

C  
S  
inología

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

CARACTERIZACIÓN DE *Vibrio Parahaemolyticus* EN AISLADOS CLÍNICOS DE LA  
ZONA DE PUERTO MONTT 2007.

Memoria de Título  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular



por  
Luis Darío Matsuda Ánjel.

Enero, 2008  
Santiago – Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Romilio Espejo.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
MEMORIA DE TITULO

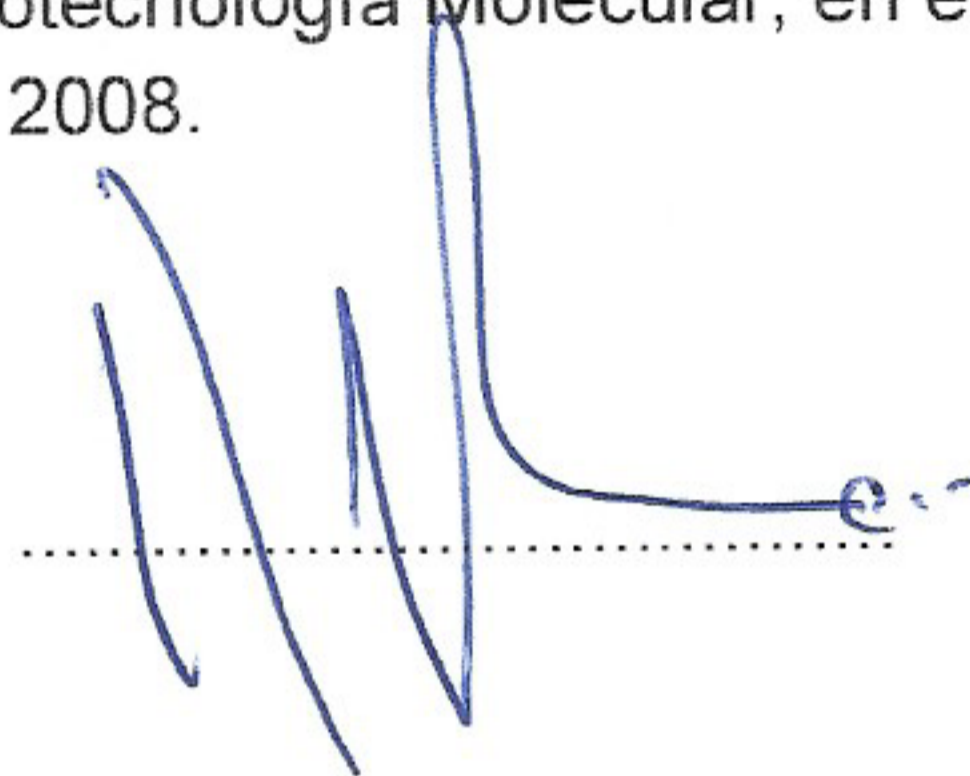
Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la Memoria de Título presentada por el candidato.

LUIS DARÍO MATSUDA ÁNJEL

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de Memoria rendido el día 18 de Julio 2008.

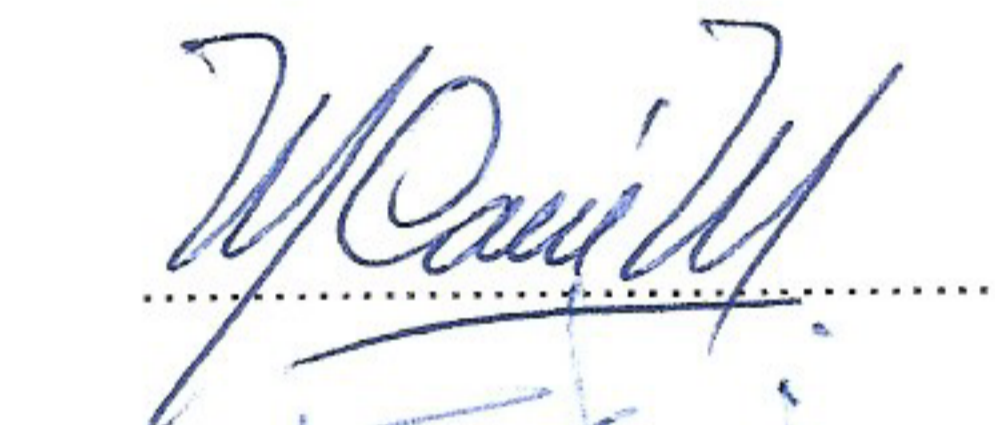
Director de Memoria de Título:

Dr. Romilio Espejo

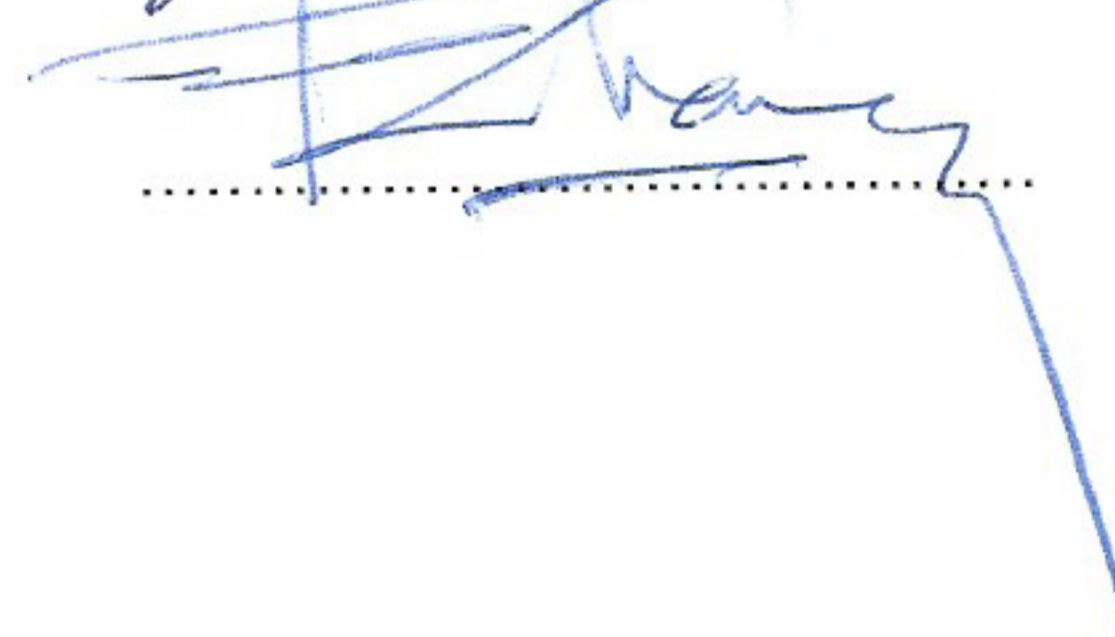


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Margarita Carú.



Dr. Francisco Chávez.





A mi mamá y hermana...



## AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos:

- Al Dr. Romilio Espejo por su apoyo, comprensión, respaldo y ayuda en la elaboración de esta memoria.
- A mi compañera de laboratorio Erika Harth y al Dr. Narjol González-Escalona por su contribución al desarrollo de este trabajo.
- A mis compañeros de laboratorio Beatriz Zabala, Lorena Armijo, Katherine García, Rafael Torres y Roberto Bastias por su ayuda en el desarrollo de este trabajo.
- A todo el personal que trabaja en el laboratorio de biotecnología del INTA por su apoyo.
- A mis amigos por su aliento constante.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS .....	vii
<b>RESUMEN.....</b>	viii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	1
Objetivos generales y específicos.....	8
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	9
Cepas y condiciones de cultivo.....	9
Caracterización genotípica.....	10
Análisis directo del genoma por enzimas de restricción (DGREA).....	13
Tipificación por secuencia de multilocus (MLST).....	14
<b>RESULTADOS.....</b>	15
1. Clasificación de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> según marcadores genéticos y su patrón de DGREA.....	15
2. Descripción del gen <i>tdh</i> de las cepas clínicas no pandémicas.....	18
3. Análisis de amplificación y secuencia de los genes de la isla de patogenicidad en cepas no pandémicas de Puerto Montt.....	21
4. Análisis de secuencia de genes esenciales mediante multilocus sequencing typing (MLST) de los aislados clínicos.....	24
<b>DISCUSIÓN.....</b>	26
<b>CONCLUSIONES.....</b>	29
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	30

## ÍNDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1.	Partidores ocupados en este estudio.....	12
Tabla 2.	Propiedades de aislados clínicos de <i>V. parahaemolyticus</i> de la zona de Puerto Montt 2007.....	16
Tabla 3.	Comparación de las secuencias en los sitios de polimorfismo en el gen <i>tdh</i> .....	19
Tabla 4.	Comparación de las secuencias de T3SS2 de la cepa PMA339 y la cepa pandémica.....	23
Tabla 5.	Perfiles alelicos de las secuencias tipo analizadas.....	25



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la amplificación de los marcadores moleculares.....	16
Figura 2. Patrón DGREA de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> aisladas de casos clínicos del 2007 en Puerto Montt.....	17
Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las amplificaciones del gen <i>tdh</i> .....	18
Figura 4. Perfil de <i>tdh</i> de las cepas secuenciadas en el nucleótido 368.....	20
Figura 5. Amplificaciones del sistema de secreción tipo 3 (T3SS2) y de los genes VPA1321 y VPA1376 de la cepa PMC38.7.....	22



### Lista de abreviaturas y nomenclatura.

AP-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Partidores Arbitrarios
BLAST	Herramienta de Búsqueda de Alineaciones Locales Básicas
DGREA	Análisis directo del genoma por enzimas de restricción
IS	Secuencias de Inserción
MLST	Tipificación por Secuencia de Multilocus
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsado
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
T3SS2	Sistema de Secreción Tipo III





## RESUMEN

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria asociada a la gastroenteritis por el consumo de los mariscos crudos o mal cocidos. En 1998 se reportó el primer brote en Antofagasta, seguido por otros en Puerto Montt los años 2004, 2005 y 2006. En todos los casos el responsable fue el serotipo (O3:K6) surgido en 1996 en el sudeste asiático. Además del impacto en la salud que tuvieron estos brotes, tienen una repercusión importante en la economía por ser una de las mayores áreas productora de marisco. Durante el verano del 2007 en la zona de Puerto Montt se reportaron 450 casos. En esta memoria se desarrolla la caracterización de los aislados clínicos de *V. parahaemolyticus*. De los aislados solo un 71% corresponde a la cepa pandémica. Dentro de las cepas emergentes, una cepa encontrada en el 13% de los casos, aunque genotípicamente diferente, contiene genes idénticos que los encontrados en la isla de patogenicidad del clon pandémico. Estos resultados sugieren fuertemente una adquisición reciente mediante transferencia lateral de los genes asociados a la patogenicidad desde la cepa pandémica a un grupo autóctono.



