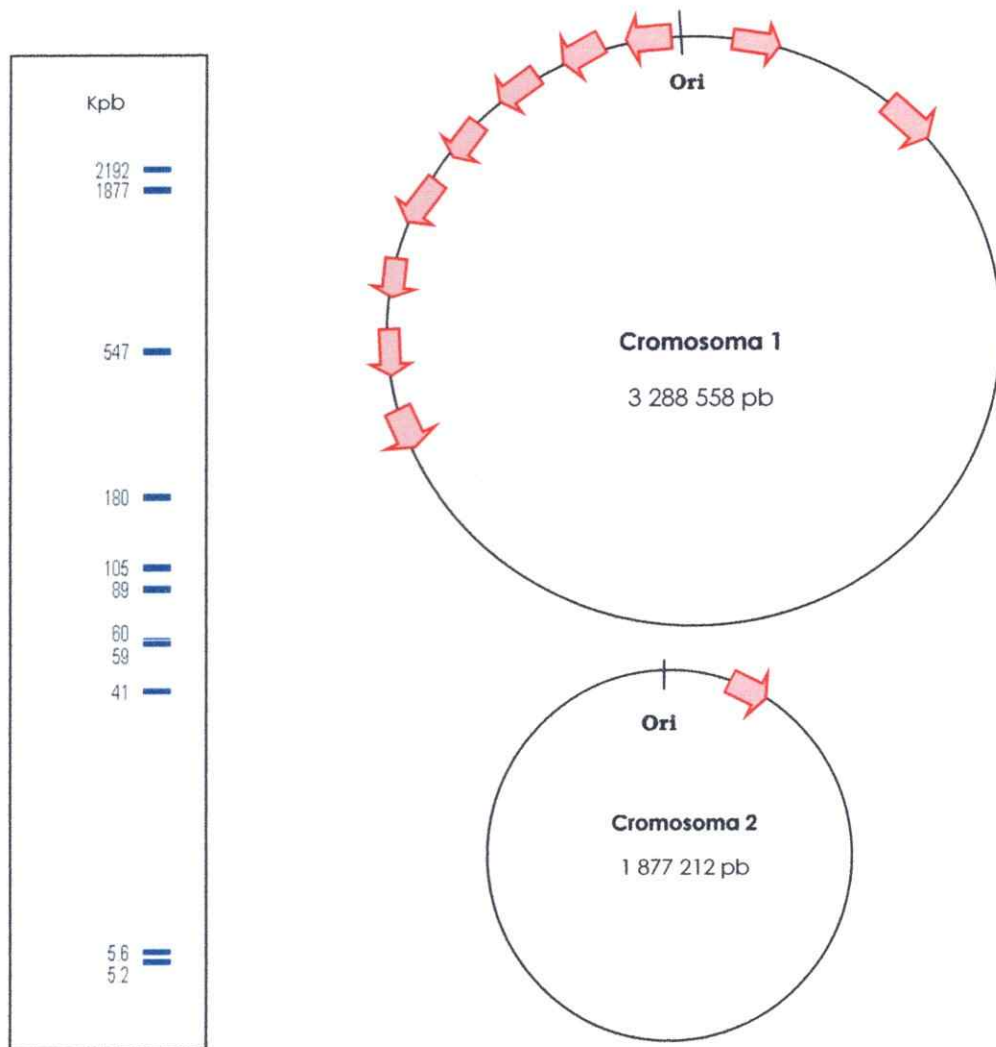


Fig. 6. Esquema que ilustra el patrón esperado luego de digerir el DNA genómico total de VpKX con I Ceu-I y el ordenamiento cromosomal de las múltiples copias de *rrn*. A la izquierda se muestra el patrón esperado en el PFGE de los 11 fragmentos obtenidos luego de la digestión del DNA genómico de VpKX. A la izquierda, la posición a escala de los 11 *rrn* en ambos cromosomas de VpKX (indicado por las flechas). Según esto, el fragmento más grande de 2192 kpb (cromosoma 1) contiene 2 copias del *rrs* debido a la dirección convergente de los operones adyacentes; por el contrario, el fragmento más pequeño cercano al OriC (cromosoma 1) no contiene ningún *rrs* debido a la dirección divergente de los 2 operones adyacentes.

Los 2 fragmentos más pequeños esperados, de 5.2 y 5.6 Kpb cada uno, aparentemente migraron fuera del gel. Los 2 fragmentos más grandes de aproximadamente 2 Mpb se observaron débilmente en la parte superior del gel. Los dos fragmentos esperados de 59 y 60 kbp co-migraron en el gel. Debido a la presencia de 2 operones *rrn* adyacentes y en direcciones opuestas (Makino y col., 2003), uno de los fragmentos de 2Mpb de VpKX carece del gen *rrs*, mientras que el fragmento de 89Kbp contiene 2 genes *rrs*. Las bandas de 40 a 680 Kbp fueron escindidas desde el gel luego de la separación por electroforesis, y cada fragmento fue amplificado y el producto de PCR secuenciado.

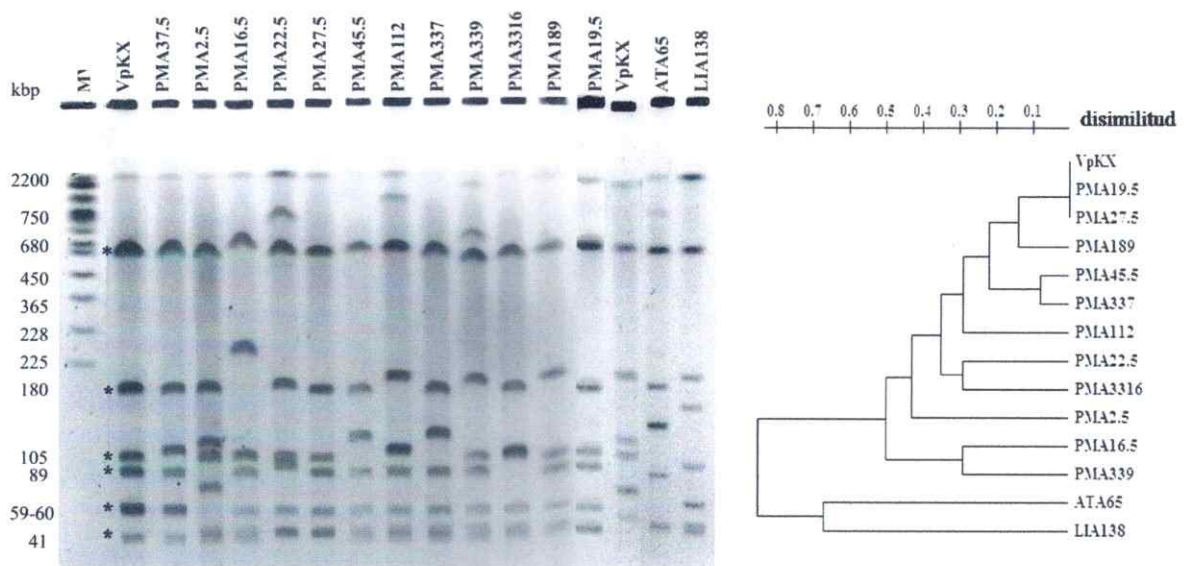


Fig. 7. Electroforesis en gel en campo pulsado de fragmentos de restricción (PFGE-RFLP) del DNA de VpKX y cepas tipo de *V. parahaemolyticus* representantes de los 13 grupos DGREA con *rrs* heterogéneos, digeridos con *ICeu-I*. A la izquierda, patrones PFGE-RFLP de fragmentos obtenidos por digestión con *ICeu-I* para la separación de los *rrn* en aquellos aislados que mostraron heterogeneidad en sus *rrs*. Las 6 bandas de mayor migración, denominadas B1 a B6 de mayor a menor migración, con tamaños desde 40 hasta 680 kbp (indicados por los asteriscos) fueron escindidos del gel para la amplificación del segmento variable del *rrs* y

posterior secuenciación. Según el perfil de digestión esperado para VpKX, el fragmento de 59-60 kpb (B2) contiene 2 bandas que comigran cercanamente juntas. A la derecha, el dendrograma ilustra el patrón PFGE-RFLP agrupado por disimilitud. M: DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*. VpKX: Cepa pandémica del Sudeste asiático RIMD2210633. PMA: Aislado ambiental obtenido de Puerto Montt. ATA: Aislado ambiental de Antofagasta. LIA: Aislado ambiental obtenido de Lirquén.

Las secuencias obtenidas para los aislados sin heterogeneidad en sus *rrs* (monomórficos) (PMA37.5 (grupo KX), PMA3.5, PMA79, PMA1.5, PMA109.5, ATC230 (grupo ATA30), ATC297 y COA62) fueron idénticas a aquellas encontradas en los 11 alelos de VpKX. De acuerdo a los patrones DGREA, algunos de estos aislados corresponden a grupos filogenéticamente muy distintos, y otros están cercanamente relacionados a grupos que muestran heterogeneidad en sus alelos *rrs* (por ejemplo, PMA3.5 y PMA189 en Fig. 3).

La comparación de las secuencias permitió distinguir un total de 16 secuencias o alelos diferentes en los 13 aislados con *rrs* heterogéneos. Estas 16 secuencias se clasificaron en 4 grupos, diferenciándose entre ellos en al menos 4 sitios nucleotídicos entre sí (Tabla 6). Un grupo corresponde a secuencias similares a aquellas encontradas en VpKX (González-Escalona y col., 2005). Los otros 2 grupos muestran secuencias similares a aquellas encontradas en VpD, D1 y D2 (Moreno y col., 2002). El cuarto grupo (ATA65-B2) contiene secuencias diferentes a todas las observadas previamente.

Tabla 6. Secuencias de los segmentos *rrs* en VpKX y en los aislados con *rrs* heterogéneos, y sus porcentajes de coincidencias en la base de datos RDP. Las secuencias de los segmentos fueron identificadas con el nombre del aislado en el cual fue encontrada en mayor abundancia, seguido del número asignado a la banda escindida desde el gel del PFGE-RFLP que contenía esa secuencia.

Aislado-banda PFGE	Secuencia del segmento variable del <i>rrs</i>	Nº hits ^a	% hits ^b	% hits ^c
		<i>Vibrionaceae</i>		<i>Vibrio</i>
VpKX-AB	GTAGTGTAGTTAATAG-CTGCATTAT	82	100	95
ATA65-B1-A.....	1	100	100
PMA22.5-B1	..G.....-	4	100	100
PMA337-B1-.....C	2	100	100
PMA19.5-B3C.....-	1	100	100
PMA3316-B1G.....	82 (1)	100	95
LIA138-B6C.....	82 (1)	100	95
PMA189-B3	..G.....-...Y..C..	8 (1)	100	75
PMA45.5-B3-...MT.YR,	85 (1)	100	92
VpD2-B1	.CG.GTAC.....-GTAT.CG.	4	100	100
ATA65-B2	.CG.C..C.....-G..G..G.	3	100	100
PMA339-B1	.CG....C.....-.....G.	31 (2)	100	6.5*
PMA189-B6	.CG.....-.....CG.	1	100	0**
VpD1-B4	.AG..AGT.....-ACT..C..	22 (1)	100	95.5
PMA16.5-B3	..G..AGT.....-ACT..C..	22 (1)	100	95.5
PMA2.5-B6	..G..AGT.....-ACT.....	22 (1)	100	95.5

^a: Número de 'hits' o hallazgos obtenidos luego de la búsqueda de cada segmento de 25 bases en la base de datos RDP utilizando la herramienta 'ProbeMatch'.

^b: Porcentaje de 'hits' totales correspondientes a bacterias de la familia *Vibrionaceae*.

^c: Porcentaje de 'hits' totales correspondientes a bacterias del género *Vibrio*.

(): Los números entre paréntesis indican el error permitido al utilizar 'ProbeMatch' en RDP. Este error sólo se permitió cuando no se obtuvo ningún resultado con la secuencia exacta.

*: *Photobacterium* = 90%. **, *Vibrionaceae* no clasificadas = 100%. Y: C/T, M: A/C, R: A/G.

AB: todas las bandas ('all bands') obtenidas por digestión con *I*Ceu-I y separación en PFGE-RFLP.

Otros fragmentos de restricción obtenidos con *I*Ceu-I: B1, de aprox. 40 a 50 kpb; B2, de aprox. 51 a 85 kpb; B3, de aprox. 86 a 120 kpb; B6, de aprox. 540 a 630 kpb.

2.2. Estructura secundaria de los diferentes *rrs*.

Cada grupo de las secuencias encontradas conserva la estructura característica de horquilla ('stem-loop') en este segmento de 25 bases del 16S rRNA. La secuencia que conforma el tallo ('stem') fue muy variable, pero cada variación tuvo un cambio compensatorio que mantuvo 7 a 8 bases apareadas en esta región (Fig. 8).

Por el contrario, la secuencia de hebra simple que conforma el 'loop' se conservó en cada segmento, excepto en PMA3316-B1 y LIA138-B6, las cuales contienen un nucleótido adicional. La inclusión de este nucleótido en esta región de hebra simple parece ser necesaria para mantener la estructura secundaria de doble hebra en el tallo. Aunque las secuencias difirieron en al menos 12 de las 25 posiciones nucleotídicas de este segmento, la comparación con aquellas almacenadas en la base de datos de genes 16S rRNA (RDP, Ribosomal Data Project) (Cole y col., 2005) mostró que éstas se encuentran casi exclusivamente en bacterias del género *Vibrio* (ver Anexo 2).

La Tabla 6 también muestra el número de coincidencias ('hits') obtenidos luego de realizar la búsqueda de cada secuencia de 25 bases en la base de datos RDP usando la herramienta 'ProbeMatch'. En las columnas de la derecha se muestra el porcentaje del total de coincidencias correspondiente a bacterias de la familia *Vibrionaceae* o bacterias del género *Vibrio*.

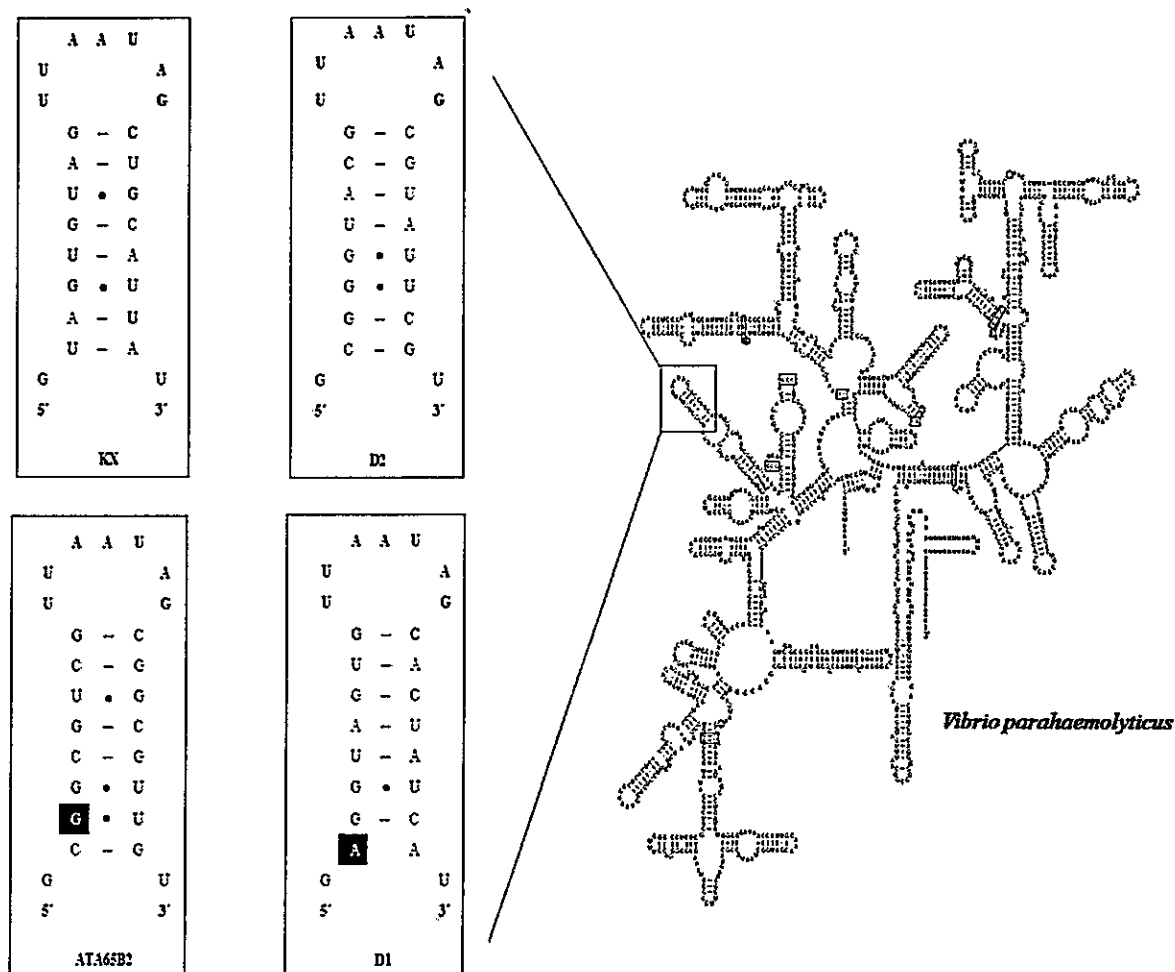


Fig. 8. Estructura secundaria del 16S rRNA de *V. parahaemolyticus* X56580 y estructuras secundarias de cuatro principales secuencias de los segmentos *rrs* encontradas en diferentes aislados ambientales de *V. parahaemolyticus*. Los recuadros de la izquierda representan las estructuras secundarias de cada uno de los 4 grupos de secuencias distintas en el segmento variable del *rrs* encontradas entre los aislados con heterogeneidad. Las variaciones nucleotídicas acompañadas por cambios compensatorios se muestran en cajas grises y variaciones sin cambios compensatorios se muestran en cajas negras. El modelo del 16S rRNA fue obtenido de Cannone y col. (2002) URL:<http://www.rna.icmb.utexas.edu/>

La Tabla 7 muestra la distribución de los alelos *rrs* en VpKX y en cada uno de los 13 aislados con heterogeneidad en sus *rrs*. Aquellos aislados que contienen secuencias correspondientes a grupos diferentes están indicados con distintos colores de fondo. El grado de heterogeneidad intragenómica en los *rrs* fue variable para algunos aislados que contenían alelos de hasta 3 diferentes grupos (por ejemplo, PMA189 o PMA112). La mayoría de aislados con heterogeneidad contenían alelos *rrs* que diferían desde 4 hasta 12 sitios. En algunos casos, la secuencia obtenida desde el amplicón de la banda PFGE mostró polimorfismo para algunos sitios, implicando que esta banda contenía más de un gen *rrs*, probablemente 2. Dos alelos *rrs* en la misma banda pueden aparecer debido a la existencia de operones *rrn* adyacentes en dirección opuesta o como resultado de la co-migración de 2 fragmentos de restricción. En estos casos, sólo se observaron 2 bases diferentes en cada sitio polimórfico, lo cual se explicaría por la presencia de 2 secuencias *rrs* en el segmento, mostrado en la Tabla 6. Por ejemplo, el polimorfismo encontrado para la banda B1 (40-50) del aislado PMA19.5 se explica por la presencia de 2 secuencias: ATA65-B2 y D2 (Fig. 9).