## INTRODUCCIÓN

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria Gram-negativa halofílica, habitante natural en los ambientes marinos, asociada a la gastroenteritis por el consumo de mariscos crudos o mal cocidos. Esta especie bacteriana incluye un gran número de cepas, constituidas por clones, los cuales tienen una reproducción y propagación por división binaria sin intercambio sistemático de genes con otras bacterias de la misma especie. Estos clones evolucionan mediante intercambio de genes por transferencia lateral cuya frecuencia de ocurrencia es muy variable y también mediante mutaciones.

Solo algunas cepas ocasionan gastroenteritis por el consumo de los mariscos mal cocidos o crudos. La mayoría de los aislados asociados a los casos clínicos tienen como propiedad presentar un factor de virulencia conocido como "hemolisina directa termoestable" (TDH) que es responsable de la actividad hemolítica llamada el fenómeno Kanagawa (KP) (Chun y col., 1975). Esta hemolisina fue llamada así ya que no se inactiva al someterla a 100 °C por 10 minutos y además su efecto es directo sobre los eritrocitos (Nishibuchi, 1995). El gen *tdh*, que codifica para la TDH, ha sido encontrado en otras cepas de otras especies de *Vibrio*, como *Vibrio mimicus* y *Vibrio cholerae* no-O1. Una de las características más importantes es que todos los genes *tdh* encontrados están flanqueados por secuencias de inserción (llamadas colectivamente ISVs) o por secuencias relacionadas derivadas de los rearrreglos de ISVs (Terai y col., 1991). Estas secuencias ISVs son pequeños elementos genéticos móviles, los cuales son capaces de transponerse dentro o entre los genomas de los procariontes. Las ISVs proveen de lugares donde la recombinación homóloga puede ocurrir, así como la escisión o inestabilidad de los genes adyacentes a ellos (Mahillon y col., 1998). Sin embargo, en el caso del gen *tdh* en *V. parahaemolyticus* la actividad de transposición

de las ISVs asociados no está probada, probablemente debido a los cambios de bases, inserciones o deleciones en el gen de la transposasa (Terai y col., 1991).

Otro factor asociado a la virulencia es la “hemolisina relacionada a TDH” (TRH) codificado por el gen *trh*, este factor es biológica, inmunológica y fisicoquímicamente parecido pero no igual a TDH (Honda y col., 1988). El gen *trh* comparte un 69% de identidad con el gen *tdh*, sin embargo, se piensa que ambos tienen un ancestro común debido a que la estructura fundamental de ambas proteínas es mantenida.

Casi todos los aislados clínicos contienen *tdh*, *trh* o ambos, en cambio solo el 1% al 2% de los aislados ambientales los presentan (Nishibuchi, 1995). Los mecanismos de patogenicidad de *V. parahaemolyticus* y el rol que cumple TDH y TRH permanecen desconocidos.

Hasta 1996 los casos clínicos se asociaban a múltiples serotipos, sin embargo, desde esa fecha, un serotipo, O3:K6, surgido en el sudeste asiático ha sido documentado como el causante de una enfermedad pandémica (Matsumoto y col., 2000, Okuda y col., 1997a), este serotipo ha sido vinculado a brotes en los países de Asia (Wong y col., 2000), Europa (Martinez-Urtaza y col., 2005), Norteamérica (Myers y col., 2003), Sudamérica (Gonzalez-Escalona y col., 2005) y África (Ansaruzzaman y col., 2005). En estudios moleculares mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Wong y col., 2000) y reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR) (Matsumoto y col. 2000, Okuda y col., 1997b) se observó que las cepas que presentan el serotipo O3:K6 están clonalmente relacionadas. Una de las secuencias utilizadas como marcador filogenético fue el operon *toxRS*. Los genes *toxR* y *toxS*, en el operon *toxRS*, transcriben para las proteínas de transmembrana involucradas en la regulación de genes asociados a la patogenicidad, como *tdh*, y están bien conservados en el género *Vibrio* (Lin y col., 1993). Además es pertinente mencionar que el operon

*toxRS* es considerado un regulador global de los genes de *V. parahaemolyticus*. El clon pandémico presenta una secuencia única en el operon *toxRS* (*toxRS/new*) que permitió apoyar la hipótesis de la pandemia provocada por *V. parahaemolyticus* (Matsumoto y col., 2000). Además el clon pandémico tiene como características que presenta el gen *tdh*, carece del gen *trh* y posee un marco de lectura abierto (*orf8*) asociado al genoma del fago filamentoso *f237* (Nasu y col., 2000). La presencia de las secuencias *toxRS/new*, *orf8* y *tdh* se usaran como los marcadores de la cepa pandémica en este trabajo.

En el año 2003 se publicó la secuenciación del genoma de la cepa del clon pandémico RIMD2210633 (Makino y col., 2003) que fue aislada en 1996 del aeropuerto internacional de Kansai (Japón). En este trabajo se reportó que el clon pandémico tiene una isla de patogenicidad en el cromosoma 2, la cual presenta un tamaño de 80 Kb, un contenido de G+C más bajo que el promedio presente en el resto del genoma y se encuentra flanqueada por secuencias relacionadas con ISVs. Todas son propiedades generales de las islas de patogenicidad en las bacterias (Schmidt & Hensel. 2004).

Dentro de la isla se encontraron varios genes relacionados a patogenicidad los cuales presentaban similitud con otros identificados en otras especies, por ejemplo, el factor de necrosis citotóxica de *Escherichia coli*. Se identificó, además, el gen *tdh*, el cual presentaba dos copias (*tdhA* y *tdhS*) con una similitud del 97%. Cada una de las copias del gen presenta ISVs flanqueando sus secuencias. Además se observan los genes del sistema de secreción tipo III (T3SS2). Este sistema de secreción es usado por otros organismos causantes de enfermedades por contacto íntimo con células eucarióticas, como *Salmonella* o *Yersinia*. Estas estructuras son usadas para inyectar las proteínas bacterianas directamente a las células del huésped (Makino y col., 2003). Debido a que T3SS2 es exclusivo de cepas que producen TDH (KP-positivas), se

piensa que juega un rol en el establecimiento del cuadro clínico. Sin embargo, recientes investigaciones, incluyendo el presente estudio, muestran que ciertas cepas ambientales, que carecen del gen *tdh*, también poseen T3SS2, aunque es poco común (Meador y col., 2007). Se hace notar que en la secuenciación de *V. parahaemolyticus* se identificó otro sistema de secreción tipo III (T3SS) en el cromosoma 1. T3SS estaría presente en todas las cepas de *V. parahaemolyticus* independiente del origen. Al contrario de T3SS2, el contenido G+C sería similar al encontrado en el genoma, por lo cual no sería producto de una transferencia lateral reciente (Makino y col., 2003).

A comienzos del año 2007 se publicó una investigación en la cual se trata de explicar la presencia de las cepas de los aislados clínicos sin los factores de virulencia *tdh* o *trh*. En este estudio se llega a la conclusión que la infección en un paciente puede ser heterogénea, es decir, producida por varias cepas al mismo tiempo. Esto puede deberse a cambios *in vivo* en el paciente, tales como, cambios en el serotipo o delección de los genes y a la infección por varias cepas distintas. Aunque no se descarta que las cepas que no contienen *tdh* y *trh* tengan otro mecanismo para el establecimiento del cuadro clínico (Bhoopong y col., 2007).

En el verano de 1998 en Chile se reportó el primer brote de *V. parahaemolyticus* en Antofagasta, con 300 casos y seguido por un segundo brote que afectó a 1500 personas en Puerto Montt en el verano del 2004 (Gonzalez-Escalona y col., 2005). Aparte del impacto de salud que tuvo este brote, tuvo una repercusión social y económica muy importante debido a que Puerto Montt es una de las mayores áreas productoras de mariscos en Chile. Debido a la presencia del gen *tdh* asociado al clon pandémico en las muestras de los mariscos tomadas del área, se suspendió la extracción durante la temporada de mayor demanda. Desde 1998 al 2004 los casos reportados en Antofagasta no superan los diez por año, sin embargo, desde el 2004 en

la región de Puerto Montt el mismo clon pandémico ha causado brotes de importancia. En el 2005 se reportaron 3600 casos y en el 2006 900 casos. Estos casos generalmente son registrados en la temporada de verano debido a que la presencia de *V. parahaemolyticus* está muy influenciada por la temperatura del ambiente. (Fuenzalida y col., 2006)

Los estudios de estos brotes han mostrado que en todos los casos el causante es la cepa pandémica originada en el sudeste asiático (Gonzalez-Escalona y col., 2005, Fuenzalida y col., 2006). En las muestras ambientales aisladas en el periodo 2004-2006 se observa una pequeña, pero diversa población de las cepas no patógenas de *V. parahaemolyticus*, en ella, el clon pandémico ha sido un componente menor.

Muchos métodos de clasificación han sido utilizados para el estudio de *V. parahaemolyticus*, tales como los ya mencionados: serotipificación, AP-PCR, PFGE y otros como la ribotipificación (Gendel y col., 2001). En el presente trabajo se ocupará varios métodos descritos a continuación.

Multiplex-PCR se basa en amplificar en una sola reacción de PCR los genes asociados a la patogenicidad *tdh* y *trh* y un gen que es especie-específico: "hemolisina termolábil", *tth* (Bej y col. 1999).

Análisis directo del genoma por enzimas de restricción (en inglés "Direct Genome Restriction Enzyme Analysis", DGREA) se basa en diferenciar los aislados de acuerdo a un patrón de fraccionamiento del DNA obtenido luego de una hidrólisis con una enzima de restricción (en este caso la enzima ocupada será NaeI) y separadas mediante una electroforesis en gel de policrilamida. Este método presenta un índice de discriminación similar al obtenido por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción en electroforesis en campo pulsado (RFLP-PFGE) (Fuenzalida y col., 2006).

Las cepas descritas en los años anteriores que presentan los mismos patrones de DGREA coinciden con la presencia o ausencia de los marcadores genéticos (*tlh*, *tdh*, *trh*, *ToxRS/new* y *orf8*).

Tipificación por secuencia de multilocus (en inglés “Multilocus sequence typing”, MLST) se basa en el análisis de la secuencia de los genes “housekeeping”, estos presentan la característica de estar involucrados en las funciones esenciales de la célula como el metabolismo central, debido a esto, su secuencia es poco variable entre cepas de una misma especie. Debido a que se basa en la secuencia representa una ventaja con respecto a los otros métodos, ya que puede ser compartida la información en base de datos públicos a través de internet (Maiden y col., 1998). En este estudio se ocupó el esquema y la información de la base de datos pública desarrollada por Gonzalez-Escalona para *V. parahaemolyticus* que se encuentra publicado desde abril del 2007 en la página web <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/> desarrollada por Keith Jolley que está situada en la universidad de Oxford (Jolley y col., 2004). Aún no hay una publicación asociada que informe el análisis de los datos.

Los genes “housekeeping” a emplear son tres genes del cromosoma I y cuatro del cromosoma II en *V. parahaemolyticus*. Del cromosoma I están: *dnaE* (subunidad  $\alpha$  de la DNA polimerasa III), *gyrB* (subunidad B de la DNA girasa) y *recA* (proteína RecA). Del cromosoma II están: *dtdS* (treonina 3-deshidrogenasa), *pntA* (subunidad  $\alpha$  transhidrogenasa), *pyrC* (dihidroorotasa) y *tnaA* (triptofanasa).

Durante el verano del 2007 en Puerto Montt se produjeron 450 casos de diarrea asociada al consumo de mariscos. Esta memoria desarrolla una caracterización de las cepas aisladas de los casos clínicos en el verano del 2007, principalmente en las propiedades que puedan ayudar a establecer su posible origen. Se describen nuevas

cepas patógenas, una de ellas aparentemente generada por transferencia lateral de genes asociados a la patogenicidad desde la cepa pandémica a una cepa autóctona.



### Objetivos generales y específicos.

#### Objetivo general.

- Caracterización de *V. parahaemolyticus* en aislados clínicos de la zona de Puerto Montt en el verano del 2007.

#### Objetivos específicos.

- Clasificar los aislados clínicos según los marcadores genéticos: *tlh*, *tdh*, *trh*, *orf8* y *toxRS/new*.
- Determinar las diferencias de las distintas cepas aisladas mediante patrón de restricción del genoma (DGREA) y comparar con lo encontrado en la zona los años 2004, 2005 y 2006.
- Determinar las diferencias entre los distintos aislados clínicos mediante el análisis de los genes asociados a la isla de patogenicidad del clon pandémico.
- Determinar mediante tipificación por secuencia de multilocus (MLST) relaciones de similitud entre las cepas clínicas aisladas el año 2007 y lo reportado en las bases de datos públicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas y condiciones de cultivo.

Las cepas de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 (VpKx) y RIMD2210856 (VpAQ) fueron obtenidas del Instituto de Investigación de Enfermedades Microbianas de la Universidad de Osaka (Japón). Las cepas ambientales: PMA79, PMA112, PMA3316, PMA189, PMA337, PMA339, PMA1.5, PMA22.5, PMA19.5, PMA27.5, PMA40.6, PMA36.6 y PMA13.6, fueron obtenidas desde muestras de mariscos en los veranos entre el 2004 y el 2006 y han sido previamente descritas (Fuenzalida y col., 2006). Estas cepas ambientales fueron ocupadas como cepa tipo representante de 13 grupos DGREA: 79, 112, 3316, 189, 337, 339, 1.5, 22.5, 19.5, 27.5, 40.6, 36.6 y 13.6, respectivamente.

Las cepas clínicas analizadas en esta memoria fueron aisladas del recto de pacientes que presentaban diarrea asociada al consumo de mariscos, que fueron en busca de atención médica durante enero y febrero del año 2007 en el Hospital Regional de Puerto Montt.

En total son 38 cepas clínicas. La nomenclatura de los nombres de cada una de estas cepas está conformada por el prefijo PMC (Puerto Montt clínica). Continúa con un número específico para cada cepa y luego “.7”, que indica el año en que fue aislada, en este caso 2007.

Todas las cepas arriba mencionadas son guardadas a temperatura ambiente en LB-agar blando al 3% NaCl, que contiene: 1% triptona, 0,5% de extracto de levadura, 3% de NaCl y 0,45% de agar.

Los cultivos de las cepas de *V. parahaemolyticus* fueron hechos en tubos desechables de 50 mL inoculados con 4 ml de LB al 3% NaCl, las bacterias son

transferidas desde agar blando mediante asa esterilizada en mechero bajo campana. Se deja crecer toda la noche (16 horas) a 37 °C con los tubos acostados y en agitación. Se comprueba el crecimiento mediante inspección de la turbidez comparando con un control sin inocular. Los cultivos son usados inmediatamente y después desechados.

### **Caracterización genotípica.**

El DNA bacteriano fue extraído mediante el kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega, USA) desde el cultivo bacteriano arriba mencionado. El detalle del protocolo se encuentra en [www.promega.com/tbs/tm050/tm050.pdf](http://www.promega.com/tbs/tm050/tm050.pdf) (paginas 16-17).

Las amplificaciones de PCR para los genes *tlh*, *tdh*, *trh*, se realizó mediante un PCR multiplex. Estos partidores están descritos en la tabla 1. Cada una de las reacciones fue realizada en un volumen de 30 µL conteniendo MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, nucleótidos 0.2 mM de cada uno, Taq polimerasa 0,05 U/µl y los partidores tlhf, tlhr, tdhf, tdhr, trhf y trhr a una concentración de 0,25 µM cada uno. El DNA templado fue diluido 1/10. Las reacciones de amplificación fueron realizadas con una denaturación inicial de 94 °C por 3 minutos; 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos; y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Luego de esto se realizó una electroforesis en geles de policrilamida al 8% a 150 Volts por 45 minutos. La tinción se realizó con AgNO<sub>3</sub>.

Para las amplificaciones del gen *tdh* se usan las mismas condiciones arriba especificadas, excepto que los volúmenes de los otros partidores se reemplazan por agua libre de nucleasas.

Para las amplificaciones de los genes *orf8*, *ToxRS/new* se aplicaron las mismas condiciones que para el multiplex de PCR excepto que en *orf8* se usó una concentración de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y para *ToxRS/new* de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Además en *orf8* los tiempos de reacción fueron: denaturación inicial de 96 °C por 5 minutos; 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minutos; y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. En el caso de *ToxRS/new*: denaturación inicial de 96 °C por 5 minutos; 25 ciclos de 96 °C por 1 minuto, 45 °C por 2 minuto y 72 °C por 3 minutos; y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Los partidores para amplificar cada uno de estos genes están descritos en la tabla 1. Las condiciones para el gel de policrilamida fueron idénticas a lo descrito para el multiplex.

Para las amplificaciones de los genes del T3SS2 (VPA1335, VPA1338, VPA1339, VPA1341, VPA1342, VPA1346, VPA1349, VPA1354, VPA1355, VPA1362 y VPA1367) se usaron los partidores descritos por Meador para microensayos (Meador y col. 2007) (Tabla 1). Para los genes VPA1321 y VPA1376 localizados en los extremos de la isla de patogenicidad se usaron partidores diseñados con el programa Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) (Tabla 1). Las reacciones de amplificación de estos genes tienen las siguientes especificaciones: en un volumen de 30 µL, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, nucleótidos 0.4 mM de cada uno, Taq polimerasa 0,05 U/µl y los partidores a una concentración de 0,2µM cada uno. El DNA fue diluido 1/10 de lo extraído mediante el kit. Las reacciones de amplificación fueron realizadas con una denaturación inicial de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 61 °C por 1 minuto y 72 °C por 90 segundos; y una extensión final de 72 °C por 7 minutos. Las condiciones para el gel de policrilamida fueron idénticas a lo descrito para el multiplex.