El examen de más de un aislado perteneciente a un mismo grupo DGREA indicó que aislados del mismo grupo contenían los mismos alelos *rrs*. Sin embargo, estos alelos podrían estar distribuidos en operones diferentes. Para explorar una posible heterogeneidad en la distribución de los alelos en los diferentes operones entre aislados del mismo grupo DGREA, se determinó la secuencia del segmento variable de los *rrs* en 2 fragmentos de restricción de 2 aislados de cada uno de los grupos 2.5 y 45.5, y un aislado adicional del grupo 112, todos los aislados procedían de diferentes muestras. El

análisis de las secuencias obtenidas mostró que aislados del mismo grupo DGREA contenían en los fragmentos analizados, secuencias idénticas a las encontradas en los fragmentos de la cepa tipo del grupo.

Tabla 7. Secuencias de los segmentos variables de los *rrs* en diferentes bandas PFGE observados luego de la hidrólisis de los aislados con la enzima de restricción *ICeu-I*.

Aislado	Banda PFGE (Kbp)					
	B1(40-50)	B2(51-85)	B3(86-120)	B4(104-170)	B5(180-610)	B6(540-630)
VpKX	KX	KX	KX	KX	KX	KX
PMA45.5	KX	KX	45.5B3	KX	KX	KX
PMA3316	3316B1	KX	LIA138B6	KX	KX	ND
PMA2.5	KX	KX	KX	KX	KX	2.5B6
PMA337	337B1	3316B1	337B1	KX	KX	16.5B3
LIA138	KX	KX	D2	KX	KX	LIA138B6
PMA22.5	22.5B1	KX	22.5B1	D2	22.5B1	ND
PMA27.5	KX	KX	KX	16.5B3	KX	LIA138B6
PMA189	KX/22.5B1	16.5B3	189B3	16.5B3	KX	189B6
PMA19.5	ATA65B2 D2	KX	19.5B3	KX	ATA65B2	ND
PMA112	16.5B3	16.5B3	KX	16.5B3	LIA138B6	189B6
PMA339	339B1	339B1	KX 339B1	KX	16.5B3	339B1
ATA65	ATA65B1	ATA65B2	ATA65B2	ATA65B2	ATA65B2	ND
PMA16.5	ATA65B2	KX	16.5B3	16.5B3	ATA65B2	16.5B3
VpD	D2	D2	D1 D2	D1	D1	D1

Los colores marcados en algunas celdas hacen referencia a los diferentes 4 grupos de secuencias. Sin color: VpKX, verde: ATA65B2, rosado: VpD1, amarillo: VpD2.

Dos secuencias distintas en una misma banda fueron observadas para algunos aislados.

B1 a B6: indican las bandas o fragmentos de restricción escindidos desde el gel del PFGE-RFLP.

ND: No determinado.

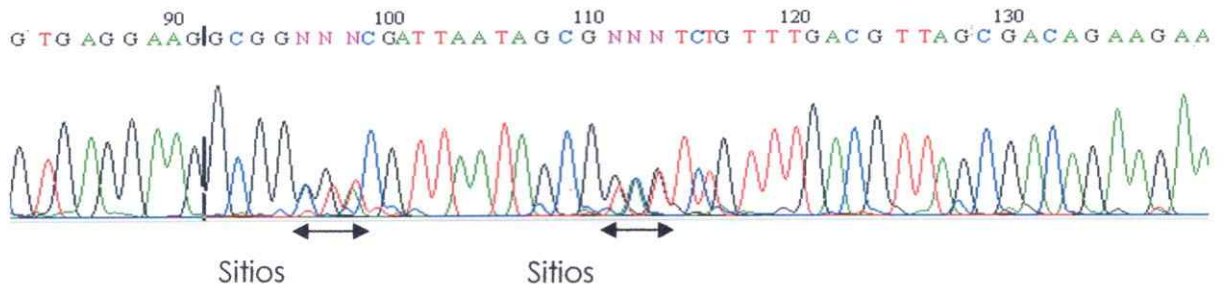


Fig. 9. Electroferograma obtenido de la secuencia correspondiente al segmento variable del amplicón *rrs* de la cepa PMA19.5. Este fragmento contiene sitios polimórficos, indicados por flechas, que sugieren la presencia de 2 secuencias distintas.

El examen de más de un aislado perteneciente a un mismo grupo DGREA indicó que aislados del mismo grupo contenían los mismos alelos *rrs*. Sin embargo, estos alelos podrían estar distribuidos en operones diferentes. Para explorar una posible heterogeneidad en la distribución de los alelos en los diferentes operones entre aislados del mismo grupo DGREA, se determinó la secuencia del segmento variable de los *rrs* en 2 fragmentos de restricción de 2 aislados de cada uno de los grupos 2.5 y 45.5, y un aislado adicional del grupo 112, todos los aislados procedían de diferentes muestras. El análisis de las secuencias obtenidas mostró que aislados del mismo grupo DGREA contenían en los fragmentos analizados, secuencias idénticas a las encontradas en los fragmentos de la cepa tipo del grupo.

3. Caracterización de aislados clínicos no pandémicos.

3.1. Presencia de marcadores de virulencia y heterogeneidad en sus *rrs*.

El año 2007, los casos clínicos causados por la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* serovar O3:K6 representaron un 71%, muy diferente al 100% observado en años anteriores. Los aislados clínicos clasificados como no pandémicos fueron definidos como tales por carecer de los marcadores típicos de cepas pandémicas (*orf8* y *toxRS/new*) y por diferencias en el patrón obtenido por DGREA (Fig. 10). Se distinguieron 4 grupos; uno responsable de 13% de los casos comprendía aislados *tdh* positivos, y otro (11% de los casos) contenía aislados positivos a *tdh* y *trh*. Los otros 2 grupos contenían aislados negativos a ambos marcadores (ver Tabla 2 en Material y Métodos). Como cepa tipo del grupo responsable del 13% de los casos, se eligió la cepa PMC38.7, la cual resultó también distinta de la cepa pandémica y de la mayoría de aislados clínicos en cuanto a la composición de sus *rrs*, pues presentó heterogeneidad entre sus múltiples copias, una característica que como se observó anteriormente es muy frecuente entre los aislados ambientales (Fig. 11). Esta heterogeneidad es probablemente causada por transferencia lateral de los *rrs* (Harth y col., 2007). Se observaron 3 secuencias *rrs* diferentes en PMC38.7, correspondientes a los grupos VpD1-B4, ATA65-B2 y VpKX-AB (Harth y col., 2007).

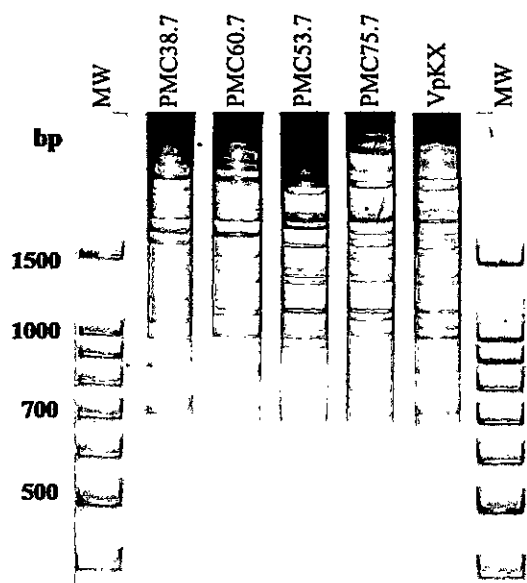


Fig. 10. DGREA con *NaeI* de aislados clínicos representantes de los distintos patrones observados durante los brotes del verano 2007 en Puerto Montt. MW: Marcador de peso molecular 100 bp. VpKX: Cepa pandémica asiática RIMD2210633, O3:K6. PMC: Aislado clínico obtenido en Puerto Montt.

Como el gen *tdh* puede ser propagado inter e intragenómicamente por elementos tipo secuencias de inserción que lo flanquean (Terai y col., 1991; Nishibuchi y Kaper, 1995), se exploró la posibilidad que el *tdh* encontrado en los aislados no pandémicos procediera de la cepa pandémica. Para este objeto se secuenciaron los amplicones de *tdh* en aquellos aislados representantes de los grupos no pandémicos: PMC38.7 (*tdh* positivo) y PMC60.7 (positivo a *tdh* y *trh*). El amplicón de PMC60.7 mostró una secuencia idéntica a aquella reportada para *tdhA* (Makino y col., 2003), excepto por el cambio en un único nucleótido. Mientras que PMC38.7 mostró una secuencia idéntica a la esperada para los 2 genes *tdh* presentes en VpKX (*tdhA* y *tdhS*) (Makino y col.,

2003). Estos genes difieren ligeramente (3.4%), y la mezcla de los productos de PCR de PMC38.7 mostró el polimorfismo esperado al secuenciar una mezcla de estos 2 alelos.

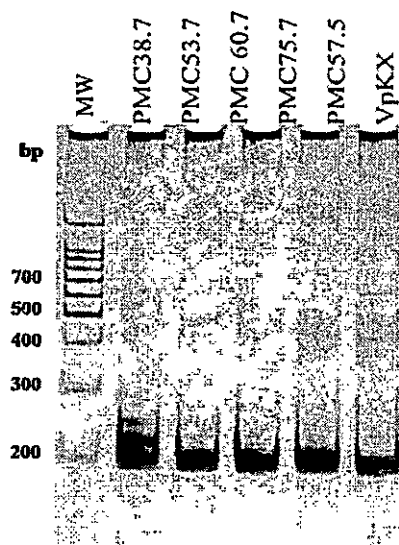


Fig. 11. Productos de la amplificación por PCR de la región variable de los *rrs* en aislados clínicos no pandémicos. Presencia de heterodupletes como indicador de heterogeneidad en los *rrs* en PMC38.7. VpKX: cepa pandémica del Sudeste asiático. 100bp: marcador de peso molecular.

El aislado tipo PMC53.7 resultó tener un patrón indistinguible por DGREA con un grupo correspondiente a un aislado ambiental observado anteriormente en el año 2005: grupo 1.5.

Para determinar la relación filogenética de los nuevos aislados clínicos, se realizó una caracterización por “Multilocus Sequence Typing” (MLST). Se secuenciaron los 7 genes “housekeeping” descritos para el esquema MLST de *V. parahaemolyticus* (ver Material y Métodos) en los 4 aislados. En la Fig. 12 se observa que los “Sequence Type” (ST) que identifican los aislados chilenos no pandémicos tipificados por MLST

(ST 63, 28 y 64) se concentran en un grupo distinto al de las cepas pandémicas (ST 42, 51, 3 y 27). Las secuencias nucleotídicas de los 7 genes “housekeeping” en PMC38.7 fueron en promedio sólo 98.5% idénticas a aquellas en la cepa pandémica VpKX, indicando que pertenece a un grupo filogenéticamente diferente.

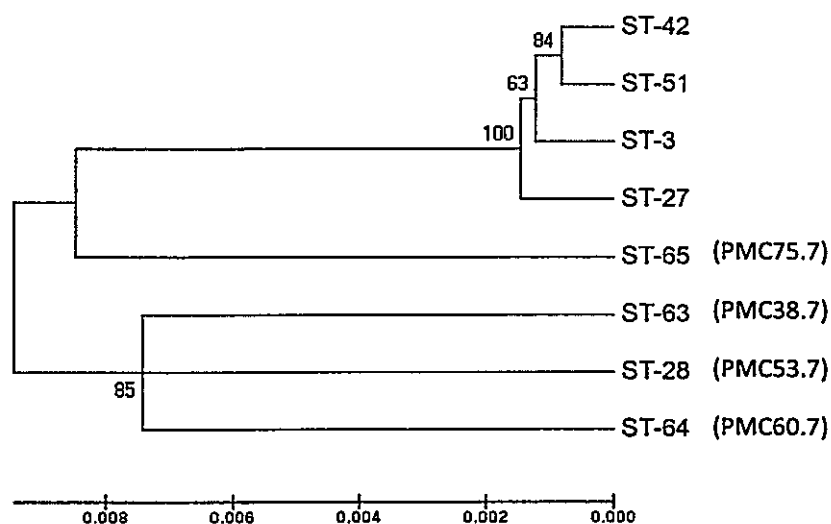


Fig 12. Dendrograma que muestra la relación filogenética de los aislados clínicos no pandémicos chilenos con aislados pandémicos. El árbol de mínima evolución (“ME tree”) fue construido en el programa MEGA4. Los 4 aislados clínicos no pandémicos fueron tipificados según el esquema MLST para *V. parahaemolyticus* y las secuencias tipo (“Sequence Tpe”) fueron obtenidos para cada uno de ellos (ST 65, 63, 28 y 64). Secuencias tipo 42, 51, 3, 27: Representan a los aislados pandémicos de *V. parahaemolyticus* descritos en la base de datos de MLST.

3.2. Presencia de la isla de patogenicidad.

Debido a la heterogeneidad de los *rrs* en PMC38.7, que sugiere la ocurrencia de transferencias laterales desde otros vibrios, y a la aparente presencia de los genes *tdhA* y

tdhS que se encuentran en los extremos de la isla de patogenicidad de VpKX, se examinó la probable presencia de esta isla completa en PMC38.7. Debido a que los genes *tdh* están localizados en cada uno de los extremos de la isla de patogenicidad en el cromosoma 2 (IPa-2) de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* (Makino y col., 2003), se exploró la presencia de la isla completa mediante amplificación de 11 genes del sistema de secreción tipo III (SSTT2) localizados en la IPa-2 (VPA1335, 1338, 1339, 1341, 1342, 1346, 1349, 1354, 1355, 1362 y 1367), así como también los genes VPA1321 y VPA1376 localizados en los extremos de la isla y cercanos a *tdhA* y *tdhS*. VPA1321 codifica un homólogo al factor necrotizante citotóxico de *E. coli* y VPA1376 es homólogo a un gen de la isla de patogenicidad de *V. cholerae*. Todos estos genes fueron encontrados en PMC38.7 cuando se realizaron amplificaciones por PCR con partidores diseñados de acuerdo a la secuencia de VpKX. Las secuencias de los amplicones fueron idénticas a aquellas reportadas para los genes de la cepa pandémica excepto en un solo sitio nucleotídico de VPA1342. La alta identidad de todos estos genes con aquellos en VPKX sugirió que toda la isla ha sido recientemente adquirida desde la cepa pandémica.

Meador y col. (2007) han mostrado recientemente que los genes del SSTT2 no son exclusivos de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, por lo que se exploró su ocurrencia en otros aislados clínicos y ambientales obtenidos de Puerto Montt pertenecientes a distintos grupos DGREA. Se analizó por PCR la presencia del gen VPA1335 del SSTT2 en 20 cepas correspondientes a 18 grupos DGREA de aislados ambientales (PMA79, 112, 118, 189, 337, 339, 3316, 1.5, 19.5, 22.5, 27.5, 13.6, 34.6,

36.6, 40.6, 1.7, 11.7, and 21.7) y un aislado representante de cada uno de los 3 nuevos grupos DGREA obtenidos de aislados clínicos de Puerto Montt el 2007 (PMC60.7, 53.7 and 75.7). Sólo en una cepa (PMA339) aislada en el verano del 2004, se encontró este gen. La amplificación por PCR en esta cepa de los otros genes del SSTT2 y de VPA1321y VPa1376, examinados en PMC38.7, mostró resultados positivos para todos ellos. Sin embargo, las secuencias de los amplicones mostraron diferencias importantes con los genes de la cepa pandémica, que variaron desde 0.6% para VPA1362 a 6.2% para VPA1346, con un promedio de 2.3% para todos los genes comparados. Estas diferencias indican una distancia evolutiva mucho mayor entre los genes de la isla encontrados en PMA 339 y la cepa pandémica que entre aquellos en PMC38.7 y la cepa pandémica.

Para una mejor caracterización de la isla putativa en PMC38.7 se determinó si los genes encontrados estaban contiguos, como era de esperar si estaban formando parte de una isla de patogenicidad, y el posible sitio de inserción de esta isla putativa en el cromosoma. Con este objeto se realizaron amplificaciones de varias regiones de la isla utilizando combinaciones de los partidores que amplificaban genes de la isla de patogenicidad de VPKX (ver Tabla 3 en Material y Métodos). Por ejemplo, un par de partidores comprendiendo VPA1335 a VPA1338 fue usado para amplificar una región de 2442 pb. Se obtuvieron resultados positivos con 11 pares de partidores, logrando amplificar regiones de hasta 6508 pb a lo largo de la probable isla de patogenicidad (Fig. 13), resultados que sugieren que los genes anteriormente amplificados están organizados conformando un segmento continuo.

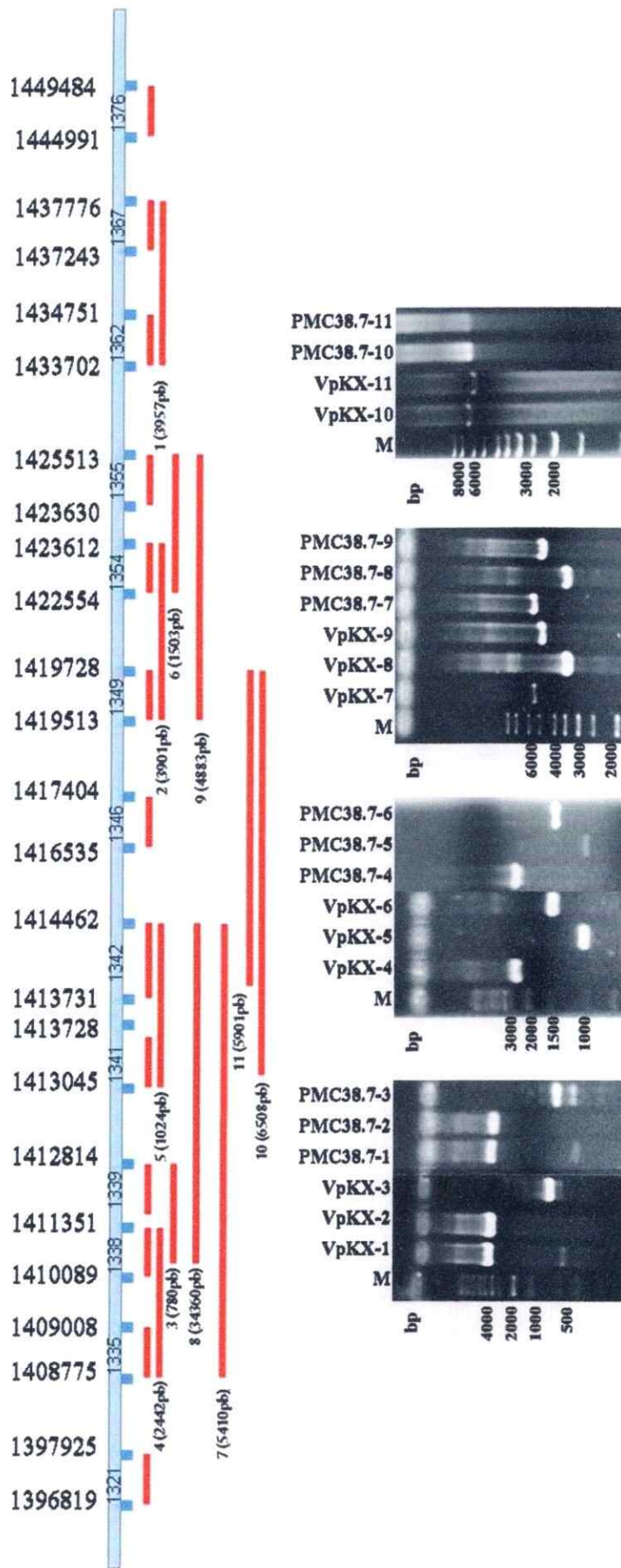


Fig. 13. Diagrama que ilustra las regiones amplificadas por PCR en la isla de patogenicidad de PMC38.7. Las líneas rojas representan las regiones amplificadas y a la izquierda de cada línea se indica el par de partidores empleados (Ver Material y Métodos), así como el tamaño del producto esperado entre paréntesis, coincidente con las imágenes mostradas en la parte inferior donde se comparan los productos obtenidos en VpKX y PMC38.7. Dentro de la línea celeste se indican las posiciones nucleotídicas según la isla de patogenicidad individualmente. Los números en la parte superior de la línea celeste indican las posiciones nucleotídicas en el genoma secuenciado de VpKX. M: marcador de peso molecular 1 kb. VpKX: Cepa pandémica del Sudeste asiático RIMD2210633. PMC: Aislado clínico obtenido de Puerto Montt.