Los amplicones fueron purificados mediante el kit "Wizard SV Gel or PCR Clean-Up System" (Promega, USA), de acuerdo al protocolo descrito en

[www.promega.com/tbs/tb308/tb308.pdf](http://www.promega.com/tbs/tb308/tb308.pdf). Luego se cuantifico mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiño con Bromuro de etidio. El estándar fue concentraciones conocidas de  $\lambda$  Hind III.

La secuenciación fue realizada en ambas direcciones por Macrogen (Corea). Las secuencias de DNA fueron analizadas individualmente y ensambladas manualmente. Los alineamientos y la similitud de las secuencias fueron obtenidos mediante el programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). La secuencia obtenida fue depositada en el GenBank con número de acceso: EU185084.

Tabla 1. Partidores ocupados en este estudio.

Gen	Nombre Primer	Secuencia primer 5' - 3'	Tamaño amplicon (pb)	Referencia Bibliografica
<i>tlh</i>	tlhf	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	Bej y col. 1999
	tlhr	GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC		
<i>tdh</i>	tdhf	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	270	Bej y col. 1999
	tdhr	TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC		
<i>trh</i>	trhf	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	500	Bej y col. 1999
	trhr	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG		
<i>orf8</i>	VP36RF8U	GCATACAGTTGAGGGGAAAG	1058	Laohaprerthisan y col. 2003
	VP36RF8L	AGCGCTCTTTGTTTTCTATATG		
<i>ToxRS/new</i>	GSVP1	TAATGAGGTAGAAACA	651	Matsumoto y col. 2000
	GSVP2	ACGTAACGGGCCTACA		
<i>VPA1335</i>	VPA1335-F	TACCACTACCAAACACTGTGTCAG	194	Meador y col. 2007
	VPA1335-R	GACGGTTATTGATGTAACGGCGG		
<i>VPA1338</i>	VPA1338-F	CGACAACCTCACGAGCGCG	487	Meador y col. 2007
	VPA1338-R	GGCAAGAGTGCTTTGTGC		
<i>VPA1339</i>	VPA1339-F	TCTTGGTATTGATAGTGGGTGGCTAAATGG	364	Meador y col. 2007
	VPA1339-R	CGGCGGTCTATTGCTATCCTCATTATCATC		
<i>VPA1341</i>	VPA1341-F	CCACAGCACATAGTGATGACCAG	438	Meador y col. 2007
	VPA1341-R	TACCAGTAGTTTGGCTATCGC		
<i>VPA1342</i>	VPA1342-F	CACTGTCGGTGATAACATGGTC	418	Meador y col. 2007
	VPA1342-R	CAACCTATTGGCGGCTCTG		
<i>VPA1346</i>	VPA1346-F	CAATGTTGGCTATTCGGTTGCAGTCTGTATG	393	Meador y col. 2007
	VPA1346-R	CGTCCAACCTCTATTGTTGTGATATGGCGTTG		
<i>VPA1349</i>	VPA1349-F	CTACAGCGACGGCATATTGG	169	Meador y col. 2007
	VPA1349-R	GTGATTGCCCATTTGCCAGC		

VPA1354	VPA1354-F	CTGGCGAGCCTTCCGTCTC	522	Meador y col. 2007
	VPA1354-R	CTGGTGAATGGTTCTCCGCAG		
VPA1355	VPA1355-F	CGAGGGTCACTCTCTACGC	432	Meador y col. 2007
	VPA1355-R	GTCGTTATGGGGACAAGCC		
VPA1362	VPA1362-F	GAGCAACCGAACGCATCGC	397	Meador y col. 2007
	VPA1362-R	GCAGGTATCGCATCTTCAGC		
VPA1367	VPA1367-F	CACACCACCTGAACGAAG	493	Meador y col. 2007
	VPA1367-R	CAGGTTGCCGTGATTCAGG		
VPA1321	VPA1321-F	TGACATGCACGGCAATAGAT	412	Este estudio
	VPA1321-R	ACAGAGTTGGTTTCGCAGGT		
VPA1376	VPA1376-F	CATCGAGCGATCTTTCACAA	700	Este estudio
	VPA1376-R	ACCGGTTTCCAACCTTCTCT		
<i>recA</i>	<i>recA</i> -1F	<u>tgtaaacgacggccagt</u> GAAACCATTTC AACGGGTTC	773	***
	<i>recA</i> -1R	<u>caggaaacagctatgacc</u> CCATTGTAGCTGTACCAAGCA CCC		
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -1F	<u>tgtaaacgacggccagt</u> GAAGGBGGTATTCAAGC	629	***
	<i>gyrB</i> -1R	<u>caggaaacagctatgacc</u> GAGTCACCCTCCACWATGTA		
<i>dnaE</i>	<i>dnaE</i> -1F	<u>tgtaaacgacggccagt</u> CGRATMACCGCTTTCGCCG	596	***
	<i>dnaE</i> -1R	<u>caggaaacagctatgacc</u> GAKATGTGTGAGCTGTTTGC		
<i>ompK</i>	<i>ompK</i> -1F	<u>caggaaacagctatgacc</u> TCGAGATTTGGAAACCGTTC	462	***
	<i>ompK</i> -1R	<u>tgtaaacgacggccagt</u> ACGGCGATATCCACAAAAAC		
<i>dtdS</i>	<i>dtdS</i> -1F	<u>tgtaaacgacggccagt</u> TGGCCATAACGACATTCTGA	497	***
	<i>dtdS</i> -1R	<u>caggaaacagctatgacc</u> GAGCACCAACGTGTTTAGC		
<i>pntA</i>	<i>pntA</i> -1F	<u>tgtaaacgacggccagt</u> ACGGCTACGAAAAGAAATG	470	***
	<i>pntA</i> -1R	<u>caggaaacagctatgacc</u> TTGAGGCTGAGCCGATACTT		
<i>pyrC</i>	<i>pyrC</i> -1F	<u>tgtaaacgacggccagt</u> AGCAACCGGTAAAATTGTCTG	533	***
	<i>pyrC</i> -1R	<u>caggaaacagctatgacc</u> CAGTGTAAGAACCGGCACAA		
<i>tnaA</i>	<i>tnaA</i> -1F	<u>tgtaaacgacggccagt</u> TGTACGAAATTGCCACCAA	463	***
	<i>tnaA</i> -1R	<u>caggaaacagctatgacc</u> AATATTTTCGCCGCATCAAC		

\*\*\* Los partidores se encuentran se encuentra publicado en el sitio <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>. Cada uno de los partidores de este esquema contiene en ambas direcciones los partidores M13 indicados en minúsculas.

### Análisis directo del genoma por enzimas de restricción (DGREA).

Se trataron 10 µl del DNA bacteriano extraído mediante kit "Wizard Genomic DNA Purification" (Promega, USA) arriba mencionado, con 5 U de *NaeI* de acuerdo a lo especificado por el fabricante (Promega, USA) y se incubó por dos horas a 37°C. Luego las muestras se incubaron una hora a 37 °C con Proteinasa K a una concentración final de 0,2 mg/mL. Los fragmentos se separan por una electroforesis en

gel de policrilamida al 8% con un espesor de 1,5 mm. Se corrió a 100 Volts por 3 horas. La tinción se realizó con  $\text{AgNO}_3$ .

#### **Tipificación por secuencia de multilocus (MLST).**

El cultivo de las cepas y la extracción de DNA se realizaron según lo informado para la caracterización genotípica.

La amplificación mediante PCR se usó los partidores para MLST (Tabla1) que contienen los partidores M13 en ambas direcciones. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: denaturación a 96°C por 1 minuto; 30 ciclos de: 59 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto; y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Cada una de las reacciones se realizó en un volumen de 30  $\mu\text{L}$  conteniendo  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, nucleótidos 0.2 mM de cada uno, Taq polimerasa 0,05 U/ $\mu\text{l}$  y los partidores a una concentración de 0,25  $\mu\text{M}$  cada uno. El DNA fue diluido 1/10 de lo extraído mediante el kit. La electroforesis en gel de policrilamida y la purificación de los amplicones se realizó según lo informado para la caracterización genotípica. La secuenciación fue realizada en ambas direcciones por MacroGen (Corea) empleando los primer M13F y M13R.

Las secuencias de DNA fueron analizadas individualmente y ensambladas manualmente mediante el programa Bioedit. Los alineamientos y la similitud de las secuencias fueron obtenidos mediante las herramientas del sitio <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/> y la base de datos disponible. Las secuencias tipo (ST) encontradas en este estudio están disponibles en esta base de datos.

## RESULTADOS

### 1. Clasificación de las cepas de *V. parahaemolyticus* según los marcadores genéticos y su patrón de DGREA.

Los aislados de *V. parahaemolyticus* de 38 casos de casos de diarrea en el verano del 2007 en la región de Puerto Montt fueron agrupados según marcadores genéticos (*tlh*, *tdh*, *trh*, *orf8* y *toxRS/new*) (Tabla 2, Figura 1) y su patrón característico de DGREA (Figura 2).

Se encontró que a diferencia de años anteriores, solo el 71% de las cepas aisladas correspondía al grupo pandémico. Los 11 casos restantes carecen de los marcadores *orf8* y *ToxRS/new* característicos de la cepa pandémica. Estos últimos fueron clasificados en 4 grupos. Uno de estos grupos contiene 5 aislados que son positivos para el gen *tdh*. Un segundo grupo contiene 4 aislados que presentan ambos genes *tdh* y *trh*. Los otros dos grupos contienen un aislado cada uno y ambos fueron negativos para ambos genes (Tabla 2, Figura 1).

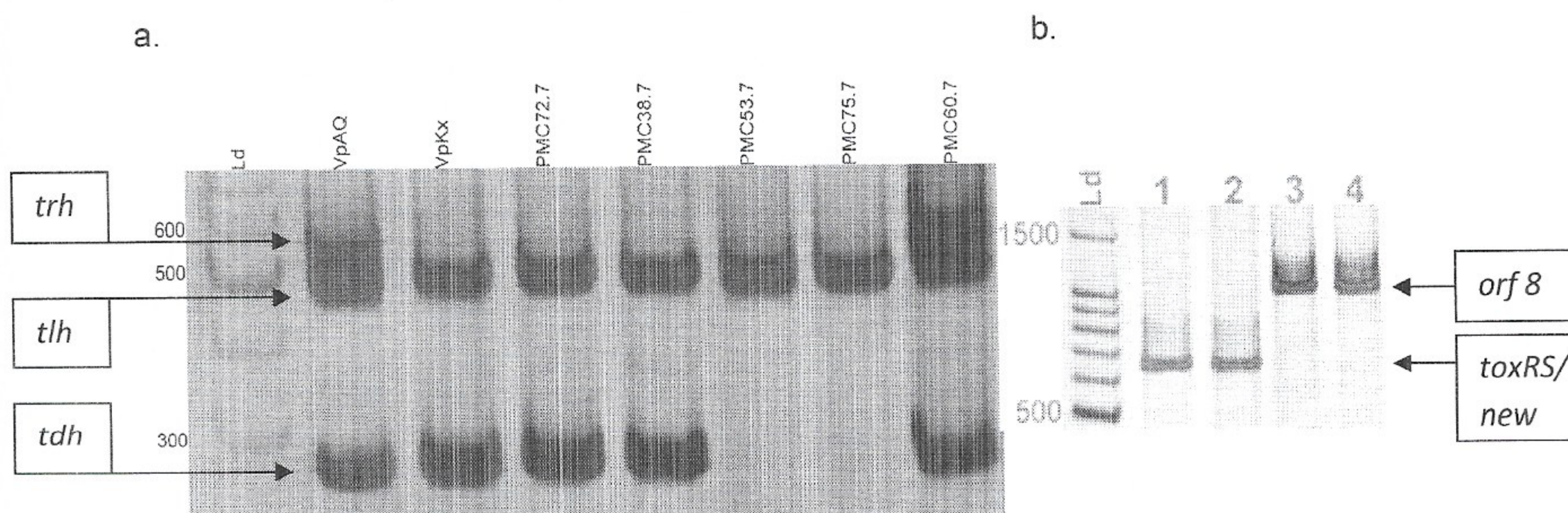
El análisis de los distintos aislados, por su patrón DGREA, permitió clasificar las cepas según el patrón de restricción de su DNA en 5 grupos acordes con la clasificación según los marcadores genéticos (Tabla 2, Figura 2). El patrón DGREA del grupo que presentaba los marcadores encontrados en la cepa pandémica es el mismo encontrado años anteriores para ésta (Fuenzalida y col., 2006, 2007). Los demás patrones, a excepción PMC53.7 que pertenece al grupo 1.5, no se habían observado con anterioridad.



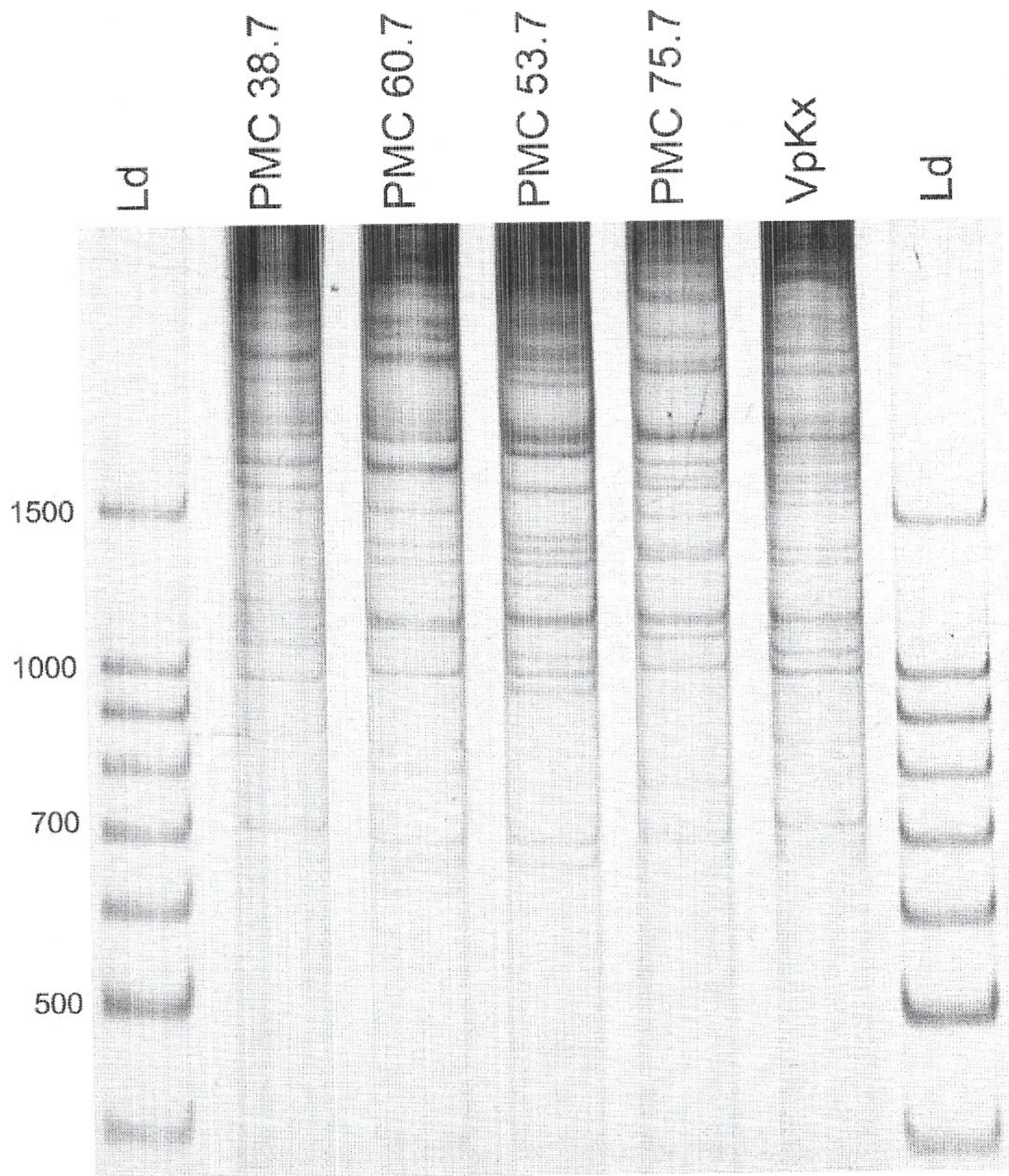
**Tabla 2.** Propiedades de los aislados clínicos de *V. parahaemolyticus* de la zona de Puerto Montt en el año 2007.

Cepas <i>V. parahaemolyticus</i> .	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	ToxRS/ new	Grupo DGREA	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	+	+	-	-	-	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

Se observa la clasificación de las cepas clínicas de acuerdo a la presencia (+) o ausencia (-) de los marcadores genéticos *tlh*, *tdh*, *trh*, *orf8* y *toxRS/new*. En la penúltima columna se observa la clasificación según el patrón DGREA. ST: secuencia tipo determinadas por MLST.