3.3. Identificación de los sitios de inserción de la isla de patogenicidad en PMC38.7.

Las secuencias límite de las islas de patogenicidad juegan un rol importante en su integración y/o escisión. Las islas de patogenicidad están flanqueadas por cortos repetidos directos, los cuales pueden actuar como sitios blanco para recombinasas específicas, facilitando los rearrreglos. En el caso de *V. parahaemolyticus*, se ha descrito que la isla de patogenicidad está delimitada por secuencias repetidas directas de 8 bases pero la publicación no entrega la secuencia propiamente tal (Hurley y col., 2006). Con el objeto de identificar precisamente el sitio de inserción de la isla, se realizó una búsqueda de los posibles repetidos directos. Se identificaron 2 secuencias de 8 bases, la primera (AAACTGAC) en las posiciones 1390320 y 1468696, y la segunda (TACAAAAA) en las posiciones 1390530 y 1468898 del cromosoma 2 de VpKX.

Para determinar si el sitio de inserción de la isla de patogenicidad en PMC38.7 es idéntico al sitio en VpKX, se diseñaron pares de partidores para amplificar los límites de la isla, los cuales incluyeron tanto una región cromosomal así como una de la isla. El primer par de partidores comprendió un partidor directo (forward) dentro de una región de VPA1311, gen flanqueante en el 5' de la región cromosomal, y un partidor reverso dentro de una región de VPA1312, descrito como el primer gen dentro de la isla (Hurley y col., 2006). El segundo par de partidores comprendió un partidor directo dentro de VPA1398, último gen de la isla (Hurley y col., 2006) y un partidor reverso dentro de VPA1399, gen flanqueante en el 3' de la región cromosomal. En ambos casos se

obtuvieron productos de PCR de los tamaños esperados: 1572 y 997 pb, respectivamente, observándose lo mismo cuando se amplificó DNA de VpKX (Fig. 14), sugiriendo que la isla está insertada en el mismo sitio que en VpKX y que las secuencias de estas regiones en PMC38.7 son muy parecidas a las de VpKX como para lograr una buena amplificación con los partidores diseñados según la secuencia en VpKX.

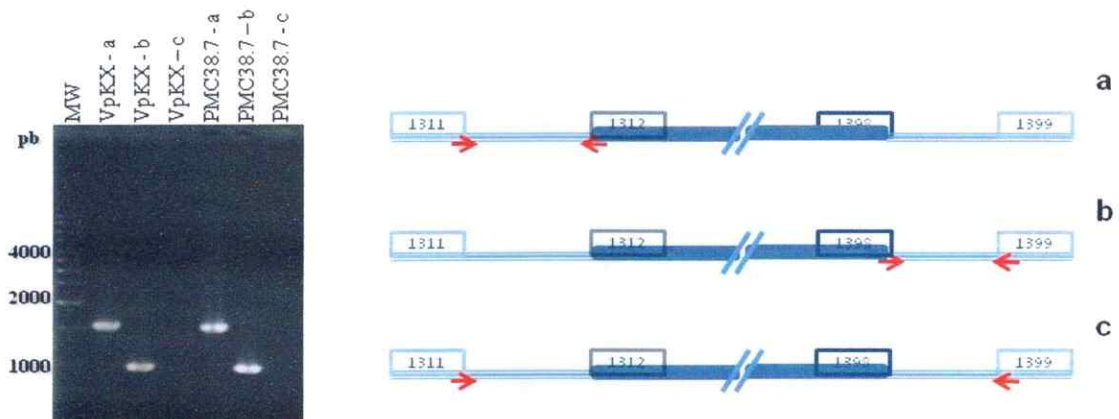


Fig. 14. Productos de la amplificación por PCR de los límites de la isla de patogenicidad en VpKX y PMC38.7. A la derecha: esquema que ilustra las regiones amplificadas cuyos productos se muestran en el gel. La isla de patogenicidad está representada con la barra azul central, con VPA1312 como el primer gen y VPA1398 como el último gen. a: Amplicón de la región flanqueante izquierda, b: Amplicón de la región flanqueante derecha, c: Combinación de partidores con los cuales no se espera obtener ningún producto. MW: marcador de peso molecular 1kb. VpKX: Cepa pandémica del Sudeste asiático RIMD2210633. PMC: Aislado clínico obtenido de Puerto Montt.

Sin embargo, la comparación de las secuencias de los amplicones de PMC38.7 con los de VpKX mostraron cierta inconsistencia. Las secuencias de los amplicones correspondientes a las regiones cromosomales flanqueantes a la isla de patogenicidad en

PMC38.7 mostraron ser 100% idénticas en la región izquierda, una identidad inesperada dada las diferencias de 1.5% observadas para los genes “housekeeping”. En cambio, se observó una identidad de 98.7 % en la región derecha con las secuencias en VpKX (Fig. 15), identidad que se aproxima con el 98.5% existente entre los genes “housekeeping” de PMC38.7 y VpKX Sin embargo, la diferencia del 1.3% incluye el segmento correspondiente a la isla, sugiriendo que todo el amplicón correspondería al cromosoma de PMC38.7. Por otro lado, en la región izquierda el 100% de identidad con la secuencia en VpKX sugiere que este segmento correspondería a la isla y no incluiría parte del cromosoma de PMC38.7. Las interpretaciones de estos resultados se discuten en la siguiente sección.

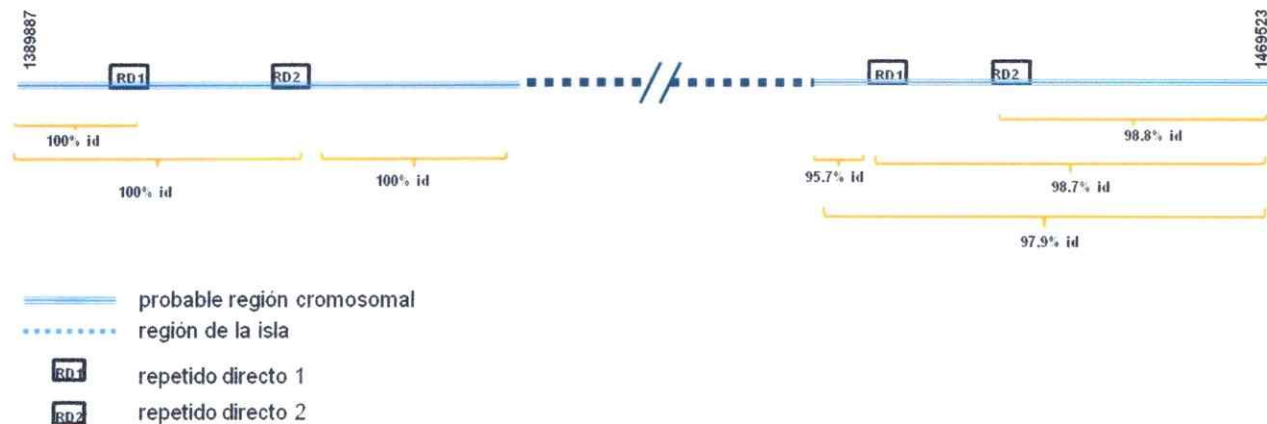


Fig. 15. Esquema que ilustra las regiones cromosomales flanqueantes a la isla de patogenicidad en VpKX, que fueron amplificadas por PCR en PMC38.7. En ambos extremos se indica la posición de los probables repetidos directos (RD). Entre llaves se indican los porcentajes de identidad de las secuencias donde probablemente comienza (izquierda) o termina (derecha) la isla de patogenicidad, tomando como referencia la presencia de los RD1 o RD2, de PMC38.7 comparado con las secuencias en VpKX.

DISCUSION

El desarrollo de esta tesis contribuyó al conocimiento de dos fenómenos importantes en la biología de *V. parahaemolyticus*:

i) la extensión de la heterogeneidad intragenómica en los múltiples loci *rrs* y el posible mecanismo de diferenciación y evolución concertada de los múltiples genes *rrs*, ii) la generación de nuevos patógenos, mediante la adquisición de un elemento genético que contribuiría principalmente con la virulencia: la isla de patogenicidad. Ambos fenómenos están relacionados con la transferencia horizontal de genes.

1. Caracterización de la heterogeneidad intragenómica de los *rrs* en aislados ambientales.

1.1. Heterogeneidad intragenómica en los genes 16S rRNA (*rrs*).

Nuestros resultados muestran que la heterogeneidad intragenómica de los genes *rrs* en cepas de *V. parahaemolyticus* es una característica de esta especie, ya que se encontró en 62% de los genotipos analizados, similar a lo observado en los *Halobacteriales*, para los cuales Boucher y col. (2004), sugieren que la heterogeneidad intragenómica es una característica antigua y estable en varios de esos linajes.

La heterogeneidad intragenómica de los genes *rrs* fue estimada por la formación de heterodupletes luego de su amplificación por PCR (Espejo y col., 1998). La formación

de heterodupletes ocurre cuando los amplicones contienen malos apareamientos dentro de un corto segmento. En este caso, los heterodupletes se forman entre las hebras de una cadena de los amplicones *rrs* de distintos alelos que difieren en secuencia. Estos amplicones hibridan cuando la temperatura disminuye durante el alineamiento en el último ciclo del PCR, y como consecuencia de los malos apareamientos estos híbridos muestran migración electroforética retardada en los geles de poliacrilamida.

1.2. Estructura secundaria de los diferentes *rrs*.

La mayoría de las sustituciones nucleotídicas observadas en la región del tallo de los diferentes alelos *rrs*, van acompañadas de cambios compensatorios que conservan la estructura secundaria de esta región. La mantención de la estructura secundaria es importante, dada la complejidad del ribosoma y a las numerosas interacciones del *rrs* con proteínas y otros componentes del RNA.

Dos de las características de este segmento variable de 25pb, ya reportadas en las cepas VpAQ y VpD (González-Escalona y col., 2005; Moreno y col., 2002), se observaron también en las nuevas cepas analizadas: 1) una secuencia altamente variable que mantiene la estructura secundaria del tallo, y 2) una secuencia conservada en la hebra simple que conforma el "loop". Esta conservación sugiere que el segmento puede tener un rol esencial en el funcionamiento del ribosoma. Una función reportada para este segmento es el requerimiento para una interacción específica entre los nucleótidos 456-476 del 16S rRNA de *E. coli* y la proteína S4, una proteína ribosomal esencial para el

ensamblaje del ribosoma (Sapag y col., 1990). Según los resultados, el tallo podría considerarse un alelo neutral ya que su estructura de doble hebra se conserva. La acumulación de varias sustituciones con cambios compensatorios implica que la divergencia de las diferentes versiones de estos segmentos *rrs* es relativamente antigua y, por lo tanto, es improbable que hayan evolucionado en la misma célula. Es más probable que cada versión evolucionó en diferentes bacterias y que luego se juntaron en una sola, mediante transferencia horizontal (González-Escalona y col., 2005; Morandi y col., 2005; Moreno y col., 2002; Sneath, 1993; Yap y col., 1999). Los resultados reportados en esta tesis muestran que algunas cepas de *V. parahaemolyticus* pueden contener hasta 3 alelos o variantes *rrs*, los cuales difieren en al menos 4 sitios nucleotídicos. La presencia de varios alelos *rrs* con tantas diferencias en aislados independientes refuerza la idea de que este polimorfismo probablemente se originó por transferencia horizontal mediante la adquisición de los alelos desde clones bacterianos diferentes.

1.3. Posibles causas de la heterogeneidad en los *rrs*.

La recombinación entre genes rRNA de diferentes cepas o especies podría ocurrir a una frecuencia mucho mayor que la originalmente sospechada. El origen de la heterogeneidad podría ser por recombinación, o simplemente por divergencia aleatoria de genes parálogos o genes repetidos dentro de un genoma (Boucher y col., 2004). Es difícil distinguir entre estas posibilidades, las cuales no son mutuamente exclusivas. La

probable recombinación entre estos genes no puede confirmarse a menos que el origen del fragmento recombinado sea identificado. En este caso, la búsqueda de las regiones variables correspondientes a las diferentes secuencias, y su hallazgo en diversas especies de *Vibrio*, nos sugiere que el origen está dentro de bacterias de este género.

Si la heterogeneidad intragenómica en los genes *rrs* es generada por recombinación, la alta proporción de aislados ambientales con heterogeneidad (62%), sugiere que transferencia lateral y recombinación son frecuentes entre cepas de *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, la transferencia lateral podría tener diferentes efectos sobre la heterogeneidad intragenómica. La composición de *rrs* observada dentro de cada grupo DGREA se mantendría similar al ocurrir recombinación intergenómica entre miembros del mismo grupo DGREA. Esto es altamente probable porque bacterias que se encuentran físicamente muy próximas pertenecerían al mismo clon y también porque la recombinación es mayor entre genes idénticos (Majewski y Cohan, 1999). En esta situación, la transferencia génica horizontal podría ser un mecanismo de evolución concertada de los 11 alelos *rrs* intragenómicos ya que la recombinación intergenómica en *V. parahaemolyticus* es más frecuente que la mutación (González-Escalona y col, manuscrito), como ocurre también en algunas otras especies bacterianas (Feil y col., 1999, 2000). Por ejemplo, podría ocurrir que la recombinación intergenómica entre bacterias de un grupo DGREA conduzca a convertir todos los *rrs* a la versión o alelo más abundante. Igualmente la recombinación intergenómica entre bacterias de un grupo DGREA con idénticos *rrs* reemplazaría las variantes que pudieran surgir por mutación, ya que la frecuencia de cambio en los genes de *V. parahaemolyticus* parece ser mayor

por transferencia lateral que por mutación (González-Escalona y col., manuscrito). Por otro lado, la recombinación intergenómica entre bacterias de diferentes clones que contienen diferentes *rrs* podría causar heterogeneidad intragenómica. Estas variantes podrían destruir la coherencia de los grupos DGREA, pero sólo si estos grupos corresponden a ecotipos distintos, pues de otra manera la coherencia sería recuperada por selección periódica.

Es probable que la recombinación intergenómica entre los *rrs* esté mediada por fagos, ya que han sido aislados desde el mar bacteriófagos que transducen genes a *V. parahaemolyticus* (Chang y col., 1998), y se estima que en el mar la transducción ocurre frecuentemente (Jiang y Paul, 1998). Además, se ha demostrado que algunos fagos marinos pueden albergar genes 16S rRNA (Beumer y Robinson, 2005). Aunque no podemos descartar otros mecanismos.

1.4. Significado de la heterogeneidad intragenómica de los genes *rrs*.

La extensión de la heterogeneidad intragenómica del gen *rrs* entre bacterias con múltiples copias de este gen (1 a 15), varía de 0 a 11.6% en divergencia de secuencias. Además, 62% de bacterias con más de una copia de este gen muestran algún grado de heterogeneidad intragenómica. Ciertas regiones del *rrs* muestran un número mayor de posiciones heterogéneas, las cuales pueden resultar por la acumulación de sustituciones nucleotídicas neutrales o por recombinación (Case y col., 2007). En este caso la región variable observada para *V. parahaemolyticus* en las posiciones 455 – 479 del gen *rrs* de

E. coli corresponde al hélice 17 del 16S rRNA (región hipervariable del *rrs*) y según los resultados observados es muy probable que los distintos segmentos variables de los *rrs* hayan surgido primero por mutaciones neutrales y luego hayan recombinado entre distintas bacterias.

Debido a que el 16S rRNA es la molécula de elección para el estudio de relaciones filogenéticas entre bacterias, la heterogeneidad intragenómica puede tener un impacto significativo para la identificación y clasificación de organismos a través de análisis filogenéticos. Probablemente afecte la filogenia de bacterias cercanamente relacionadas, para las cuales una heterogeneidad intragenómica puede ser tan significativa como la heterogeneidad intergenómica (Case y col., 2007). Además hay reportes de que en el caso de los *Halobacteriales*, el nivel de heterogeneidad intragenómica es tan alto (5%) que podría afectar la filogenia a nivel de género (Boucher y col., 2004; Walsh y col., 2004). Por ejemplo, en el caso de VpD que presenta 2 tipos de *rrs* distintos (D1 y D2), la presencia de estas 2 secuencias podría interpretarse como la presencia de dos diferentes especies, lo cual sugeriría revisar la designación de VpD como la cepa tipo de la especie *V. parahaemolyticus*.

La consecuencia de la heterogeneidad en la funcionalidad de los ribosomas permanece sin dilucidar. Se ha observado una relación entre funcionalidad y divergencia intragenómica en los *rrn* de *Plasmodium berghei*, el cual tiene 2 tipos de *rrs* que difieren en 5% de sus posiciones nucleotídicas, y que son expresados en diferentes etapas de su ciclo vital (Gunderson y col., 1987). En el caso del extremófilo *Haloarcula marismortui*, que contiene 2 *rrs* distintos en un 5%, ambas copias son expresadas en la misma célula

(Amann y col., 2000). Asimismo, se ha sugerido que en arqueas extremadamente halófilas podría obtenerse una ventaja selectiva por la expresión diferencial de operones *rrn* divergentes dependiendo de las concentraciones salinas del ambiente (García-Martínez, y col., 1999). En la cepa de *V. parahaemolyticus* VpD, las diferentes secuencias *rrs* son expresadas (González- Escalona, datos no publicados, comunicación personal) pero se desconoce si esta expresión puede ser diferencial en algunas condiciones ambientales. Algunos intentos realizados en el desarrollo de esta tesis para determinar una posible expresión diferencial durante carencia y reposición de nutrientes fueron infructuosos por la inaplicabilidad del método seleccionado.

2. Epidemiología de los brotes por *V. parahaemolyticus* y ocurrencia de nuevas cepas clínicas no pandémicas.

Durante el 2004 y 2005, sólo un 6% de los aislados ambientales, principalmente de mariscos bivalvos, correspondió al grupo clonal VpKX. El resto correspondió a clones no pandémicos, diferenciándose en 15 grupos distintos según sus patrones DGREA. En el 2006, 71% de los aislados se clasificaron en 6 grupos DGREA, 2 de los cuales habían sido observados en los años anteriores. El 2007, los aislados se clasificaron en 5 grupos distintos, 3 de los cuales no se habían observado anteriormente. Esto muestra que la población de *V. parahaemolyticus* en mariscos es muy diversa en la región de Puerto Montt.

La epidemiología de los brotes causados por *V. parahaemolyticus* en la región de Puerto Montt se muestra variable. Han habido aproximadamente 1500 y 3600 casos reportados en el 2004 y 2005, respectivamente (González-Escalona y col., 2005) y en el 2006, sólo 900 (Fuenzalida y col., 2006). En el verano del 2007 los casos disminuyeron a 475 (Harth y col., manuscrito). Esta baja en los brotes probablemente se ha debido a la disminución en el consumo de mariscos crudos a causa de campañas de salud pública, aunque también podría contribuir la posible disminución en la presencia de la cepa pandémica virulenta en los mariscos sugerida por nuestros resultados. Sin embargo, esta tendencia podría cambiar debido a la dispersión y virulencia de cepas patógenas emergentes.