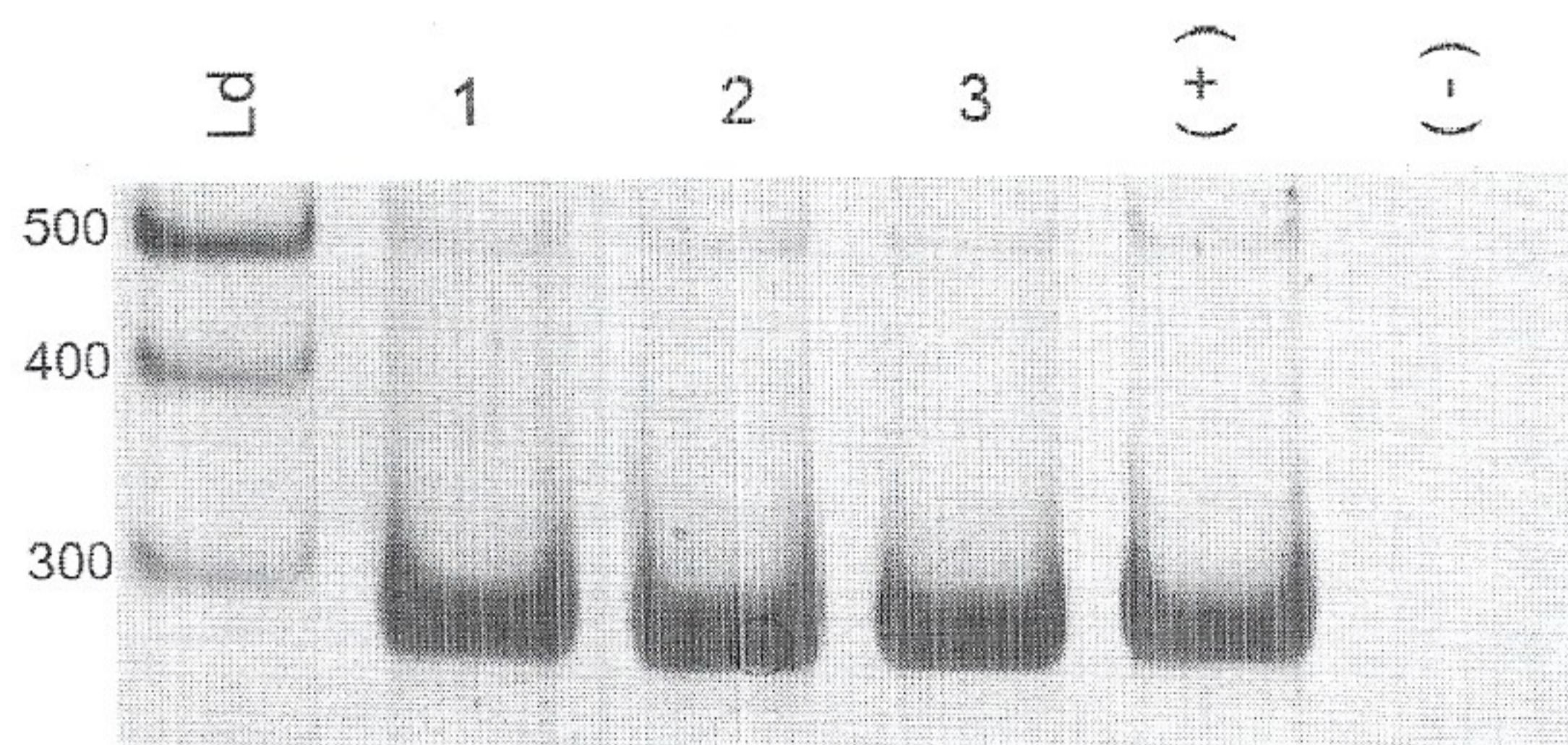
**Figura 1.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de la amplificación de los marcadores moleculares. a) Se observa la amplificación de *tlh* (450pb), *tdh* (270pb) y *trh* (500pb). VpAQ es la cepa control que es positiva para los tres marcadores. En cada carril se observa la cepa tipo de cada uno de los grupos. b) Se observa la amplificación de *orf8* (1058pb) y *toxRS/new* (651pb). 1 y 3 muestran la cepa pandémica; 2 y 4 se observa la cepa PMC 72.7. Ld indica el marcador de peso molecular 100 bp.



**Figura 2.** Patrón DGREA de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de los casos clínicos del 2007 en Puerto Montt. Se observa que las cepas no pandémicas muestran un patrón característico de digestión de DNA con la enzima *NaeI*, distinto al exhibido por la cepa pandémica VpKx. Ld indica el marcador de peso molecular 100 bp.

## 2. Descripción del gen *tdh* de las cepas clínicas no pandémicas.

Las cepas positivas para el gen *tdh* diferentes de la cepa pandémica, no se habían encontrado en los brotes de los tres veranos anteriores en Puerto Montt como se explicito anteriormente. Debido a que ambas copias del gen *tdh* y la isla de patogenicidad en la cepa pandémica están flanqueadas por secuencias asociadas a los elementos de inserción y existe evidencia de la propagación de este gen entre el género *Vibrio* (Terai, 1991; Nishibuchi, 1995), se estudió la posibilidad de que el gen *tdh* encontrado en las cepas clínicas no pandémica tenga su origen en la cepa *VpKx*. Con este objetivo se amplificó y secuenció el gen *tdh* de los dos grupos no pandemicos eligiendose una cepa tipo para cada grupo, PMC60.7 para el grupo que presenta *tdh* y *trh*, y PMC38.7 para el grupo que solo presenta *tdh*. Además se secuenció el *tdh* de la cepa PMC72.7 representante del grupo del clon pandémico. La figura 3 presenta los resultados de la amplificación del *tdh*.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de las amplificaciones del gen *tdh*. Los carriles 1, 2 y 3 muestran la amplificación del gen *tdh* de la cepa PMC72.7, PMC38.7 y PMC60.7 respectivamente. (+) es el control positivo del clon pandémico *VpKx*. (-) es el control negativo. El amplicón tiene 270 pares de bases. Ld muestra el marcador de peso molecular 100 bp.

Los amplificados fueron purificados mediante kit y una vez cuantificada la cantidad de DNA obtenida se mandó a secuenciar a Macrogen (Corea del Sur). Debido

a que la cepa pandémica posee dos copias de *tdh* (*tdhS* y *tdhA*) la secuencia obtenida del amplificado corresponde a la suma de ambos genes y muestra polimorfismo en los pocos sitios en que la secuencia de estos dos genes difiere.

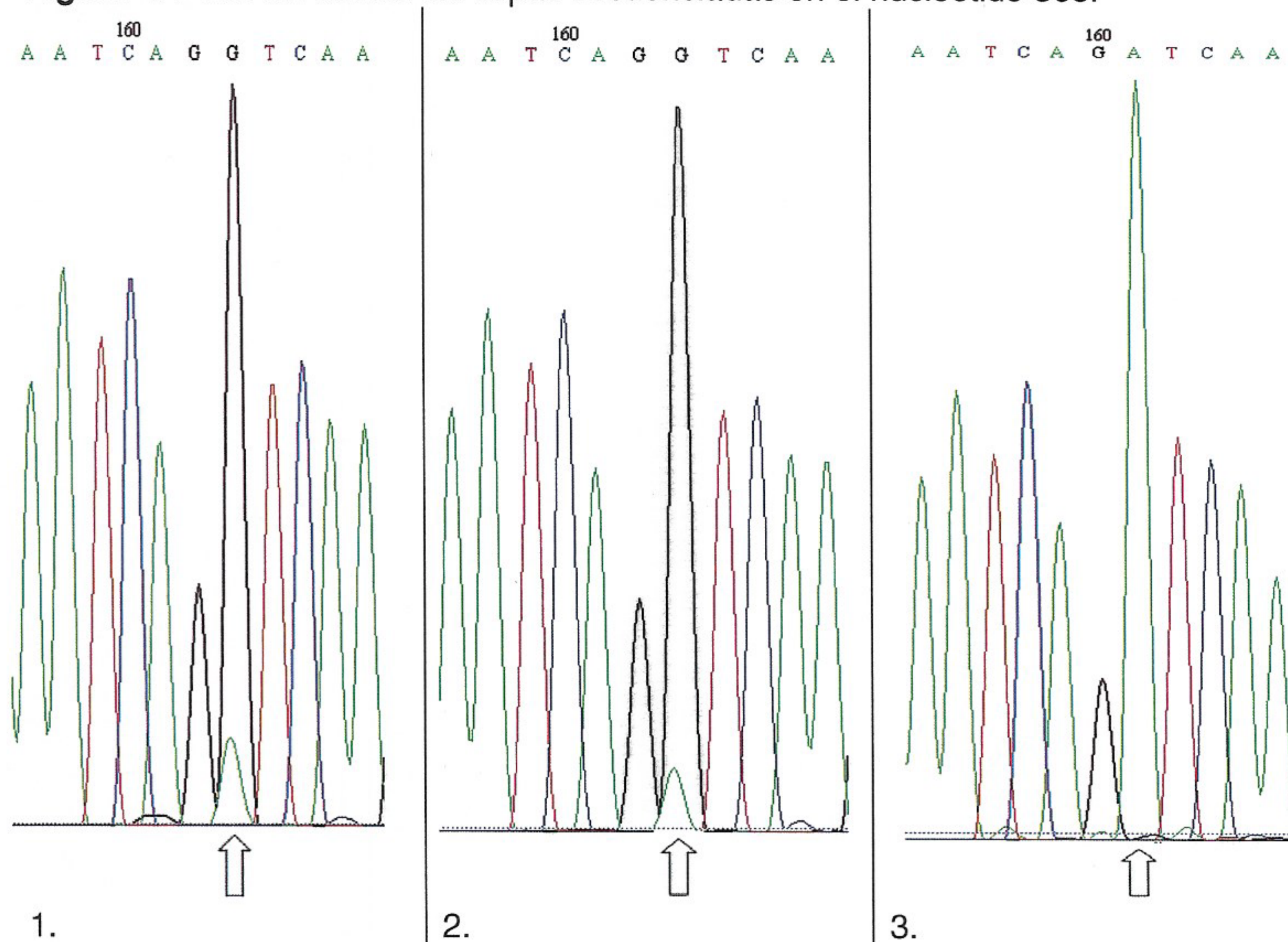
La secuencia del amplicón de la cepa PMC60.7 resultó igual a la secuencia del gen *tdhA* (Makino y col., 2003) excepto por un nucleótido en la posición 318. En el caso de la cepa PMC38.7 mostró un perfil igual a la esperada para una mezcla de los genes *tdhS* y *tdhA* de la cepa pandémica. La misma secuencia se observó en el caso del clon PMC72.7 correspondiente a la cepa pandémica. Este resultado sugiere que la cepa PMC38.7 contiene ambas copias del gen *tdh* (Tabla 3, Figura 4). En la figura 4 se observa un ejemplo de los perfiles obtenidos para las tres cepas en un nucleótido. Se observa como en la posición 368 de las secuencias de las cepas PMC72.7 y PMC38.7 aparecen dos nucleótidos, uno correspondiente a *tdhA* y el otro a *tdhS*. En la cepa PMC60.7 en cambio se observa solo el nucleótido correspondiente al gen *tdhA*.

**Tabla 3.** Comparación de las secuencias en los sitios de polimorfismo en el gen *tdh*.

P. gen <i>tdh</i>	Cepa pandémica		N. PMC60.7	N. PMC38.7	N. PMC72.7
	<i>tdhS</i>	<i>tdhA</i>	<i>tdhA</i>	<i>tdhS</i> / <i>tdhA</i>	<i>tdhS</i> / <i>tdhA</i>
220	G	A	A	G	G
268	T	C	C	T/C	T/C
318	A	A	T/A	A	A
337	A	C	C	A/C	A/C
338	G	A	A	G	G
368	G	A	A	G/A	G/A
378	A	G	G	A/G	A/G
394	A	G	G	A/G	A/G

La columna "P. gen *tdh*" indica la posición del nucleótido en la secuencia de ambas copias del gen *tdh*; "*tdhS*" indica el nucleótido en el gen *tdhS*; "*tdhA*" indica el nucleótido en el gen *tdhA*; "N. PMC60.7" indica el nucleótido obtenido de la secuenciación del gen *tdh* de la cepa PMC60.7; "N. PMC38.7" indica el nucleótido obtenido de la secuenciación del gen *tdh* de la cepa PMC38.7; "N. PMC72.7" indica el nucleótido obtenido de la secuenciación del gen *tdh* de la cepa PMC72.7. La línea diagonal separa al componente mayor a la izquierda y el componente menor a la derecha que se observaron en los perfiles de la secuenciación.

**Figura 4.** Perfil del *tdh* de las cepas secuenciadas en el nucleótido 368.



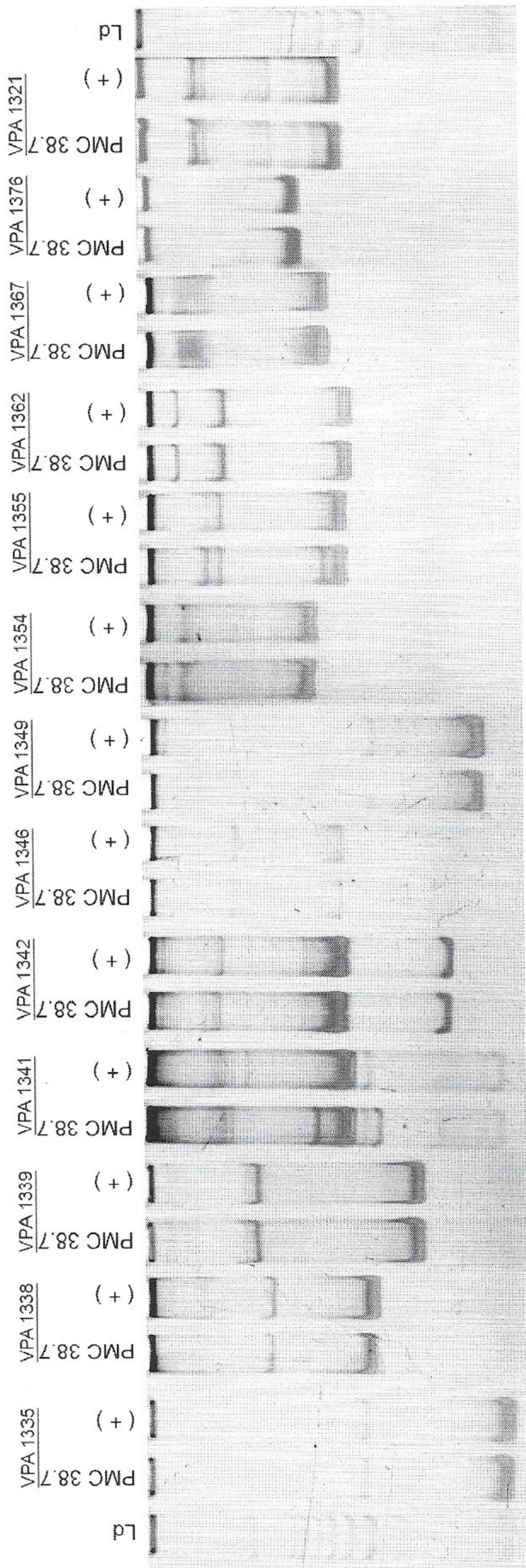
En el nucleótido 368 la secuencia del gen *tdhS* exhibe una G y *tdhA* en la misma posición muestra una A. 1. Se observa la mezcla esperada de la secuenciación de ambos *tdh* en la cepa PMC72.7 para esta posición; 2. Se observa que en PMC38.7 hay un perfil similar que el representante del grupo del clon pandémico; 3. La cepa PMC60.7 muestra en la posición 368 solo el nucleótido correspondiente a la secuencia de *tdhA*.

### 3. Análisis de la amplificación y secuencia de los genes de la isla de patogenicidad en cepas no pandémicas de Puerto Montt.

Las observaciones hechas en el gen *tdh* sugirieron la presencia en la cepa PMC38.7 de los genes *tdhA* y *tdhS*. Como estos dos genes están ubicados en los extremos de la isla de patogenicidad, junto con los genes del T3SS2, se amplificaron estos últimos para explorar la posibilidad de que toda la isla estuviera presente en esta cepa. Se amplificaron además los genes *VPA1321* y *VPA1376* ubicados en los extremos de la isla, cerca de los genes *tdhA* y *tdhS* respectivamente. La obtención de productos del tamaño esperado en todas las amplificaciones indicó que los genes T3SS2 y *VPA1321* y *VPA1376* están presentes en la cepa PMC38.7 (Figura 5).

Para conocer la identidad que tienen estos genes de la cepa PMC38.7 con los de la cepa pandémica VpKx, se secuenciaron los amplicones obtenidos. Las secuencias fueron ensambladas manualmente, luego se realizó un BLAST con la base de datos de la NCBI. Los resultados de estas secuencias indican que todos los genes, excepto por un nucleótido en el gen *VPA1342*, presentan 100% de identidad con la cepa pandémica.

Los genes T3SS2 no son exclusivos de la cepa pandémica (Meador y col., 2007) por lo cual se estudio la posibilidad de que se encontraran en otras cepas, tanto clínicas como ambientales, aisladas en la zona de Puerto Montt. Se eligió una cepa tipo de cada uno de los 13 grupos DGREA ambientales (ver métodos) y una cepa de los nuevos grupos clínicos del año 2007 (PMC60.7, 53.7, 75.7) para examinar la presencia del gen *VPA1335*. De todas las cepas analizadas solo la PMA339, aislada el año 2004, dio positiva para esta amplificación.



**Figura 5.** Amplificaciones del sistema de secreción tipo 3 (T3SS2) y de los genes VPA1321 y VPA1376 de la cepa PMC38.7. Los resultados indican que PMC38.7 presenta los genes T3SS2, VPA1321 y VPA1376. (+) VpKx, control positivo; cada amplificación se realizó con un control negativo (carriles no mostrados); Ld muestra el marcador de peso molecular 100 bp.

Se procedió a realizar amplificaciones en PMA339 con los demás genes T3SS2. Los resultados muestran amplificación positiva para todos estos genes. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados y luego ensamblados manualmente, para posteriormente realizar un BLAST en la base de datos NCBI. En todos los BLAST de las secuencias de PMA339 se obtuvo un solo resultado correspondiente a los genes T3SS2 de la cepa pandémica, ubicados dentro de la isla de patogenicidad. Sin embargo, los genes de ambas cepas muestran diferencias significativas. El rango de disimilitud varía entre el 0,6% de VPA1362 al 6,2% para VPA1346 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Comparación de las secuencias de T3SS2 de la cepa PMA339 y la cepa pandémica.

Genes T3SS2	Pb	Mismatched	Gap	% identidad
VPA1335	149	1	0	99,3%
VPA1338	449	3	0	99,3%
VPA1339	309	3	0	99%
VPA1341	394	15	0	96,1%
VPA1346	226	14	2	93,8%
VPA1349	130	2	0	98,4%
VPA1354	483	4	2	99,1%
VPA1355	394	4	0	98,9%
VPA1362	358	2	0	99,4%
VPA1367	457	22	2	95,1%

Pb indica las pares de bases analizadas de cada gen. Mismatched indica la cantidad de pares de bases distintas en los genes T3SS2 del clon ambiental PMA339 con respecto a la cepa pandémica VpKx. Gap indica cuantas inserciones/deleciones existen dentro de la secuencia de PMA339 para lograr máximo alineamiento posible con respecto a la cepa pandémica.



#### 4. Análisis de secuencia de genes esenciales mediante tipificación por secuencia de multilocus (MLST) de los aislados clínicos.

En colaboración con el Dr. Narjol González-Escalona (actualmente en FDA/GCSL, Estados Unidos) se estudiaron las secuencias de los genes “housekeeping” de las cepas patógenas emergentes que contenían los genes asociados a patogenicidad para establecer un posible origen.

La tipificación mediante MLST de los genes “housekeeping” (*recA*, *dnaE*, *gyrB*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC* y *tnaA*) se realizó en las cepas tipo PMC38.7 y PMC60.7. Las secuencias tipo (ST) obtenidas corresponden a los grupos determinados con los otros análisis realizados (Tabla 1).

Se encontró que las secuencias de las cepas tipo PMC38.7 y PMC60.7 en conjunto no corresponden a ninguna ST descrita en la base de datos. Sin embargo, existen alelos de los genes en particular que si se encontraron. Estos ST encontrados para PMC38.7 y PMC60.7, se nombraron ST 63 y ST 64, respectivamente (Tabla 5). Las secuencias encontradas en este estudio se publicaron en la base de datos <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>. En la tabla 5 se muestran los perfiles alélicos de las ST encontradas y dos perfiles más de interés. El ST 3 corresponde a la cepa pandémica VpKx y el ST 17 a una cepa aislada en España que mostró 2 alelos iguales a los de la cepa PMC38.7. Se hace notar que estos dos ST3 y ST 17 comparten el alelo 19 para el gen *recA*.