La alta transferencia lateral sugerida por las observaciones de los *rrs* parece haber tenido una consecuencia en la generación de nuevas cepas patógenas. Durante el brote del 2007, paralelamente a la disminución de los casos clínicos, se observó la aparición de nuevas cepas no pandémicas en muestras clínicas y la aparente disminución en la abundancia de la cepa pandémica en mariscos. El porcentaje de casos clínicos causados por la cepa pandémica disminuyó de 100, en años anteriores, a 71% el 2007. Cuatro cepas clínicas, no observadas anteriormente, fueron obtenidas en los aislados de este año; entre ellas, un grupo representando el 13% de los casos clínicos, observándose que la cepa tipo de este grupo (PMC38.7) tiene genes prácticamente idénticos a los contenidos en la isla de patogenicidad de la cepa pandémica. La presencia de genes idénticos en bacterias que difieren en sus genes "housekeeping" y en sus patrones

DGREA se explicaría por transferencia horizontal de la isla de patogenicidad desde la cepa pandémica a una bacteria indígena del mar.

Poco se conoce sobre el origen de los otros 3 grupos de aislados clínicos (PMC60.7, 1.5 o 53.7 y 75.7). El grupo 60.7 contiene *tdh* y *trh*, pero se ha visto que *tdh* sólo corresponde a una de las dos copias muy similares entre sí que tiene la cepa pandémica (*tdhA*). Las cepas de los grupos 1.5 y 75.7 carecen de ambos genes asociados a patogenicidad, pero el hallazgo de este tipo de aislados a partir de muestras clínicas no es inusual (Honda e Iida, 1993). Además la cepa clínica PMC75.7 contiene el gen *recA* cercanamente relacionado al de PMA339 (página web del MLST para *V. parahaemolyticus*: <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus>), un aislado ambiental que contiene genes del SSTT2. Sin embargo, esta observación debe ser analizada con cautela ya que existen reportes recientes indicando la posibilidad de que aislados clínicos que carecen de genes *tdh* y *trh* corresponden a cepas no virulentas que proliferan durante la infección con una cepa virulenta no observada (Bhoopong y col., 2007).

Los nuevos aislados clínicos no pandémicos probablemente pertenecieron a clones existentes en el ambiente, los cuales pudieron haber sufrido algunas modificaciones desconocidas que les permitieron aumentar su patogenicidad en humanos. PMC53.7, por ejemplo, corresponde al grupo DGREA 1.5, observado anteriormente en mariscos durante el brote del 2005. Probablemente los otros 3 grupos nuevos de aislados también estuvieron presentes en el ambiente pero en un número muy bajo que hizo imposible su detección.

Utilizando el análisis de secuencias de múltiples loci (MLST), podemos determinar la distancia evolutiva entre distintos aislados. En el caso de los aislados clínicos no pandémicos, se puede deducir que pertenecen a clones diferentes, con orígenes distintos al de la cepa pandémica. González-Escalona y col. (manuscrito) determinó que la recombinación era mayor que la mutación en 7 loci, en aislados clínicos y ambientales de *V. parahaemolyticus* distantemente relacionados. Asimismo, se encontraron casos de probable transferencia horizontal en 9 loci analizados para *V. cholerae* por Garg y col. (2003), donde en la mayoría de los casos el DNA adquirido provenía de otros vibrios. Según esto, PMC38.7 podría ser el representante de un nuevo clon de *V. parahaemolyticus* patógeno que es capaz de competir con otros clones en la naturaleza. Interesantemente, los 3 tipos de *rrs* encontrados en PMC38.7 corresponden a los 3 encontrados también en PMA339, un aislado ambiental obtenido el 2004. Sin embargo, ambos aislados pertenecen a grupos DGREA diferentes y es difícil hacer una interpretación simple de esta observación, como una posible transferencia directa de una a otra bacteria. En todo caso, esta observación parece reforzar la idea de la alta transferencia lateral en *V. parahaemolyticus* con la generación de nuevas cepas, en algunos casos patógenas como PMC38.7.

3. Caracterización de aislados clínicos no pandémicos.

3.1. Presencia de genes del SSTT2 en un aislado ambiental.

Se ha reportado que SSTT2 está presente sólo en aislados de origen clínico y *tdh*-positivos (Meador y col., 2007). Sin embargo, cuando analizamos un cierto número de aislados de distinto origen, encontramos que PMA339, aislado ambiental *tdh*-negativo, fue positivo a 13 genes del SSTT2. PMA339 no ha sido observado entre los aislados clínicos, lo que significaría el reporte del primer hallazgo de la presencia de genes del SSTT2 en una cepa ambiental. Según la secuencia obtenida desde los amplicones, es probable que los genes del SSTT2 de PMA339 hayan evolucionado independientemente en un tiempo considerable de aquellos en la cepa pandémica, debido al número de sustituciones nucleotídicas observadas (2% en promedio). A pesar de las diferencias los genes del SSTT2 de PMA339 están más relacionados a los genes del SSTT2 de *V. parahaemolyticus* (93 - 99% de identidad) que a aquellos recientemente encontrados en *V. cholerae* no O1/no O139 (80 - 84% de identidad) (Dziejman y col., 2005). Además el hecho de que PMA339 sea *tdh*-negativo, sugeriría que por ser móvil, *tdh* pudo haberse perdido de la isla. Aunque el grupo de genes del SSTT2 no está restringido a aislados del grupo pandémico, la aparente transferencia lateral del SSTT2- y eventualmente de la isla de patogenicidad- que corresponde a *V. parahaemolyticus* potencialmente patógenos, es de gran interés.

3.2. Presencia de la isla de patogenicidad en PMC38.7.

Estudios previos examinando la presencia de DNA específico de una cepa entre aislados patógenos de *V. cholerae*, han mostrado que la adquisición de genes que codifican factores de virulencia juega un rol importante en la emergencia de aislados pandémicos dentro de esta especie (O'Shea y col., 2004; Karaolis y col., 1998; Jermyn y Boyd, 2002). Según Bik y col. (1995), la emergencia de un nuevo serogrupo epidémico de *V. cholerae* O139 resultó de la transferencia horizontal desde el "cluster" O139 a una cepa del serogrupo O1.

La isla de patogenicidad HPI de *Yersinia pseudotuberculosis* es transferida con las regiones cromosomales flanqueantes, por lo tanto, su transferencia no está limitada al HPI sino que involucra grandes regiones cromosomales de al menos 46Kb en tamaño (Lesic y Carniel, 2005). Según los resultados obtenidos, este parece ser el caso de la isla de patogenicidad en PMC38.7, donde según las secuencias de los genes "housekeeping", la región cromosomal izquierda flanqueante a la isla que se identificó por secuenciación, correspondería a la misma secuencia en VpKX, sugiriendo que probablemente la isla ha sido transferida con segmentos cromosomales adyacentes. No podemos descartar, sin embargo, la posibilidad que las similitudes y diferencias en secuencias se debe a que la isla de patogenicidad comienza y termina en posiciones diferentes a las indicadas para VpKX por Hurley y col. (2006).

Se ha descrito que la transferencia de las islas de patogenicidad ocurre bajo condiciones específicas, que podrían ser cercanas a aquellas encontradas por estas

bacterias en sus nichos ecológicos naturales (Lesic y Carniel, 2005). El mecanismo que interviene en la posible transferencia horizontal de la isla de patogenicidad no se conoce, por lo que es importante continuar con este aspecto relevante en la evolución de *V. parahaemolyticus* patógenos, aunque la posibilidad que se debe a transducción es alta, a pesar de su gran tamaño.

4. Evolución de *V. parahaemolyticus* mediante transferencia génica horizontal.

Existe un considerable interés desde hace varios años en investigar cómo los patógenos bacterianos evolucionan. Por algún tiempo se ha reconocido que los plásmidos pueden llevar grupos de genes responsables de codificar un carácter de virulencia, y que estos grupos juegan un rol importante en la evolución de la patogenicidad (Winstanley y Hart, 2001). Las islas de patogenicidad extienden esta noción involucrando otras regiones de los genomas bacterianos. Tal es el caso de la isla de patogenicidad en el aislado PMC38.7, ejemplo de la evolución que puede sufrir una cepa indígena en su hábitat natural, por adquisición de la isla de patogenicidad desde una cepa pandémica. La estructura de las islas de patogenicidad y la localización de genes que codifican el aparato del SSTT, sugiere que los patógenos bacterianos de *V. parahaemolyticus* pueden, al igual que otros, evolucionar adquiriendo islas que codifiquen factores de virulencia mediante transferencia horizontal.

La heterogeneidad de los *rrs* en aislados ambientales es una característica evolutiva presente en la mayoría de los aislados de *V. parahaemolyticus*. En PMC38.7, aislado clínico con posible origen ambiental, las copias de los *rrs* muestran 3 distintas secuencias, las mismas que fueron reportadas en el aislado ambiental PMA339. Esta observación fortalece la idea de que han ocurrido eventos de transferencia horizontal en PMC38.7, uno de los cuales le habría permitido adquirir la isla de patogenicidad desde una cepa pandémica.

La adquisición de nuevas características asociadas a virulencia, como en el caso de *tdh* en PMC38.7 y PMC60.7, y algunas otras características desconocidas (como en PMC75.7), hacen que estos aislados se conviertan en nuevos clones con potencial patógeno. Bajo ciertas circunstancias, los genes asimilados y adquiridos recientemente, como parece ser el caso en PMC38.7, podrían ser expresados de manera satisfactoria. Si esta expresión contribuye al "fitness" de la bacteria (es decir, incrementa su capacidad para generar progenie, ya sea aumentando su potencial patogénico o su transmisión a un nuevo hospedero), ocurrirá una selección positiva que favorecerá a estas variantes. Este tipo de selección puede resultar en expansión clonal y conduciría a un incremento en la frecuencia de variantes conteniendo estos genes en la población (Gal-Mor y Finlay, 2006).

En su nicho ecológico natural, las cepas de *V. parahaemolyticus* están en estrecho contacto con varios otros microorganismos ambientales, dentro de los cuales están cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicos, y este nicho podría representar un

ambiente favorable para la transferencia génica horizontal. Por lo tanto, es importante monitorear la presencia de éstos y nuevos clones en futuros brotes de diarrea por *V. parahaemolyticus* asociada con el consumo de mariscos, para así entender un poco más sobre la evolución de estos patógenos en el ambiente.



CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas ambientales de *Vibrio parahaemolyticus* presentan polimorfismo a nivel de sus *rrs*, encontrándose que 62% de las cepas analizadas muestran esta característica. Asimismo, el patrón de polimorfismo es indistinguible dentro de aislados del mismo grupo DGREA.
2. Las diferentes secuencias *rrs* conservan la estructura característica de esa región. Esto se vería facilitado por un mecanismo de recombinación entre segmentos de *rrs* que han evolucionado independientemente en otras bacterias. Además, este tipo de recombinación entre estas secuencias ocurriría sólo entre los *Vibrio* spp.
3. La alta identidad de genes del SSTT2 y otros genes de la isla de patogenicidad entre PMC38.7 y VpKX, sugieren que han sido recientemente adquiridos desde la cepa pandémica.
4. Los genes examinados pertenecientes a la isla de patogenicidad están organizados en una sola estructura en PMC38.7, sugiriendo la presencia de la isla completa.
5. La transferencia horizontal entre genes *rrs*, así como de genes de virulencia, puede conducir a la generación de nuevas cepas, algunas con potencial patógeno dentro de la población de *V. parahaemolyticus*.

BIBLIOGRAFIA

- Achtmann M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A. y Carniel E. 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 96:14043-48.
- Amann G., Stetter K.O., Llobet-Brossa E., Amann,R. y Anton J. 2000. Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*. Extremophiles 4:373-76.
- Ansaruzzaman M., Lucas M., Deen J.L., Bhuiyan N.A., Wang X.Y., Safa A., Sultana M., Chowdhury A., Nair G.B., Sack D.A., von Seidlein L., Puri M.K., Ali M., Chaignat C.L., Clemens J.D. y Barreto A. 2005. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. J Clin Microbiol 43:2559-2562.
- Acinas S., Marcelino L., Klepac-Ceraj V. y Polz M. 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. J Bacteriol 186: 2629-2635.
- Arber W. 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. FEMS Microbiol 24:1-7.
- Asai T., Zaporjets D., Squires C. y Squires C.L. 1999. An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 96:1971-1976.
- Bag P.K., Nandi S., Bhadra R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Nishibuchi M., Hamabata T., Yamasaki S., Takeda Y. y Nair G.B. 1999. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. J Clin Microbiol 37:2354-7.
- Bej A.K., Patterson D.P., Brasher C.W., Vickery M.C., Jones D.D. y Kaysner C.A. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Methods 36:215-25.

- Beumer A. y Robinson J. B. 2005. A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71: 8301–04.
- Bik E.M., Bunschoten A.E., Gouw R.D. y Mooi F. 1995. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J* 14:209-216.
- Blum G., Ott M., Iischewski A., Ritter A., Imrich H., Tschäpe H. y Hacker, J. 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62: 606-614.
- Bhoopong P., Palittapongarnpim P., Pomwised R., Kiatkittipong A., Kamruzzaman M., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Ishibashi M. y Vuddhakul V. 2007. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients. *J Clin Microbiol* 45:1544-50.
- Boucher Y., Douady C.J., Sharma A.K., Kamekura M. y Doolittle W.F. 2004. Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among haloarchaeal rRNA genes. *J Bacteriol* 186:3980–90.
- Cannone J.J., Subramanian S., Schnare M.N., Collett J.R., D'Souza L.M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabusi L.V., Müller K.M., Pande N., Shang Z., Yu N. y Gutell R.R. 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3:2.
- Case R.J., Boucher Y., Dahllo I., Holmstro C., Doolittle W.F. y Kjelleberg S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* 73:278–88.
- Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D.M. y Tiedje J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDPII): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33: D294–D296.

Condon C., Philips J., Fu Z., Squires C. y Squires C.L. 1992. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. EMBO J 11:4175-85.

Condon C., Liveris D., Squires C., Schwartz I. y Squires C.L. 1995. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. J Bacteriol 177:4152-6.

Cordova J.L., Astorga J., Silva W. y Riquelme C. 2002. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997–1998 Chilean outbreak. Biol Res 35:433–40.

Chang B., Taniguchi H., Miyamoto H. y Yoshida S. 1998. Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. J Bacteriol 180:5094–01.

Chowdhury N. R., Chakraborty S., Ramamurthy T., Nishibuchi M., Yamasaki S., Takeda Y. y Nair G.B. 2000. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. Emerg Infect Dis 6:631-36.

Chowdhury A., Ishibashi M., Thiem V.D., Tuyet D.T., Tung T.V., Chien B.T., Seidlein L.L., Canh D.G., Clemens J., Trach D.D. y Nishibuchi M. 2004a. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. Microbiol Immunol 48:319-27.

Chowdhury N. R., Stine O.C., Morris J.G. y Nair G.B. 2004b. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 42:1280-82.

Davies, J. 1996. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiologia 12: 9-16.

Dorsch M., Lane D. y Stackebrandt E. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. Int. J Syst Bacteriol 42:58-63.

Dziejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M. Rahman

M.H., Heidelberg J.F., Decker J., Li L., Montgomery K.T., Grills G., Kucherlapati R. y Mekalanos J.J. 2005. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3465-70.

Espejo R. y Romero J. 1997. Bacterial Community in Copper Sulfide Ores Inoculated and Leached with Solution from a Commercial-Scale Copper Leaching Plant. *Appl Environ Microbiol* 63:1344-48.

Espejo R., Feijoo C., Romero J. y Vásquez M. 1998. PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rDNA complexity. *Microbiology* 144:1611-17.

Falkow S. 1996. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. En: Neidhardt, F.C (ed-in-chief) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC. American Society for Microbiology Press. pp 2723-29.

Feil E.J., Maiden M. C., Achtman M. y Spratt B. G. 1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* 16: 1496-02.

Feil E.J., Enright M.C. y Spratt B.G. 2000. Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 151: 465-9.

Feil E.J., Cooper J.E., Grundmann H., Robinson D.A., Enright M.C., Berendt T., Peacock S.J., Smith J.M., Murphy M., Spratt B.G., Moore C.E. y Day N.P. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 185:3307-16.

Figura N., Vindigni C., Presenti L. y Carducci A. 1998. New acquisitions in *Helicobacter pylori* characteristics. *Ital. J Gastroenterol Hepatol* 30:254-58.

Fuenzalida L., Hernández C., Toro J., Rioseco M., Romero J. y Espejo R. 2006. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ Microbiol* 8:675-83.

Fuenzalida L., Armijo L., Zabala B., Hernández C., Rioseco M.L., Riquelme C. y 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* 117:270-5.

Gal-Mor O. y Finlay B. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8:1707-19.

García-Martínez, J., Acinas S.G., Anton A.I. y Rodríguez-Valera F. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods* 36:55-64.

González-Escalona N., Cachicas V., Acevedo C., Rioseco M.L., Vergara J.A., Cabello F., Romero J. y Espejo R.T. 2005a. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* 11:129-31

González-Escalona N., Romero J. y Espejo R. 2005b. Polymorphism and gene conversion of the 16S rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol* 246:213-19.

González-Escalona N., Martínez-Urtaza J., Romero J., Espejo R.T., Jaykus L. y DePaola A. Molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by Multilocus Sequence Typing. Manuscrito enviado para publicación.

Gray M., Sankoff K. y Cedergren R. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: A global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 12:5837-52.

Groisman E.A. y Ochman H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87:791-794.

Gunderson J. H., Sogin M.L., Wollett G., Hollingdale M., Delacruz V.F., Waters A.P. y Mccutchan T.F. 1987. Structurally distinct, stage specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science* 238:933-37.

Gurtler V. y Stanisich V. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria

using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142:3-16.

Hacker J., Blum-Oehler G., Muhldorfer I. y Tschape H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23:1089-97.

Hacker J. y Kaper J.B. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641-79.

Hacker J. y Carniel E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO reports* 2: 376 – 81.

Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41:95-98.

Harth E., Romero J., Torres R. y Espejo R.T. 2007. Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among *Vibrio parahaemolyticus* 16S rRNA genes. *Microbiology* 153: 2640–47.

Harth E., Matsuda L., Hernández C., Rioseco M. L., Romero J., González-Escalona N., y Espejo R.T. Shifting Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks in Southern Chile. Manuscrito enviado para publicación.

Hashimoto J., Stevenson B. y Schmidt T. 2003. Rates and consequences of recombination between rRNA operons. *J Bacteriol* 185: 966–72.

Heitmann I., Jofré L., Hormázabal J., Olea A., Vallebuona C. y Valdés C. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev Chil Infect* 22: 131-40.

Honda T. e Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysin. *Rev Med Microbiol* 4:106-13.

Hurley C.C., Quirke A., Reen F.J. y Boyd E.F. 2006. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics* 7:104.

Hu H. y Ochi K. 2001. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol* 67:1885-92.

Iida T., Suthienkul O., Park K.S., Tang, G.Q., Yamamoto R.K., Ishibashi M., Yamamoto K. y Honda T. 1997. Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Med Microbiol* 46:639-45.

Jain R., Rivera M. y Lake J. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3801-06.

Jermyn W.S., Boyd E.F. 2002. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology* 148:3681-93.

Jiang S.C. y Paul J.H. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 64:2780-87.

Jolley K.A., Chan M.S. y Maiden M.C. 2004. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5:86.

Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B. y Reeves P.R. 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3134-39.

Kaysner C.A. y DePaola A. 2004. Bacteriological Analytical Manual Online. *Vibrio*. US Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition [WWW document]. URL <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>

Klappenbach J.A., Dunbar J.M. y Schmidt T.M. 2000. rRNA operon copy number

reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66:1328-33.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-20.

Laohaprertthisan V., Chowdhury A., Kongmuang U., Kalnauwakul S., Ishibashi M., Matsumoto C. y Nishibuchi M. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol Infect* 130:395-06.

Lesic B. y Carniel E. 2005. Horizontal transfer of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 187:3352-58.

Liao D. 2000. Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J Mol Evol* 51: 305-17.

Liu S., Hessel A. y Sanderson K. 1993. Genomic mapping with ICEu-I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6874-78.

Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M. y Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3140-45.

Maiden M.C. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:561-88.

Majewski J. y Cohan F.M. 1999. DNA sequence similarity requirements for interspecific recombination in *Bacillus*. *Genetics* 153:1525-33.

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. e Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743-9.

Matsumoto C., Okuda J., Ishibashi M., Iwanaga M., Garg P., Rammamurthy T., Wong

- H-C., DePaola A., Kim Y., Albert M. y 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* 38:578–85.
- Meador C.E., Parsons M.M., Bopp C.A., Gerner-Smidt P., Painter J.A. y Vora G.J. 2007. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol* 45:1133-9.
- Miragaia M., Thomas J.C., Couto I., Enright M.C. y de Lencastre H. 2007. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 189:2540-52.
- Morandi A., Zhaxybayeva O., Gogarten J.P. y Graf J. 2005. Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *J Bacteriol* 187:6561–64.
- Moreno C., Romero J. y Espejo R. 2002. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* 148: 1233-39.
- Nasu H., Iida T., Sugahara T., Yamaichi Y., Park K.S., Yokoyama K., Makino K., Shinagawa H. y Honda T. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J Clin Microbiol* 38:2156–61.
- Nei M. y Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5269–73.
- Nishibuchi M. y Kaper J.B. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun* 63:2093-9.
- Ochman H., Lawrence, J.G. y Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299-04.
- Okuda J., Ishibashi M., Hayakawa E., Nishino T., Takeda Y., Mukhopadhyay A., Garg

S., Bhattacharya S., Nair G. y 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* 35:3150-3155.

Olea A.M., González C, Chiu M, Vallebuona C, Labraña M. y Martiniello F. 2005. Brote de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Chile. *Revista Chilena Salud Pública* 9:51-3.

O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J., Morrissey J.P., O'Gara F., y Boyd E.F. 2004. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology* 150:4053-63.

Recht M., Douthwaite S. y Puglisi J. 1999. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 18:3133-38.

Sapag A., Vartikar J. y Draper D. 1990. Dissection of the 16S rRNA binding site for ribosomal protein S4. *Biochim Biophys Acta* 1050:34-37.

Sneath P.H. 1993. Evidence from *Aeromonas* for genetic crossingover in ribosomal sequences. *Int J Syst Bacteriol* 43:626-29.

Stevenson B.S. y Schmidt T.M. 1998. Growth rate-dependent accumulation of RNA from plasmid-borne rRNA operons in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180:1970-2.

Strätz M., Mau M. y Timmis K. 1996. System to study horizontal gene exchange among microorganisms without cultivation of recipients. *Mol Microbiol* 22:207-15.

Sumner J., DePaola A., Osaka K., Karunasager I., Walderhaug M. y Bowers J. 2001. Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Vibrio* spp. in seafood. Preliminary document ed. Vol. MRA 01/03/04, Joint FAO/WHO activities on risk assessment of microbiological hazards in foods. Rome: FAO, WHO.

Suthienkul O., Ishibashi M., Iida T., Nettip N., Supavej S., Eampokalap B., Makino M. y Honda T. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J Infect Dis* 172:1405–8.

Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0 *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.

Terai A., Baba K., Shirai H., Yoshida O., Takeda Y. y Nishibuchi M. 1991. Evidence for insertion sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among *Vibrio* species. *J Bacteriol* 173:5036–46.

Ueda K., Seki T., Kudo T., Yoshida T. y Kataoka M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol* 181:78–82.

Van de Peer Y. 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 Appl Biosci* 10:569–70.

Vakulenko S. y Mobashery S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16:430–50.

Walsh D.A., Baptiste E., Kamekura M. y Doolittle W.F. 2004. Evolution of the RNA polymerase B subunit gene (*rpoB*) in Halobacteriales: a complementary molecular marker to the SSU rRNA gene. *Mol Biol Evol* 21:2340–51.

Wang Y. y Zhang Z. 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology* 146:2845–54.

Wommack K. y Colwell R. 2000. Viroplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol Biol Rev* 64:69–114.

Wong H., Liu S., Wang T, Lee C., Chiou C., Liu D., Nishibuchi M. y Lee B. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol* 66:3981–86.

Yamaichi Y., Iida T., Park K.S., Yamamoto K. y Honda T. 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol* 31:1513-21.

Yap W.H., Zhang Z. y Wang Y. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J Bacteriol* 181:5201–5209.

ANEXO 1: Comparación de las secuencias de los segmentos variables de los rrs de *V. parahaemolyticus* con aquellas secuencias almacenadas en la base de datos de genes 16S rRNA (RDP, Ribosomal Data Project).

Aislado-banda PFGE	Secuencia rrs (5' - 3')	RDP probe match (hits/búsqueda total)	Especies
VpXX-AB	GTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTAT	<i>Vibrio</i> (78/638)	<i>Vibrio agarivorans</i> , <i>Vibrio natriegens</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio campbellii</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Vibrio qinhuangdaoara</i> (0 errors allowed)
ATA65-B1	GTAGTGTAGTTAATAGATGCATTAT	<i>Vibrio</i> (1/865)	<i>Vibrio proteolyticus</i> (0 error allowed)
22.5-B1	GTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTAT	<i>Vibrio</i> (6/865), <i>Beneckeia</i> (2/36), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (5/88)	<i>Vibrio midae</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio sp.</i> (0 error allowed)
337-B1	GTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTAC	<i>Vibrio</i> (4/865), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (3/88)	<i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> (0 error allowed)
19.5-B3	GTAGTGTGTTAATAGCTGCATTAT	<i>Vibrio</i> (2/865)	<i>Listonella pelagia</i> (0 error allowed)
3316-B1	GTAGTGTAGTTAATAGGCTGCATTAT	<i>Vibrio</i> (92/865), <i>Beneckeia</i> (8/36), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (14/88)	<i>Vibrio agarivorans</i> , <i>Vibrio natriegens</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio campbellii</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> (1 error allowed)
LIA138-B6	GTAGTGTAGTTAATAGCCTGCATTAT	<i>Vibrio</i> (78/635), <i>Listonella</i> (3/20), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (1/27)	<i>Vibrio agarivorans</i> , <i>Vibrio natriegens</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio campbellii</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Vibrio qinhuangdaoara</i> , <i>Vibrio sp.</i> (1 error allowed)

189-B3	GTGGGTAGTTAATAGCTGYATCAT	<i>Vibrio</i> (4/865), <i>Beneckeia</i> (1/36), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (2/88)	<i>Vibrio</i> sp. (0 error allowed)
45.5-B5	GTAGGTAGTTAATAGCTGMTTYRT	<i>Vibrio</i> (92/865), <i>Beneckeia</i> (12/36), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (17/88)	<i>Vibrio agarivorans</i> , <i>Vibrio natriegens</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio campbellii</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio fischeri</i> (1 error allowed)
VpD2-B1	GCGGGTACGTTAATAGCGTATTCGT	<i>Vibrio</i> (4/638)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio</i> sp. (0 errors allowed)
ATA65-B2	GCGGGTCGTTAATAGCGGGCTTGT	<i>Vibrio</i> (5/865), <i>Beneckeia</i> (1/36), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (4/88)	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio</i> sp. (0 error allowed)
339-B1	GCGGTGTCGTTAATAGCTGCATTGT	<i>Vibrio</i> (6/865), <i>Photobacterium</i> (54/255), <i>Beneckeia</i> (1/36), <i>Vibrionaceae</i> no clasificados (1/88)	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio</i> sp, <i>Photobacterium teignathi</i> , <i>Photobacterium</i> sp., <i>Photobacterium mandapamensis</i> , <i>Photococcus caeruleum</i> , <i>Vibrio</i> sp. (2 errors allowed)
189-B6	GCGGTGTTAATAGCTGCATCGT	<i>Vibrionaceae</i> no clasificados (1/27)	<i>Vibrio</i> sp (0 error allowed)
VpD1-B4	GAGGTAGTGTAAATAGCACTATCAT	<i>Vibrio</i> (9/638)	<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Vibrio ponticus</i> , <i>Vibrio</i> sp. (0 errors allowed)
16.5-B3	GTGGTAGTGTAAATAGCACTATCAT	<i>Vibrio</i> (21/635)	<i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio coralliilyticus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio</i> sp. (0 errors allowed)
2.5-B6	GTGGTAGTGTAAATAGCACTATTAT	<i>Vibrio</i> (26/865), <i>Photobacterium</i> (1/255)	<i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio coralliilyticus</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> (0 error allowed)

Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among *Vibrio parahaemolyticus* 16S rRNA genes

Erika Harth, Jaime Romero, Rafael Torres and Romilio T. Espejo

Correspondence
Romilio T. Espejo
respejo@inta.cl

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago 6903625, Chile

Vibrio parahaemolyticus is a marine bacterium bearing 11 copies of ribosomal operons. In some strains, such as RIMD2210633, the genome includes identical copies of 16S rRNA genes (*rrs*). However, it is known that other strains of the species, such as strains ATCC 17802 and RIMD2210856, show conspicuous intragenomic *rrs* heterogeneity. The extent and diversity of the *rrs* heterogeneity in *V. parahaemolyticus* were studied in further detail by characterization of the *rrs* copies in environmental isolates belonging to 21 different genotype groups. Thirteen of these groups showed intragenomic heterogeneity, containing altogether 16 sequences differing within a 25 bp segment of their *rrs*. These sequences grouped into four clusters differing in at least four nucleotide sites. Some isolates contained *rrs* alleles from up to three different clusters. Each segment sequence conserved the stem-loop characteristic of the 16S rRNA structure of this 25 bp sequence. The double-stranded stem sequence was quite variable, but almost every variation had a compensatory change to maintain seven to eight paired bases. Conversely, the single-strand loop sequence was conserved. The results may be explained as a consequence of recombination among *rrs* evolving in different bacteria. The results suggest that intergenomic *rrs* recombination is very high in *V. parahaemolyticus* and that it occurs solely among *Vibrio* species. This high *rrs* homologous intergenomic recombination could be an effective mechanism to maintain intragenomic *rrs* cohesion, mediating the dispersal of the most abundant *rrs* version among the 11 intragenomic loci.

Received 1 September 2006

Revised 20 April 2007

Accepted 3 May 2007

INTRODUCTION

Many bacteria possess more than one and up to 15 copies of the 16S rRNA gene (*rrs*) (Acinas *et al.*, 2004). It is believed that the different copies do not differentiate and evolve in concert, from the existence of a mechanism called gene conversion (Liao, 2000). However, in some isolates from several species, one or more of the multiple intragenomic *rrs* loci may differ substantially from the rest, and their presence is considered to be due to homologous recombination with related bacteria (Morandi *et al.*, 2005; Sneath, 1993; Ueda *et al.*, 1999; Yap *et al.*, 1999). *Vibrio parahaemolyticus* is one of the bacterial species with a larger number of rRNA operons (*rrn*). This species encompasses different marine bacterial groups, including some human pathogens responsible for outbreaks of diarrhoea related to seafood consumption. The genome of strain RIMD2210633 of *V. parahaemolyticus*

(VpKX) consists of two circular chromosomes containing 11 *rrn* copies: 10 on chromosome 1 and one on chromosome 2 (Makino *et al.*, 2003). Examination of the sequence of each operon shows that they contain almost identical *rrs* alleles. However, other strains of *V. parahaemolyticus*, strains ATCC 17802 (VpD) and RIMD2210856 (VpAQ), show *rrs* intragenomic heterogeneity (González-Escalona *et al.*, 2005b; Moreno *et al.*, 2002). Strain VpD contains two classes of *rrs* (Moreno *et al.*, 2002), differing at 10 nucleotide sites within a 25 bp segment. This segment encodes a hypervariable stem-loop of the 16S rRNA which includes nucleotides 455–479 (*Escherichia coli* numbering). Seven operons contain *rrs* alleles with one of the sequences and four contain the other (González-Escalona *et al.*, 2005b). One of these segments differs at seven nucleotide sites from the corresponding segment in strain VpKX and the other differs at 10. Strain VpAQ contains some *rrs* alleles with the sequence observed in VpKX, and others with a unique sequence that differs from the two found in VpKX and VpD (González-Escalona *et al.*, 2005b; Moreno *et al.*, 2002). However, despite the large sequence differences, every segment conserves the stem-loop structure

Abbreviations: DGREA, direct genome restriction enzyme analysis; RDP, Ribosomal Database Project.

The GenBank/EMBL/DBJ accession numbers for the *rrs* sequences of *V. parahaemolyticus* are DQ 868329–DQ 868341.

characteristic of this region in the rRNA. The large number of mismatches, together with compensating changes to conserve the stem structure in the rRNA, implies that their divergence is relatively ancient, and hence it is difficult to accept that they evolved in the same cell over such a long period. The most plausible explanation is that the differences were caused by recombination with *rrs* alleles that evolved in different bacterial strains, as originally proposed by Sneath for bacteria of the genus *Aeromonas* (Morandi *et al.*, 2005; Sneath, 1993). Lateral gene transfer in *V. parahaemolyticus* may be augmented by the high levels of bacteriophage transduction that occur in seawater (Beumer & Robinson, 2005; Jiang & Paul, 1998). Here, we report the extent and diversity of the intragenomic *rrs* heterogeneity in different groups of *V. parahaemolyticus* obtained from seafood samples during outbreaks in the austral summers of 1998, 2004 and 2005 in Chile (Fuenzalida *et al.*, 2006; González-Escalona *et al.*, 2005a). Our data suggest high intergenomic *rrs* recombination between *Vibrio* species that could have important consequences for the evolution of the species.

METHODS

Bacterial strains. *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 (VpKX) was obtained from the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan. *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (VpD) was obtained from the American Type Culture Collection. The Chilean non-pandemic strains PMA37.5, PMA112, PMA3.5, PMA339, PMA337, PMA189, PMA16.5, PMA2.5, PMA79, PMA3316, PMA45.5, PMA27.5, PMA1.5, PMA19.5, PMA22.5 and PMA109.5 were obtained from shellfish samples taken during outbreaks that occurred in 2004 and 2005. Each of these isolates corresponds to the type isolate of the 16 groups differentiated by direct genome restriction enzyme analysis (DGREA), as previously described (Fuenzalida *et al.*, 2006). Nine isolates from the outbreaks that occurred in 1998 (González-Escalona *et al.*, 2005b) were analysed by DGREA and divided into five groups. Representative isolates from each of these groups were chosen and they corresponded to isolates ATC230, ATC297, COA62, ATA65 and LIA138. The patterns of the 21 type isolates from each of the DGREA groups were analysed with GelCompar II (Applied Math), and their genetic distances were calculated on the basis of the number of bands shared between isolates. Similarity matrices were calculated by using the Dice coefficient, and clustering was achieved by using the unweighted pair group method with arithmetic mean.

***rrs* analyses.** Bacterial DNA was extracted from overnight cultures in Luria-Bertani broth/3% NaCl using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). The DNA concentration was estimated visually by comparison of the ethidium bromide-stained bands with a standard. PCR amplification of *rrs* was performed using approximately 10 ng per reaction tube, as previously described (Moreno *et al.*, 2002), and universal primers Eubac27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') to amplify 16S rDNA, and 357F (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3') and 518R (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3') to amplify the shorter fragments containing the variable region of the *rrs*. PCR products were assayed by electrophoresis and visualized as previously described (Moreno *et al.*, 2002).

Heteroduplex assay for *rrs* heterogeneity. Intragenomic *rrs* heterogeneity was tested by examining the formation of heteroduplexes after PCR amplification of the 16S rDNA, as described

previously (Espejo *et al.*, 1998). Formation of heteroduplexes occurs when the amplicons contain mismatches within a short segment. In this case, heteroduplexes were formed between *rrs* amplicons from different *rrs* alleles that differed in sequence. These amplicons hybridized when the temperature was decreased for primer annealing after melting during the last PCR cycle. As a consequence of the mismatches, these hybrids showed retarded electrophoretic migration in polyacrylamide gels.

***rrs* sequencing.** For direct sequencing of the products, these were purified with the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and sequenced at Macrogen, Korea. DNA sequences were analysed individually and manually assembled. The alignments and sequence similarities were obtained using BioEdit (Hall, 1999). For sequencing of individual *rrs* alleles, the *rrs* in different restriction fragments were separated by PFGE, as described previously (González-Escalona *et al.*, 2005b), before PCR amplification. Sequencing took place as described for the whole PCR product. Briefly, bacterial genomic DNA in agarose plugs was prepared as described by Iida *et al.* (1997) and digested with the restriction enzyme *I-CeuI* (New England Biolabs) for 16 h at 37 °C, using 50 U enzyme per plug. Electrophoresis was performed on a CHEF-DRII system (Bio-Rad Laboratories) using a 1% low-melting-point agarose (Promega) gel in 0.5× TBE buffer (0.45 mM Tris-borate, 1 mM sodium EDTA, pH 8.0). The pulsed time employed was 1–80 s ramp time at 200 V for 20 h at a constant temperature of 14 °C. After electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide for 30 min and photographed. Five or six of the observed bands with larger migration distances were then excised from the gel with sterile razors, and a slice of each band was then melted at 65 °C in twice its volume of 1× TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA-NaCl, pH 8.0). A 10 µl sample of the solution containing DNA from each band was then used for PCR, as described above. The products of the PCR were sequenced at Macrogen. For construction of the RFLP-PFGE dendrogram, bands with similar and different migration patterns were distinguished and identified by their relative migration in the gel. The generated data were used to construct a similarity matrix calculated using the Nei-Li coefficient (Nei & Li, 1979). Finally, this matrix was used to obtain the dendrogram by applying WPGM in Treecom (Van de Peer & De Wachter, 1994).

The presence of the different sequences in different bacterial taxonomic groups was tested using the probe match of the Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>) database and by restricting the search to sequences of isolates with more than 1200 sequenced nucleotides and sequence data containing the nucleotides 400–500 (*E. coli* numbering) (Cole *et al.*, 2005).

The model of 16S rRNA was obtained from Cannone *et al.* (2002) (<http://www.rna.cccb.utexas.edu/>).

RESULTS

Intragenomic *rrs* heterogeneity in *V. parahaemolyticus*

Intragenomic heterogeneity in the multiple *rrs* alleles of different *V. parahaemolyticus* isolates obtained from shellfish was analysed. These isolates have been classified in 21 groups by comparison of their DNA restriction fragment length patterns by DGREA (Fuenzalida *et al.*, 2006). Fig. 1 shows the DGREA patterns and the dendrogram illustrating the similarity of the clusters. Intragenomic heterogeneity was initially tested by examining the formation of heteroduplexes after PCR amplification of the 16S rRNA genes, as

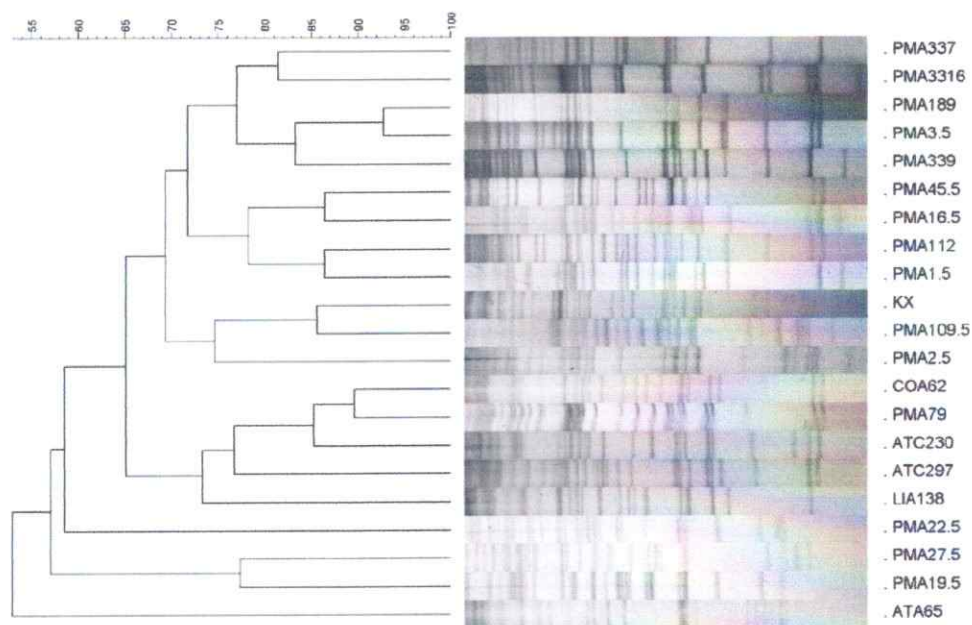


Fig. 1. DGREA of *V. parahaemolyticus* isolate types for every DGREA group observed in both clinical and shellfish samples collected in the summers of 1998, 2004, and 2005. Left of figure, dendrogram illustrating the clusters of the patterns by similarity. KX corresponds to the south-east pandemic strain RIMD2210633.

described in Methods. Only the type isolate from each of the 21 DGREA groups was tested at first. The formation of heteroduplexes was initially tested by PCR amplification of almost the complete *rrs* using the universal primers 27F and 1492R. Thirteen of the 21 isolates showed the characteristic heteroduplexes (results not shown). To determine if the heterogeneity occurred in nucleotides 455–479 (*E. coli* numbering) as observed for VpD (Moreno *et al.*, 2002), a shorter fragment of 161 bp encompassing this variable segment was amplified by PCR with primers 357F and 518R, and subsequently checked for formation of heteroduplexes (Fig. 2)



Fig. 2. PCR amplification products of the variable segment of the *rrs* of different *V. parahaemolyticus* isolates. The variable segments of a representative isolate from each DGREA group were PCR-amplified and separated by PAGE. VpKX, south-east pandemic strain RIMD2210633; VpD, species type strain ATCC 17802. All the other strains correspond to isolates from Chile. MW, BenchTop 100 bp Ladder (Promega).

(González-Escalona *et al.*, 2005b). By amplification of almost the whole *rrs*, formation of heteroduplexes was observed in the 13 isolates showing intragenomic heterogeneity, indicating that the heterogeneity was located in the same segment as that found in the heterogeneous strain VpD. The number of bands above the main lower band, corresponding to the homoduplex, reflected to some degree the extent of polymorphism and the number of different intragenomic *rrs* alleles (Espejo *et al.*, 1998). Examination of further isolates belonging to the more numerous DGREA groups showed that isolates from the same group shared the same heteroduplex pattern, suggesting that isolates from the same group had identical *rrs* heterogeneity. This analysis included seven isolates from group 2.5 and six from each of the groups 112 and 45 (results not shown). The high incidence of *rrs* polymorphism in isolates from shellfish was in agreement with our earlier observation that most strains of the genus *Vibrio* show intragenomic *rrs* polymorphism (Moreno *et al.*, 2002).

rrs sequences in *V. parahaemolyticus*

The sequences of heterogeneous segments were determined in each of the isolates representing each DGREA group. The sequences in isolates without *rrs* heterogeneity were directly determined in the PCR amplification product obtained from the bacterial DNA. To determine the sequences in isolates containing different *rrs* alleles, the different *rrn* operons were separated by cleavage of their

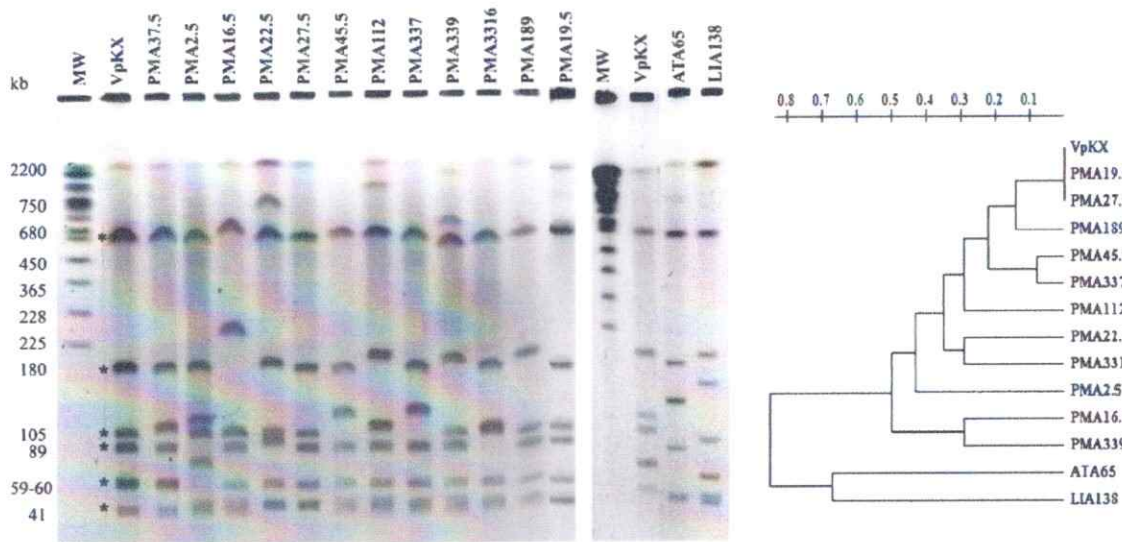


Fig. 3. PFGE-RFLP of DNA from VpKX and type isolates of the 13 *V. parahaemolyticus* DGREA groups with heterogeneous *rrs* digested with *I-CeuI*. The gel shows the same type isolates as those shown in Fig. 2. The dendrogram illustrating the PFGE-RFLP pattern clusters by dissimilarity is shown on the right. MW, genomic DNA of *Saccharomyces cerevisiae*.

genomic DNA with the restriction enzyme *I-CeuI* and subsequent PFGE (Fig. 3). *I-CeuI* cleaves a 19 bp sequence in the 23S rRNA gene (Liu *et al.*, 1993), generating fragments with a single *rrs*, except in those containing two adjacent *rrn* operons with opposite orientations. According to the genome sequence of VpKX (Makino *et al.*, 2003), *I-CeuI* generates 11 fragments. However, only six bands were sufficiently clear to be excised from the gel under the conditions employed. The expected sizes of these six fragments are indicated in Fig. 3 (bands marked by asterisks). The two smallest expected fragments of 5.2 and 5.6 kb ran off the gel. The two largest fragments of ~2 Mb were barely detectable in the upper part of the gel. The two expected fragments of 59 and 60 kb co-migrated in the gel. Due to the opposite orientations of two neighbouring operons (Makino *et al.*, 2003), one of the fragments of 2 Mb lacked *rrs*, while the fragment of 89 kb contained two *rrs*. Strain VpKX, isolates PMA19.5 and PMA27.5, which were readily discriminated by DGREA, showed identical *I-CeuI* restriction fragment patterns. Following separation of the fragments, the bands from 40 to 680 kb in size were excised from the gel, the *rrs* alleles were amplified, and the PCR products were sequenced. The sequences obtained for the eight monomorphic isolates (PMA37.5, PMA3.5, PMA79, PMA1.5, PMA109.5, ATC230, ATC297 and COA62) were identical to those found in the 11 *rrs* alleles of VpKX. According to their DGREA patterns, some of these isolates correspond to distant clades (Fig. 1). Interestingly, some monomorphic clades seemed to be closely related to clades with heterogeneous *rrs* (e.g. see clades PMA3.5 and PMA189). Sixteen different sequences or alleles were observed in the 13 isolates with heterogeneous *rrs* (Table 1). These 16

sequences clustered into four groups differing in at least four nucleotide sites. One group corresponded to sequences similar to those in VpKX. The other two groups showed sequences similar to those found in VpD, D1 and D2. The fourth group (ATA65-B2) contained a new set of sequences. Every sequence conserved the stem-loop structure characteristic of this 25 bp segment. The sequence forming the stem was very variable, but every variation had a compensatory change to maintain seven to eight paired bases (Fig. 4). Conversely, the sequence of the single-strand loop was conserved in every segment, except in segments PMA3316-B1 and LIA138-B6, in which it contained an additional nucleotide. Inclusion of this additional nucleotide in the single-stranded region was necessary to maintain the double-stranded secondary structure of the stem. Although these sequences differed in up to 12 of the 25 nucleotide positions, they were almost exclusively found in isolates of the genus *Vibrio* when searched in the RDP 16S rRNA database (Cole *et al.*, 2005). Table 1 also shows the number of hits obtained after searching each of the 25 bp sequences in the RDP database using the ProbeMatch tool. The percentage of the total hits corresponding to either bacteria of the family *Vibrionaceae* or of the genus *Vibrio* are shown in separate columns of Table 1.

Table 2 shows the distribution of the *rrs* alleles in VpKX and each of the 13 strains with *rrs* heterogeneity. To facilitate scrutiny, entries in Table 2 that contain sequences of different clusters have been differentiated by different typefaces. The degree of *rrs* intragenomic heterogeneity was variable, with some isolates containing *rrs* alleles from at least three different clusters (e.g. PMA189 and PMA112). Most polymorphic isolates contained *rrs* alleles differing

Table 1. *rrs* segment sequences in reference strains and isolates with heterogeneous *rrs*, and their frequencies in the RDP database

Segment sequences are identified by the name of the isolate in which they were found in greatest abundance; followed by the number assigned to the band containing that sequence. AB, all bands; Y, C/T; M, A/C; R, A/G.

Isolate-PFGE band*	Sequence of <i>rrs</i> variable segment	No. of hits†	Percentage hits	
			<i>Vibrionaceae</i> ‡	<i>Vibrio</i> §
VpKX-AB	GTAGTGTAGTTAATAG-CTGCATTAT	82	100	95
ATA65-B1-A.....	1	100	100
PMA22.5-B1	..G.....-.....	4	100	100
PMA337-B1-.....C	2	100	100
PMA19.5-B3C.....-.....	1	100	100
PMA3316-B1G.....	82 (1)	100	95
LIA138-B6C.....	82 (1)	100	95
PMA189-B3	..G.....-.....Y..C..	8 (1)	100	75
PMA45.5-B3-.....MT.YR.	85 (1)	100	92
VpD2-B1	.CG.GTAC.....-GTAT.CG.	4	100	100
ATA65-B2	.CG.C..C.....-G..G..G.	3	100	100
PMA339-B1	.CG....C.....-.....G.	31 (2)	100	6.5
PMA189-B6	.CG.....-.....CG.	1	100	0¶
VpD1-B4	.AG..AGT.....-ACT..C..	22 (1)	100	95.5
PMA16.5-B3	..G..AGT.....-ACT..C..	22 (1)	100	95.5
PMA2.5-B6	..G..AGT.....-ACT.....	22 (1)	100	95.5

*Designations in bold are the names assigned to the sequence group.

†Number of hits obtained after searching each of the 25 bp sequences over the RDP database using the ProbeMatch tool. Numbers in parentheses indicate the errors allowed in probe matching of the RDP. This error was only allowed when no match was obtained with the exact sequence.

‡Percentage of the total hits corresponding to bacteria of the family *Vibrionaceae*.

§Percentage of the total hits corresponding to bacteria of the genus *Vibrio*.

||*Photobacterium*=90%.

¶Unclassified *Vibrionaceae*=100%.

from four to 12 sites. In some cases, the sequence obtained from the amplicon of the PFGE band showed polymorphism for some sites, suggesting that it contained more than one sequence, probably two. Two *rrs* alleles in the same band could appear as a result either of the existence of adjacent *rrn* operons of opposite orientation in the genome or of co-migration of two restriction fragments. In these cases, only two bases were observed at each polymorphic site, and their presence could be explained by the occurrence of two *rrs* segment sequences, which is shown in Table 1. For example, the polymorphism found for band B1(40–50) of isolate PMA19.5 was explained by the presence of the two sequences ATA65B2 and D2.

To explore the homogeneity among isolates of the same DGREA cluster, a similar sequence-based analysis was done for two strains of clusters PMA2.5 and PMA45.5, and for one additional strain of cluster PMA112, all isolated from different samples. Only two fragments were sequenced on this occasion. This analysis showed that strains from the same DGREA cluster contained the same sequences as those found in the group type strain, but that these

sequences were not always present in the same restriction fragment (results not shown).

DISCUSSION

Our results show that the intragenomic *rrs* heterogeneity found in *V. parahaemolyticus* strains within the 25 bp stem-loop structure of the 16S rRNA is a characteristic of this species, as it was found in more than one-half of the genotypes examined. Two features of this 25 bp intragenomic and intergenomic variable segment, already reported in two other strains (VpD and VpAQ) (González-Escalona *et al.*, 2005b; Moreno *et al.*, 2002), were shown to be retained in two respects: (i) a highly variable sequence maintaining the secondary structure of the stem; and (ii) a conserved sequence of the single stranded loop. This overall conservation suggests that the segment may have an essential role in the functioning of the ribosome. One function reported for this segment is the requirement for a specific interaction between nucleotides 456–476 of the 16S rRNA of *E. coli* and protein S4, a

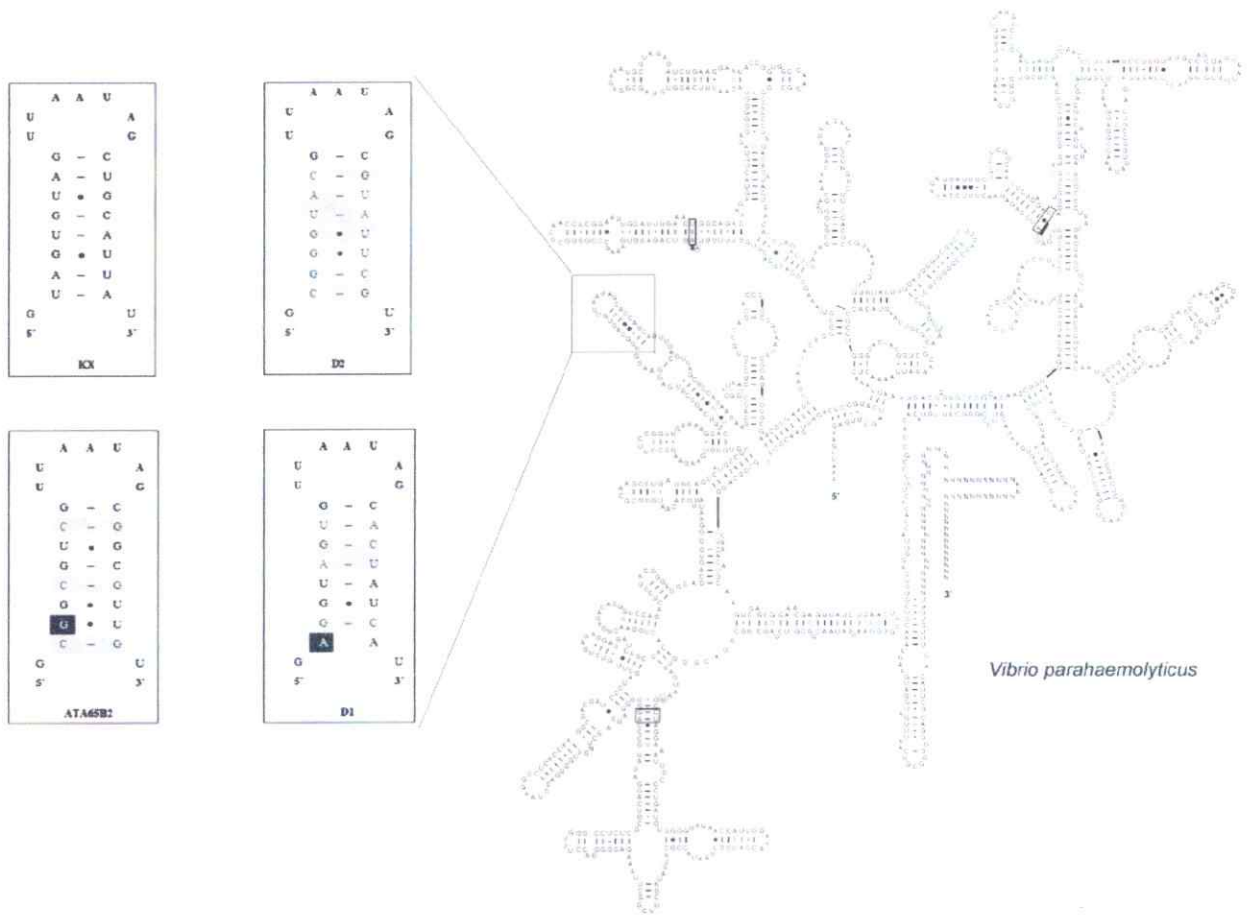


Fig. 4. 16S rRNA secondary structure of *V. parahaemolyticus* X56580 and secondary structures of the four main *rrs* sequences found in different environmental isolates of *V. parahaemolyticus*. Nucleotide changes accompanied by compensatory changes are shown in grey boxes and nucleotide changes without compensatory change are shown in black boxes.

ribosomal protein essential for ribosome assembly (Sapag *et al.*, 1990). Altogether, our results suggest that the stem sequence might be considered a neutral allele as long as the double-stranded structure is conserved. As previously stated for some *V. parahaemolyticus* strains and for other bacterial species, the accumulation of so many substitutions with compensating changes implies that the divergence of the different versions of these *rrs* segments is relatively ancient. It is likely that each version evolved in different bacteria and that assortment then took place by lateral gene transfer (González-Escalona *et al.*, 2005b; Morandi *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2002; Sneath, 1993; Yap *et al.*, 1999). The results reported here show that some *V. parahaemolyticus* strains can contain up to three *rrs* alleles differing in at least four nucleotide sites. The presence of several *rrs* alleles with so many differences in single isolates reinforces the idea that the assortment took place by acquisition from different bacterial clones. If *rrs* intragenomic heterogeneity is indeed generated by recombination, the high proportion of environmental

isolates with heterogeneity (62%) suggests that lateral transfer and recombination are frequent among *V. parahaemolyticus* bacteria. However, lateral transfer may have different effects on *rrs* intragenomic heterogeneity. The *rrs* composition observed within each DGREA cluster will be maintained as long as intergenomic recombination occurs among members of the same DGREA group. This is highly likely because bacteria in close proximity probably belong to the same clone and also because recombination is higher among identical genes (Majewski & Cohan, 1999). In this situation, lateral gene transfer could be a mechanism of concerted evolution of the 11 intragenomic *rrs* alleles if intergenomic recombination in *V. parahaemolyticus* is more frequent than mutation, as occurs in some other bacterial species (Feil *et al.*, 1999, 2000, 2001). An example is what could happen in a DGREA cluster with identical intragenomic *rrs*. In this case, intergenomic recombination with bacteria of the same clone would replace *rrs* containing mismatches generated by mutation with those containing the sequence prevailing in the population. However, there will be

Table 2. Sequences of *rrs* variable segments in different PFGE bands observed after hydrolysis of isolate DNA with restriction enzyme I-CeuI

KX corresponds to the sequence of the south-east pandemic strain RIMD2210633. The three groups of sequences differing from KX are indicated as follows: bold type, ATA65B2; italic bold type, VpD1; underlined bold type, VpD2.

Isolate	PFGE band (kb)					
	B1 (40–50)	B2 (51–85)	B3 (86–120)	B4 (104–170)	B5 (180–610)	B6 (540–630)
VpKX	KX	KX	KX	KX	KX	KX
PMA45.5	KX	KX	45.5B3	KX	KX	KX
PMA3316	3316B1	KX	LIA138B6	KX	KX	ND
PMA2.5	KX	KX	KX	KX	KX	2.5B6
PMA337	337B1	3316B1	337B1	KX	KX	16.5B3
LIA138	KX	KX	<u>D2</u>	KX	KX	LIA138B6
PMA22.5	22.5B1	KX	22.5B1	<u>D2</u>	22.5B1	ND
PMA27.5	KX	KX	KX	16.5B3	KX	LIA138B6
PMA189	KX/22.5B1	16.5B3	189B3	16.5B3	KX	189B6
PMA19.5	ATA65B2/D2	KX	19.5B3	KX	ATA65B2	ND
PMA112	16.5B3	16.5B3	KX	16.5B3	LIA138B6	189B6
PMA339	339B1	339B1	KX/339B1	KX	16.5B3	339B1
ATA65	ATA65B1	ATA65B2	ATA65B2	ATA65B2	ATA65B2	ND
PMA16.5	ATA65B2	KX	16.5B3	16.5B3	ATA65B2	16.5B3
VpD	<u>D2</u>	<u>D2</u>	<u>D1/D2</u>	<u>D1</u>	<u>D1</u>	<u>D1</u>

instances of intergenomic recombination between bacteria of different clones containing different *rrs* that will cause the emergence of variants. These variants would destroy the coherence of the DGREA clusters unless these clusters correspond to ecotypes and coherence is recovered by periodic selection.

Our results also reinforce previous observations with the *rrs* sequences of two *V. parahaemolyticus* strains; this putative intergenomic *rrs* recombination seems to occur almost exclusively between bacteria of the same genus, since all the sequences observed have rarely been reported in bacteria outside the genus *Vibrio*. Although other mechanisms cannot be rejected, it is likely that intergenomic *rrs* recombination is mediated by bacteriophages. Indeed, bacteriophages that transduce genes to *V. parahaemolyticus* have been isolated from the sea (Chang *et al.*, 1998), in which transduction seems to occur abundantly (Jiang & Paul, 1998). Additionally, it has been demonstrated that some marine phages can harbour 16S rRNA genes (Beumer & Robinson, 2005).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank N. González-Escalona for his valuable comments and suggestions on the original manuscript. This work was partially supported by grant FONDECYT 1040875.

REFERENCES

Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. & Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* **186**, 2629–2635.

Beumer, A. & Robinson, J. B. (2005). A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8301–8304.

Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L. V. & other authors (2002). The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* **3**, 2.

Chang, B., Taniguchi, H., Miyamoto, H. & Yoshida, S. (1998). Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. *J Bacteriol* **180**, 5094–5101.

Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M. & Tiedje, J. M. (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **33**, D294–D296.

Espejo, R. T., Feijoo, C. G., Romero, J. & Vasquez, M. (1998). PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rDNA complexity. *Microbiology* **144**, 1611–1617.

Feil, E. J., Maiden, M. C., Achtman, M. & Spratt, B. G. (1999). The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* **16**, 1496–1502.

Feil, E. J., Enright, M. C. & Spratt, B. G. (2000). Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **151**, 465–469.

Feil, E. J., Holmes, E. C., Bessen, D. E., Chan, M. S., Day, N. P., Enright, M. C., Goldstein, R., Hood, D. W., Kalia, A. & other authors (2001). Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 182–187.

Fuenzalida, L., Hernandez, C., Toro, J., Riaseco, 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**, 675–683.

- González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M. L., Vergara, J. A., Cabello, F., Romero, J., Espejo, R. T. & other authors (2005a). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* **11**, 129–131.
- González-Escalona, N., Romero, J. & Espejo, R. T. (2005b). Polymorphism and gene conversion of the 16S rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 213–219.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Iida, T., Suthienkul, O., Park, K. S., Tang, G. Q., Yamamoto, R. K., Ishibashi, M., Yamamoto, K. & Honda, T. (1997). Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Med Microbiol* **46**, 639–645.
- Jiang, S. C. & Paul, J. H. (1998). Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2780–2787.
- Liao, D. (2000). Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J Mol Evol* **51**, 305–317.
- Liu, S. L., Hessel, A. & Sanderson, K. E. (1993). Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6874–6878.
- Majewski, J. & Cohan, F. M. (1999). DNA sequence similarity requirements for interspecific recombination in *Bacillus*. *Genetics* **153**, 1525–1533.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M. & other authors (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**, 743–749.
- Morandi, A., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P. & Graf, J. (2005). Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *J Bacteriol* **187**, 6561–6564.
- Moreno, C., Romero, J. & Espejo, R. T. (2002). Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* **148**, 1233–1239.
- Nei, M. & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5269–5273.
- Sapag, A., Vartikar, J. V. & Draper, D. E. (1990). Dissection of the 16S rRNA binding site for ribosomal protein S4. *Biochim Biophys Acta* **1050**, 34–37.
- Sneath, P. H. (1993). Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 626–629.
- Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T. & Kataoka, M. (1999). Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol* **181**, 78–82.
- 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 Appl Biosci* **10**, 569–570.
- Yap, W. H., Zhang, Z. & Wang, Y. (1999). Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J Bacteriol* **181**, 5201–5209.

Edited by: D. M. Gordon

Emerging Infectious Diseases

EMERGING INFECTIOUS DISEASES®

Shifting Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks in Southern Chile

Journal:	<i>Emerging Infectious Diseases</i>
Manuscript ID:	EID-07-1269
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	01-Oct-2007
Complete List of Authors:	Harth, Erika; INTA, U.Chile, Biotechnology Matsuda, Luis; INTA, U.Chile, Biotechnology Hernandez, Cristina; Laboratory of Bromatology, Autoridad Sanitaria Region X Rioseco, Maria; Hospital Regional Romero, Jaime; INTA, U.Chile, Biotechnology González-Escalona, Narjol; North Carolina State University, Department of Food Science Espejo, Romilio; INTA, U.Chile, Biotechnology
Keywords:	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , shellfish, Chile, outbreaks, lateral transfer



1 **Shifting Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks in Southern Chile**

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Erika Harth^a, Luis Matsuda^a, Cristina Hernández^b, M. Luisa Rioseco^c (M.D), Jaime
2 Romero^a (Ph.D.), Narjol González-Escalona^d (Ph.D.), and Romilio T. Espejo^{a*}

3
4
5
6
7 ^a Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Líbano
8 5524, Macul, Santiago 6903625, Chile. ^b Laboratorio del Ambiente Llanquihue, Secretaría
9 Regional Ministerial de Salud, O'Higgins 276, Puerto Montt. ^c Hospital Regional de Puerto
10 Montt, Seminario s/n, Puerto Montt, Chile. ^d Department of Food Science, North Carolina
11 State University, Raleigh, USA.

12
13
14 *: Corresponding author: Phone: 56-2-9781426; fax: 56-2-2214030; email address:
15 respejo@inta.cl (R.T. Espejo).

16
17
18 Word counts for the abstract: 126

19 Word counts for the body of the text: 2852

1
2
3 **1 Abstract**
4

5
6 2

7
8 3 Disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* in the region of Puerto Montt, Chile,
9
10 4 began in 2004 and reached a peak in 2005 with 3600 clinical cases. Until 2006, every
11
12 5 analyzed case was caused by the serovar O3:K6 pandemic strain. In the summer of 2007,
13
14 6 there were only 475 reported cases and 71% corresponded to the pandemic strain. A new
15
16 7 clinical strain, associated with 13% of the cases, was genotypically different from the
17
18 8 pandemic strain but contained genes that were identical to those found in its pathogenicity
19
20 9 island. This and other findings strongly suggest that the pathogenicity- related genes were
21
22 10 laterally transferred from the pandemic strain to one of the different *V. parahaemolyticus*
23
24 11 groups composing the diverse and shifting bacterial population in the shellfish of this
25
26 12 region.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **17 Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*; shellfish; Chile; outbreaks; lateral transfer
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **20 Article Summary Line:** *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in southern Chile are
51
52 21 declining while the main etiological strain is being replaced by new strains that probably
53
54 22 acquired pathogenic genes by lateral transfer from the pandemic strain.
55
56
57
58
59
60

1. Introduction

In 1998, in Antofagasta, Chile (23°39'S 70°24'W), approximately 300 clinical cases from seafood consumption-related outbreaks were reported (1). Outbreaks practically disappeared from this region after 1998. From 2004 to 2007, approximately 7,000 cases were reported farther south in Puerto Montt (41°29'S 72°24'W) (2-5). However, the outbreaks are in decline; there were approximately 1500, 3600, 900, and 475 cases in 2004, 2005, 2006, and 2007, respectively (6); <http://epi.minsal.cl/epi/html/Actualidad/Vibrio.htm>). Until 2006, almost 100% of the cases analyzed were caused by a clonal group originally observed in Southeast Asia in 1996 (7). This was known as the *V. parahaemolyticus* pandemic strain because it was dispersed throughout the oceans causing outbreaks worldwide. This group is characterized by belonging to the O3:K6 serovar, although a large number of serovariants has emerged since 1996 (8). They also possess the sequences corresponding to genes *toxRS/new* (9), *orf8* (10), and *tdh* and lack *trh* gene.

Genome sequencing of the RIMD2210633 strain revealed that it has two sets of gene clusters that encode the type III secretion system (TTSS) apparatus (11). The TTSS apparatus is used by several gram-negative pathogenic bacteria to secrete and translocate virulence factor proteins into the cytosol of eukaryotic cells (12). TTSS1 is involved in cytotoxicity against HeLa cells and TTSS2 is involved in the enterotoxic activity in a rabbit ileal loop test (13). The first cluster is located on the large chromosome and the second is on the small chromosome. This last cluster contains two copies of genes for TDH and it is within a pathogenicity island probably obtained by recent lateral transfer (11). TTSS2 has been found only in strains showing β -type hemolysis on a specialized blood agar medium called Wagatsuma agar (11). This hemolysis is called the Kanagawa phenomenon and it is

1 considered to be a good marker of pathogenic strains. Recently, TTSS genes related to the
2 TTSS2 cluster were described in clinical and environmental non-O1, non-O139 *V. cholerae*
3 strains (14).

4 The clonal nature of the pandemic *V. parahaemolyticus* isolates from throughout the
5 world was ascertained by the similarity of the patterns obtained by genome restriction
6 fragment length polymorphism-pulsed field gel electrophoresis (RFLP-PFGE)(15),
7 arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) (7;9), direct genome restriction
8 enzyme analysis (DGREA) (4), and multilocus sequence typing (MLST) (16). The
9 pandemic strain is, however, a minor fraction of a diverse and shifting *V. parahaemolyticus*
10 population found in shellfish of the region of Puerto Montt (2). In an effort to understand
11 the epidemiology of these outbreaks, we studied *V. parahaemolyticus* isolates recovered
12 from clinical cases and shellfish during the summer of 2007. Our results indicate the
13 emergence of new pathogenic *V. parahaemolyticus* groups that were probably generated by
14 gene lateral transfer and suggest that the decrease in the number of clinical cases may be
15 due to the diminution of the *V. parahaemolyticus* pandemic group in the regional seafood.

2. Methods

Strains. V. parahaemolyticus RIMD 2210633 (VpKX) and RIMD 2210086 (Vpl) were obtained from the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan. The Chilean environmental strains (PMA79, PMA112, PMA189, PMA337, PMA339, PMA3316, PMA1.5, PMA2.5, PMA19.5, PMA22.5, PMA27.5, PMA13.6, PMA34.6, PMA36.6, PMA40.6) were obtained from shellfish samples taken during outbreaks that occurred from 2004 to 2006 and were previously described (4). PMA1.7, PMA11.7, and PMA21.7 were from shellfish collected in the summer of 2007. PMC38.7, PMC60.7, PMC53.7 and PMC75.7 were from clinical samples. Each of these isolates corresponds to the type isolate of the 23 groups differentiated by DGREA as previously described (4) and reported in this paper.

Analysis. Samples of clinical cases and shellfish were obtained and analyzed as previously described (4). Isolation, growth, and characterization of the isolates, including their DGREA pattern, were performed as previously described (4). Each of the DGREA patterns found in 2007 was compared to those described in previous years and when similarities were observed their identity was checked by electrophoresis.

PCR amplification of the different targets was performed using 1/10 dilutions of DNA extracted as described for DGREA analysis. *tdh* was amplified as described by Bej et al (17); T3SS2 genes (VPA1335, VPA1338, VPA1339, VPA1341, VPA1342, VPA1346, VPA1349, VPA1354, VPA1355, VPA1362, and VPA1367) were amplified using the primers described for microarray by Meador et al (18) at 61°C. Genes VPA1321 and VPA1376 located at the extremes of the island were amplified with primers designed using Primer3 program (<http://primer3.sourceforge.net>). The sequences of these primers were:

VPA1321f: 5'-TGACATGCACGGCAATAGAT-3', VPA1321r: 5'-

1 ACAGAGTTGGTTTCGCAGGT-3', VPA1376 f: 5'-CATCGAGCGATCTTTCACAA-3'
2 and VPA1376r: 5'-ACCGGTTTCCAACCTTCTCT-3'. Housekeeping genes for MLST
3 (MLST scheme developed by Narjol Gonzalez-Escalona) were amplified using the primers
4 described in the *Vibrio parahaemolyticus* MLST website
5 (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus>) developed by Keith Jolley and sited at the
6 University of Oxford (19).

7 PCR products were purified with either Wizard SV Gel or PCR Clean-Up System
8 (Promega, USA) and sequenced in both directions by Macrogen (South Korea) or by
9 MCLAB (South San Francisco, CA, USA) employing forward and reverse amplification
10 primers or primers M13F and M13R (MLST loci). DNA sequences were analyzed
11 individually and manually assembled. The alignments and sequence similarities were
12 obtained using BioEdit (20). The sequences obtained were deposited in GenBank
13 (accession numbers awaited)

14 Amplification and sequencing of the variable region of the 16S rRNA (*rrs*) between
15 nucleotides 357-518 (*E. coli* numbering) were performed as previously described (21). This
16 consisted of the separation of the individual *rrs* alleles in PMC38.7 by PFGE and PCR
17 amplification of the variable region in excised bands as described previously (22).

1 3. Results

2 3.1. *V. parahaemolyticus* associated with clinical cases 2007.

3 *V. parahaemolyticus* isolates from 38 diarrhea cases from the summer of 2007 in the
4 Puerto Montt region were analyzed and grouped according to the presence of the genetic
5 markers (*orf8*, *toxRS/new*, *tlh*, *tdh*, *trh*) and the distinctiveness of their DGREA patterns
6 (Table 1, Fig. 1). One isolate from each patient was characterized. Isolates from 27 cases
7 (71%) corresponded to the serovar O3:K6 pandemic clonal group, a percentage
8 significantly lower than the 100% observed in previous summers (4). The isolates from the
9 other eleven cases lacked the characteristic markers of the pandemic strains, i.e., *orf8* and
10 *toxRS/new* and consisted of four DGREA groups. One of these groups contained 5 *tdh*-
11 positive isolates (13% of the cases). A second group contained 4 isolates positives for both
12 *tdh* and *trh* genes (11%). The other two groups contained one isolate each and both were
13 negative for these two markers (Table 1). A single isolate chosen as the type strain of each
14 group was typed by MLST. MLST sequence type corresponded with groups determined by
15 the other analyzed properties (Table 1).

16 3.2 Characterization of the non- pandemic clinical strains.

17 Strains positive for *tdh*, other than the pandemic strain, had not been isolated from
18 clinical cases in Puerto Montt during the three previous summer outbreaks. Since, it has
19 been reported that this gene may be spread by insertion sequence-like elements (ISVs) (23,
20 24). The possibility that the *tdh* found in non-pandemic strains was derived from the
21 pandemic strain was explored. The PCR amplicons of the *tdh* gene of the two non-
22 pandemic groups was sequenced in isolates designated as type strains for each group:
23 PMC60.7 for the group containing both *tdh* and *trh* and PMC38.7 for that containing only
24 *tdh*. The amplicon of isolate PMC60.7 showed an identical sequence to that reported for

1 *tdhA* except for a single nucleotide (11). On the other hand, PMC38.7 showed an identical
2 sequence to that expected for a mixture of the two *tdh* genes present in VpKX. These two
3 genes differ slightly and the mixture of their PCR products should show polymorphism in
4 definite sites (11). This observation suggested the presence in PMC38.7 of genes *tdhS* and
5 *tdhA* with identical sequence to those found in the pandemic strain. Since these two genes
6 are located close to each end of the pathogenicity island in chromosome 2 of the pandemic
7 *V. parahaemolyticus* (11), the presence of the whole island was explored by PCR
8 amplification of 11 genes of the TTSS2, located in the island, and also of genes VPA1321
9 and VPA1376 located at the extremes of the island close to *tdhA* and *tdhS*, respectively.
10 Each tested gene was found in the PMC38.7 strain and the sequences of their PCR products
11 were identical to those reported for the pandemic strain genes, except for a single
12 nucleotide in VPA1342. Serotyping of PMC38.7 indicated an O10:K20 serovar. Since
13 PMC38.7 is genetically very different from the pandemic strain (Table 1, Fig. 1), the high
14 homology of these genes suggested that the whole pathogenicity island had recently
15 transferred from the pandemic strain.

16 PMC38.7 also differs from the pandemic strain and most clinical isolates by the
17 presence of intragenomic heterogeneity among its multiple 16S rRNA genes, a feature
18 seldom observed in clinical isolates but frequently observed among environmental isolates.
19 This is probably caused by lateral transfer of the *rrs* (21). Three different *rrs*, with
20 sequences corresponding to *V. parahaemolyticus* groups, VpD1-B4, ATA65-B2, and
21 VpKX-AB (21), were observed in PMC38.7.

22 3.3 *V. parahaemolyticus* associated with shellfish.

23 There are a large number of *V. parahaemolyticus* environmental strains in the
24 Puerto Montt region. Only the pandemic strain was isolated from clinical samples before

1 and during the summer of 2006, but 20 different strains were isolated from shellfish during
2 that period (2). Characterization of 52 isolates from 20 shellfish samples during the summer
3 of 2007 indicated the presence of at least five different DGREA groups; three of them were
4 not previously observed (Table 2, Fig. 2). This raises the number of different strains found
5 in shellfish of the region to 23. Figure 3 shows the number of shellfish samples containing
6 each of the 23 DGREA groups found during the last four years, including the data from
7 summer, 2007 (2), and this paper. Only four of the 20 shellfish samples examined rendered
8 *tdh*-positive enrichment cultures, indicative of the presence of pathogenic strains;
9 nevertheless, no *tdh*-positive isolates were obtained from these enrichments after plating on
10 TCBS agar.

11 3.4. TTSS2 genes in other non-pandemic *V. parahaemolyticus* strains from Puerto Montt

12 Since as recently shown by meador et al., the possession of TTSS2 genes is not
13 exclusive of the pandemic strain (18), their occurrence in the other environmental and
14 clinical *V. parahaemolyticus* DGREA groups found in the region of Puerto Montt was
15 explored. Twenty strains corresponding to 18 environmental DGREA groups (PMA79,
16 112, 118, 189, 337, 339, 3316, 1.5, 19.5, 22.5, 27.5, 13.6, 34.6, 36.6, 40.6, 1.7, 11.7, and
17 21.7) and one strain from each of three new clinical groups (PMC60.7, 53.7 and 75.7)
18 found in Puerto Montt in 2007 were examined for the presence of the VPA1335 gene
19 (contained in the TTSS2) by PCR amplification. Among these, only strain PMA339,
20 isolated from shellfish in summer, 2004, was positive. PCR amplification of PMA339 for
21 the other genes in the pathogenicity island showed positive reactions for all the genes tested
22 in PMC38.7. Nevertheless, the sequences of the amplicons showed significant differences
23 from those found in PMC38.7 and reported in the pandemic strain genome. Dissimilarity
24 ranged from 0.6% for VPA1362 to 6.2% for VPA1346, with an average of 2.3% for all of

1 these genes. These differences indicate a much larger evolutionary distance between the
2 genes in PMA339 and in the pandemic strain than between PMC38.7 and the pandemic
3 strain.



1 4. Discussion

2 The epidemiology of outbreaks caused by *V. parahaemolyticus* in the Puerto Montt
3 region is changing. There has been a decrease in the number of clinical cases. The
4 occurrence of new pathogenic strains and an apparent decrease in the abundance of the
5 pandemic strain in shellfish were also observed. The percentage of clinical cases caused by
6 the pandemic strain decreased from 100% to 71% in 2007. Four clinical strains, not
7 previously observed, emerged; among these, one group representing 13% of the clinical
8 cases, with type strain PMC38.7, seems to have recently received the genes enclosed in the
9 pathogenicity island of the pandemic strains. The presence of these genes in bacteria
10 differing in the housekeeping genes and DGREA pattern is best explained by the transfer of
11 the pathogenicity island from the pandemic strain to a bacterium in the indigenous
12 population. The indigenous *V. parahaemolyticus* population in shellfish is very diverse and
13 the predominant strains seem to change every year. A detailed examination of the putative
14 genomic island in PMC38.7, its integration site, and its flanking regions, will probably help
15 to differentiate among the possible mechanisms of DNA transfer.

16 Additionally, the presence of the TTSS2 genes is not exclusive of the pandemic and
17 PMC38.7 strain; they were also found in an environmental isolate of *V. parahaemolyticus*
18 (PMA339). PMA339, however, has not been observed among clinical isolates. TTSS2
19 genes were found in other *V. parahaemolyticus* clinical strains (18) but this is the first
20 report of their presence in environmental strains. Though, according to the sequences
21 obtained from their amplicons, the TTSS2 genes in PMA339 seem to have independently
22 evolved from the pandemic strain over a considerable time. They are still more closely
23 related to the TTSS2 of *V. parahaemolyticus* than to those recently found in non-O1 or non-
24 O139 *V. cholerae* (14).

1 Little can be said about the origin of the other three clinical groups (60.7, 1.5, and
2 75.7). Group 60.7 contains *tdh* and *trh* but this *tdh* does not seem to derive from the
3 pandemic strain. Strains of groups 1.5 and 75.7 lack both pathogenicity-associated genes
4 but the finding of these types of isolates in patients is not unusual (25). It is worth
5 mentioning that PMC75.7, a clinical strain, contains a *recA* gene that is closely related to
6 that of PMA339, the environmental isolate containing TTSS2 genes (*Vibrio*
7 *parahaemolyticus* MLST website (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus>). However, In
8 view of recent reports (26), the possibility should be considered that the two clinical
9 isolates lacking *tdh* or *trh* genes correspond to non-virulent strains that proliferate during
10 infection with a virulent strain.

11 The abundance and frequency of occurrence of total and pandemic *V.*
12 *parahaemolyticus* seemed to be less in 2007 than in previous years. In 2006, 10 of 20
13 shellfish samples were positive for *tdh* after enrichment and *tdh*-positive isolates were
14 obtained from six samples after plating in TCBS agar (2). In 2007, only 4 of 20 samples
15 were positive and *tdh*-positive isolates were not recovered after plating on TCBS agar. The
16 observed decline in outbreaks is probably due to a decrease in raw seafood consumption
17 caused by the public health campaign and a decrease in the load of the highly virulent
18 pandemic strain in shellfish. However, this tendency could change according to the
19 dispersion and virulence of the emerging pathogenic strains.

1
2
3
4 **1 Acknowledgements**
5

6 2 It is a pleasure to acknowledge the serotyping of PMC38.7 kindly performed by Jaime
7
8 3 Martinez Urtaza. We thank Paulina Uribe, Gastón Higuera, Katherine García, and Beatriz
9
10 4 Zabala for their help in sample collection and isolation and characterization of bacterial
11
12 5 strains. E. Harth acknowledges a scholarship from Deutscher Akademischer Austausch
13
14 6 Diemst (DAAD). This work was supported in part by Grants from FONDECYT # 1040875
15
16 7 and #1070658.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

26
27 **10 Biographical Sketch**
28
29

30 11 Miss Erika Harth is a graduate student working for Ph D thesis in the Biotechnology
31
32 12 Laboratory at the Institute of Nutrition and Food Technology, University of Chile. Her
33
34 13 research interests include the epidemiology and evolution of pathogenic bacteria.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

- 1 Table 1. Properties of *V. parahaemolyticus* clinical isolates from summer, 2007, in Puerto
 2 Montt, Chile.

<i>V. parahaemolyticus</i> isolate	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	DGREA Group	MLST ST
PMC 50.7, 51.7, 55.7, 56.7, 58.7, 28.7, 29.7, 41.7, 42.7, 44.7, 59.7, 70.7, 72.7, 63.7, 64.7, 65.7, 66.7, 73.7, 1.7, 11.7, 14.7, 15.7, 16.7, 18.7, 19.7, 20.7, 22.7	+	+	-	+	+	VpKX	3
PMC 38.7, 47.7, 57.7, 68.7, 72.7	+	+	-	-	-	38.7	63
PMC 60.7, 25.7, 26.7, 27.7	+	+	+	-	-	60.7	64
PMC 53.7	+	-	-	-	-	1.5	28
PMC 75.7	+	-	-	-	-	75.7	65

3 ST: Sequence type. Sequences available at <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>

4 + presence, - absence

- 5 Table 2. Properties of *V. parahaemolyticus* isolates from shellfish from summer, 2007, in
 6 Puerto Montt, Chile.

<i>V. parahaemolyticus</i> isolate	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>	DGREA Group	MLST ST
PMA 4.7, 5.7, 6.7, 7.7, 8.7, 15.7, 16.7, 17.7, 19.7, 20.7, 22.7, 23.7, 24.7, 25.7, 26.7, 27.7, 28.7, 33.7, 37.7, 41.7, 42.7, 43.7, 47.7, 48.7, 49.7	+	-	-	ND	ND	34.6	ND
PMA 9.7, 10.7, 12.7, 14.7, 18.7, 38.7	+	-	-	ND	ND	118	10
PMA 1.7, 2.7, 3.7	+	-	-	ND	ND	1.7	ND
PMA 11.7, 13.7	+	-	-	ND	ND	11.7	ND
PMA 21.7	+	-	-	ND	ND	21.7	ND

7 ST: Sequence type. Sequences available at <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>

8 + presence, - absence. ND not done

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

1 **Figure Captions**

2

3 Fig. 1. Direct genome restriction enzyme analysis (DGREA) with *NaeI* of clinical isolates
4 representative of the 6 patterns observed during the outbreaks of January and February
5 2007 in Puerto Montt. MW, 100 bp size ladder; VpKX, O3:K6 southeast pandemic isolate.

6

7 Fig. 2. Direct genome restriction enzyme analysis (DGREA) with *NaeI* of *V.*
8 *parahaemolyticus* isolates from shellfish collected in the summer of 2007. The gel shows
9 representative strains for every observed pattern. Patterns of groups observed in previous
10 years are next to the type isolate of that group. MW, 100 bp size ladder

11

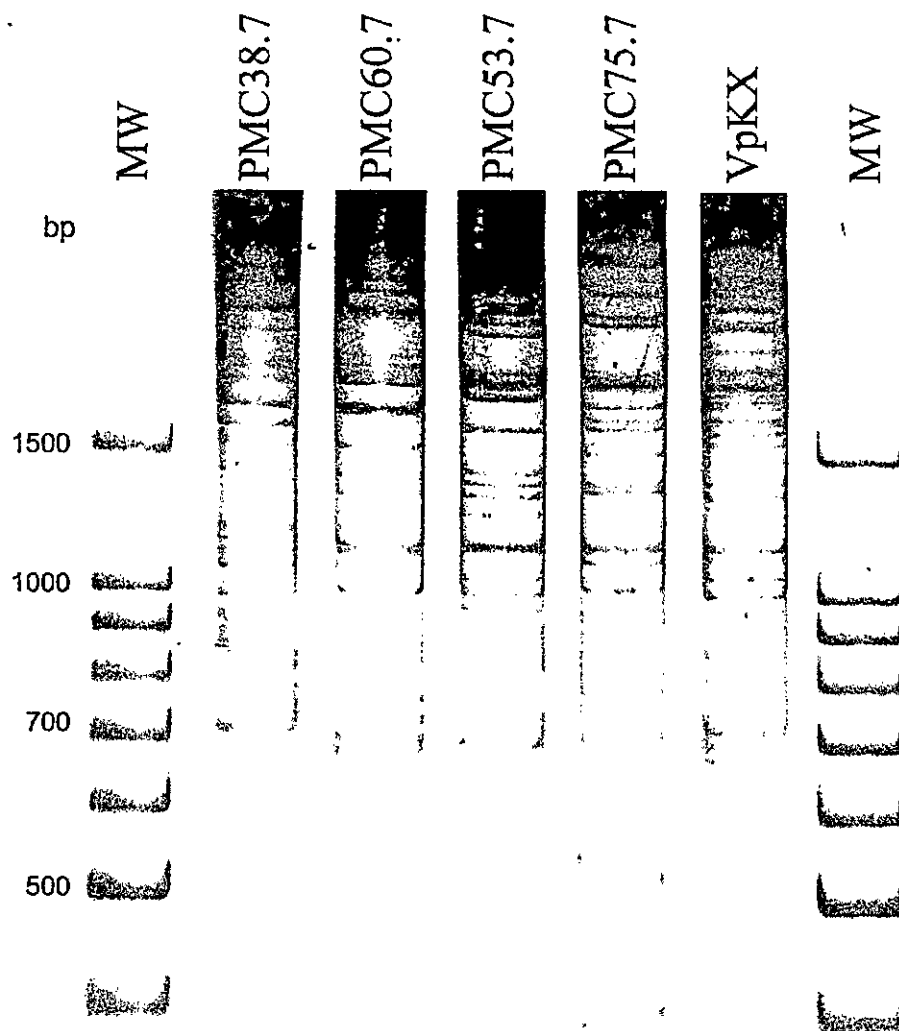
12 Fig. 3. Histogram showing the number of seafood samples containing *V. parahaemolyticus*
13 corresponding to the different DGREA groups observed each summer since 2004.

1
2 **References**

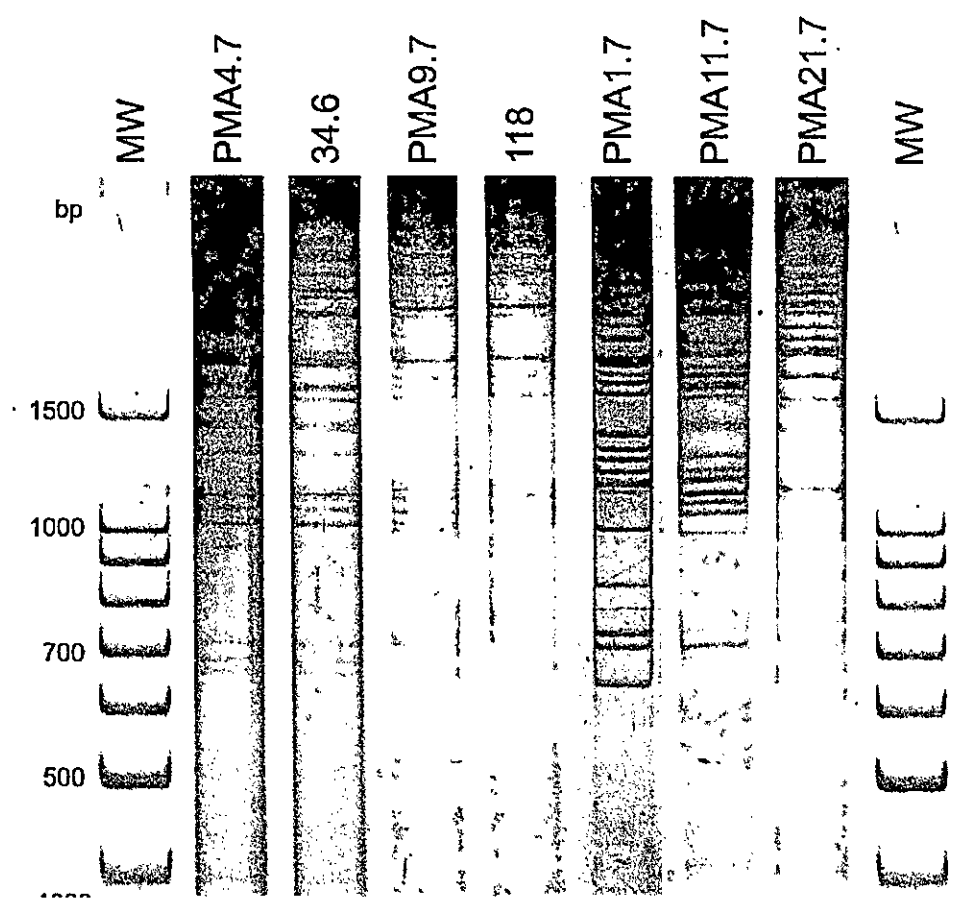
- 3
4 1. Cordova JL, Astorga J, Silva W, Riquelme C. Characterization by PCR of *Vibrio*
5 *parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak
6 1. Biol Res 2002;35:433-40.
- 7 2. Fuenzalida L, Armijo L, Zabala B, Hernandez C, Rioseco ML, Riquelme C, Espejo RT.
8 *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006
9 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. Int J Food Microbiol
10 2007;117:270-5.
- 11 3. Cabello FC, Espejo RT, Hernandez MC, Rioseco ML, Ulloa J, Vergara JA. *Vibrio*
12 *parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. Emerg Infect Dis
13 2007;13:655-6.
- 14 4. Fuenzalida L, Hernandez C, Toro J, Rioseco ML, Romero J, Espejo RT. *Vibrio*
15 *parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of
16 diarrhoea in southern Chile. Environ Microbiol 2006;8:675-83.
- 17 5. Gonzalez-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara JA, Cabello F et
18 al. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. Emerg Infect Dis
19 2005;11:129-31.
- 20 6. Olea A.M., González C, Chiu M, Vallebuona C, Labraña M, Martiniello F. Brote de
21 gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Chile. Revista Chilena Salud Pública
22 2005;9:51-3.
- 23 7. Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK et al.
24 Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India,
25 and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers
26 arriving in Japan. J Clin Microbiol 1997;35:3150-5.
- 27 8. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. Global
28 dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. Clin
29 Microbiol Rev 2007;20:39-48.
- 30 9. Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T et al.
31 Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of
32 related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. J
33 Clin Microbiol 2000;38:578-85.
- 34 10. Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park KS, Yokoyama K et al. A filamentous
35 phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. J Clin
36 Microbiol 2000;38:2156-61.

- 1 11. Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K et al. Genome
2 sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V*
3 cholerae. *Lancet* 2003;361:743-9.
- 4 12. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and
5 plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:379-433.
- 6 13. Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T. Functional
7 characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect*
8 *Immun* 2004;72:6659-65.
- 9 14. Dziejman M, Serruto D, Tam VC, Sturtevant D, Diraphat P, Faruque SM et al.
10 Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a
11 type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3465-70.
- 12 15. Wong HC, Liu SH, Wang TK, Lee CL, Chiou CS, Liu DP et al. Characteristics of
13 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3981-6.
- 14 16. Chowdhury NR, Stine OC, Morris JG, Nair GB. Assessment of evolution of
15 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*
16 2004;42:1280-2.
- 17 17. Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones DD, Kaysner CA. Detection
18 of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using
19 multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods* 1999;36:215-25.
- 20 18. Meador CE, Parsons MM, Bopp CA, Gerner-Smidt P, Painter JA, Vora GJ. Virulence
21 gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio*
22 *parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45:1133-9.
- 23 19. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdbNet - distributed multi-locus sequence
24 typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 2004;5:86.
- 25 20. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
26 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95-8.
- 27 21. Harth E, Romero J, Torres R, Espejo RT. Intragenomic heterogeneity and
28 intergenomic recombination among *Vibrio parahaemolyticus* 16S rRNA genes.
29 *Microbiology* 2007;153:2640-7.
- 30 22. Gonzalez-Escalona N, Romero J, Espejo RT. Polymorphism and gene conversion of
31 the 16S rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*.
32 *FEMS Microbiol Lett* 2005;246:213-9.
- 33 23. Terai A, Baba K, Shirai H, Yoshida O, Takeda Y, Nishibuchi M. Evidence for
34 insertion sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among
35 *Vibrio* species. *J Bacteriol* 1991;173:5036-46.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
- 1 24. Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio*
2 *parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun*
3 1995;63:2093-9.
 - 4 25. Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the
5 thermostable direct haemolysin and related haemolysin. *Rev Med Microbiol*
6 1993;4:106-13.
 - 7 26. Bhoopong P, Palittapongarnpim P, Pomwised R, Kiatkittipong A, Kamruzzaman M,
8 Nakaguchi Y et al. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains
9 isolated from individual patients. *J Clin Microbiol* 2007;45:1544-50.

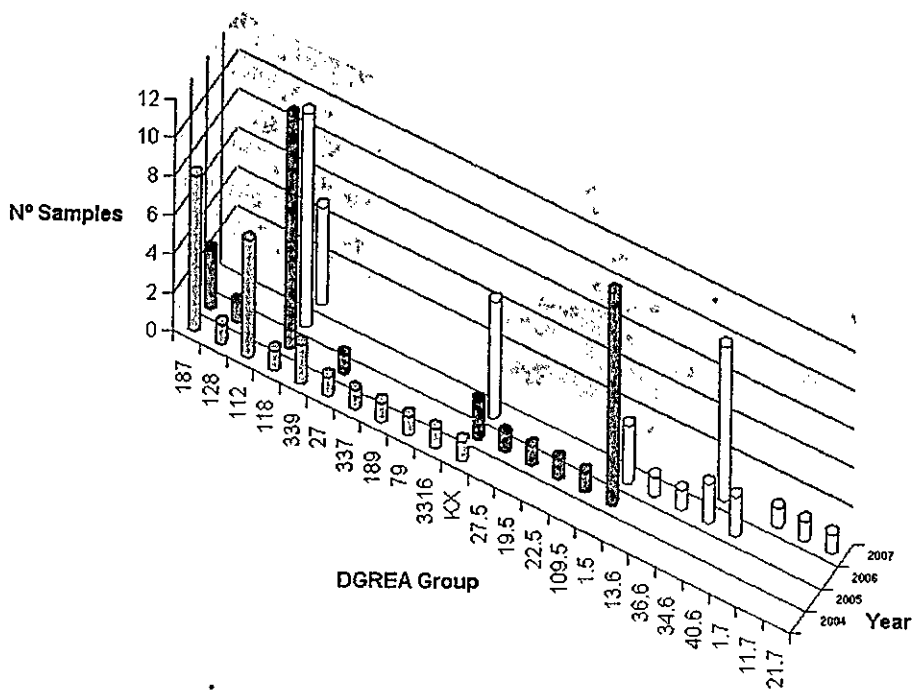


Direct genome restriction enzyme analysis (DGREA) with *Nae*I of clinical isolates representative of the 6 patterns observed during the outbreaks of January and February 2007 in Puerto Montt. MW, 100 bp size ladder; VpKX, O3:K6 southeast pandemic isolate.
80x94mm (300 x 300 DPI)



Direct genome restriction enzyme analysis (DGREA) with *NaeI* of *V. parahaemolyticus* isolates from shellfish collected in the summer of 2007. The gel shows representative strains for every observed pattern. Patterns of groups observed in previous years are next to the type isolate of that group. MW, 100 bp size ladder
80x76mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50



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