Se estudiaron las secuencias de los alelos distintos entre ST 63, ST 64, ST 3 y ST 17. Entre los alelos *dnaE*-7 y *dnaE*-13 la diferencia fue de 6 nucleótidos; para *gyrB*-38 y *gyrB*-10 fue de 7 nucleótidos; para *recA*-34 y *recA*-19 fue de 14 nucleótidos; para *pyrC*-8 y *pyrC*-27 fue de 6 nucleótidos; para *tnaA*-2 y *tnaA*-21 fue de 4 nucleótidos; para *dnaE*-7 y *dnaE*-3 fue de 2 nucleótidos; para *gyrB*-38 y *gyrB*-4 fue de 7 nucleótidos;

para *dtdS*-27 y *dtdS*-4 fue de 12 nucleótidos; para *pntA*-28 y *pntA*-29 fue de 7 nucleótidos; para *pyrC*-8 y *pyrC*-4 fue de 5 nucleótidos y para *tnaA*-2 y *tnaA*-22 fue de 7 nucleótidos.

El perfil alélico de la cepa PMC60.7 ST 64 contiene cuatro secuencias no descritas previamente. No se encontró ningún perfil parecido con los alelos descritos en la base de datos.

**Tabla 5.** Perfiles alélicos de las secuencias tipo analizadas.

Cepa	ST	<i>dnaE</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>dtdS</i>	<i>pntA</i>	<i>pyrC</i>	<i>tnaA</i>	Fuente
PMC 38.7	ST 63	7	38 (nuevo)	34 (nuevo)	27	28	8	2	Este estudio
PMC 60.7	ST 64	40 (nuevo)	39 (nuevo)	3	18	4	36 (nuevo)	29 (nuevo)	Este estudio
VpKx	ST 3	3	4	19	4	29	4	22	BD
Cepa española	ST 17	13	10	19	27	28	27	21	BD

Se observan los perfiles de los secuencias tipo. ST63 y ST64 corresponde a la cepa tipo PMC38.7 y PMC60.7, respectivamente. ST3 corresponde a la cepa pandémica. ST17 corresponde a una cepa aislada en España. Los alelos no descritos en la base de datos se muestran con "(nuevo)". BD = Base de datos <http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de esta memoria contribuyó a comprender la evolución de las cepas de *V. parahaemolyticus* obtenidas de casos clínicos ocurridos en la zona de Puerto Montt en el verano del año 2007.

La tendencia existente es que los casos clínicos han disminuido en los últimos años en los brotes de la zona de Puerto Montt. El año 2007 solamente hubo 475 casos, esto puede deberse a las campañas de salud pública que se han efectuado y también a las variaciones en la temperatura que ha sufrido la zona de Puerto Montt debido a fenómenos como “la niña” o “el niño”. Hasta el 2006 todos los aislados clínicos coincidían con el perfil genético del clon pandémico originado en el sudeste asiático (Gonzalez-Escalona y col. 2005, Fuenzalida y col. 2006). Sin embargo, el año 2007 el 71% de los casos clínicos estaba asociado a la cepa pandémica. Once nuevos aislados fueron caracterizados y clasificados en cuatro nuevas cepas, lo que sugiere que el clon pandémico podría estar siendo desplazado por otras cepas, tanto patógenas como no patógenas, más aptas al medio.

El grupo representado por la cepa tipo PMC38.7 responsable del 13% de los casos, al parecer adquirió la isla de patogenicidad de la cepa pandémica recientemente. La alta similitud entre los genes dentro de la isla de patogenicidad de esta cepa con los de la cepa pandémica (*tdhS*, *tdhA*, *VPA1321*, *VPA1376* y los genes T3SS2) y la diferencia significativa entre las secuencias de sus genes “housekeeping”, junto con las diferencias en el patrón DGREA podría explicarse por la transferencia génica de la isla de patogenicidad de la cepa pandémica a una cepa de la población autóctona. Un detallado análisis de la isla genómica en la cepa PMC38.7,

sus sitios de integración y sus regiones flanqueantes, probablemente ayudarán a diferenciar entre los posibles mecanismos de transferencia del DNA.

La presencia de los genes T3SS2 no es exclusiva de la cepa pandémica y PMC38.7; también fueron encontradas en una cepa ambiental aislada el año 2004, PMA339. Sin embargo, esta cepa no ha sido encontrada entre los casos clínicos. Los genes T3SS2 también han sido encontrados en otros aislados clínicos de *V. parahaemolyticus* (Meador y col. 2007), pero esta es la primera vez que se observa en un aislado ambiental. Aunque, de acuerdo a las secuencias obtenidas desde PMA339, los genes T3SS2 en PMA339 tienen una disimilitud significativamente mayor que aquella encontrada en la comparación entre VpKx y PMC38.7.

Entre los nuevos aislados clínicos la cepa PMC53.7 fue observada previamente en aislados ambientales, presentando el mismo patrón que el grupo DGREA 1.5, además carece de los marcadores de patogenicidad *tdh* y *trh*. Otra cepa que carece de estos marcadores fue aislada, PMC 75.7, que no había sido observada anteriormente. Aunque estas cepas no presentan los genes asociados a patogenicidad no es inusual que se encuentren asociados a casos clínicos (Nishibuchi y col. 1995, Bhoopong y col. 2007). Esto podría explicarse por cambios *in vivo* de la cepa durante el curso de la enfermedad, tales como delección de genes, o que el paciente fuera infectado por varias cepas al mismo tiempo, incluyendo cepas no-patógenas y que estas últimas fueron aisladas. También podría existir un mecanismo de patogenicidad, aun no descrito que permite que las cepas que no presentan los genes *tdh* y *trh* promuevan la enfermedad. Sin embargo, lo más probable para estas cepas sin *tdh* y *trh*, en especial para la observada en muestras ambientales en años anteriores, es que los pacientes fueron infectados por varias cepas al mismo tiempo y que haya proliferado la cepa no-patogena junto con alguna patógena.

Otro de los grupos clínicos descritos representado por la cepa PMC60.7 contenía tanto *tdh* como *trh*. En este caso, se observó que el gen *tdh* correspondería a una de las copias del gen que contiene la cepa pandémica, *tdhA*. Sin embargo, poco se puede decir del origen de esta cepa. Su patrón DGREA es distinto a lo observado en años anteriores y cuatro de los alelos en su perfil ST no habían sido descritos previamente.

## CONCLUSIONES

1. Existen cambios significativos en la epidemiología de *V. parahaemolyticus* ya que se observaron cepas patógenas emergentes en los casos clínicos desplazando al clon pandémico, que antes del año 2007 se describió como el único responsable de los casos clínicos en el sur de Chile.
2. La comparación de genes de la isla de patogenicidad y genes cromosómicos entre el aislado clínico emergente el año 2007 PMC38.7 y la cepa pandémica VpKx, sugiere fuertemente que el nuevo grupo de aislados clínicos habrían recibido la isla de patogenicidad de la cepa pandémica recientemente.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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**: 215-225.
- 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**: 1544-1550.
- Cabello, F.C., Espejo, R.T., Hernandez, M.C., Rioseco, M.L., Ulloa, J., y Vergara, J.A. (2007) *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. *Emerg Infect Dis* **13**: 655-656.
- Chun, D., Chung, J.K., Tak, R., y Seol, S.Y. (1975) Nature of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* **12**: 81-87.
- DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., y Cook, D.W. (2000) Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol* **66**: 4649-4654.
- Fuenzalida, L., Hernandez, C., Toro, J., Rioseco, M.L., Romero, J., y 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.
- Fuenzalida, L., Armijo, L., Zabala, B., Hernandez, 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**: 270-275.
- Gendel, S.M., Ulaszek, J., Nishibuchi, M., y DePaola, A. (2001) Automated ribotyping differentiates *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains associated with a Texas outbreak from other clinical strains. *J Food Prot* **64**: 1617-1620.
- Gonzalez-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M.L., Vergara, J.A., Cabello, F., Romero, J., y Espejo, R.T. (2005) *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* **11**: 129-131.
- Honda, T., Ni, Y.X., y Miwatani, T. (1988) Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect Immun* **56**: 961-965.
- Jolley, K.A., Chan, M.S., y Maiden, M.C. (2004) mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **5**: 86.
- Kaneko, T., y Colwell, R.R. (1973) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J Bacteriol* **113**: 24-32.
- Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J.J., y Nishibuchi, M. (1993) *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that

- mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J Bacteriol* **175**: 3844-3855.
- 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**, 395–406.
- Mahillon, J., y Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 725-774.
- 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**: 3140-3145.
- 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., y Iida, T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *Lancet* **361**: 743-749.
- Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., and Pousa, A. (2005) Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg Infect Dis* **11**: 1319-1320.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.C., Depaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J., 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**: 578-585.
- 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**: 1133-1139.
- Myers, M.L., Panicker, G., y Bej, A.K. (2003) PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2194-2200.
- 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**: 2156-2161.
- 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**: 2093-2099.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S.L., Janda, J.M., y Nishibuchi, M. (1997, a) Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol* **35**: 1965-1971.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Garg, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., y Nishibuchi, M. (1997, b) 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.



- Schmidt, H., y Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.
- 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**: 1405-1408.
- Taniguchi, H., Hirano, H., Kubomura, S., Higashi, K., y Mizuguchi, Y. (1986) Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathog* **1**: 425-432.
- 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**: 5036-5046.
- Wong, H.C., Liu, S.H., Wang, T.K., Lee, C.L., Chiou, C.S., Liu, D.P., Nishibuchi, M., y Lee, B.K. (2000) Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3981-3986.

