

OCH-FG
Biotecnología
L 579
C 1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

DIVERSIDAD GENETICA GENERADA EN UNA POBLACION CLONAL DE *Vibrio*
parahaemolyticus CAUSANTE DE LOS BROTES DE DIARREA OCURRIDOS EN
CHILE EN 1998 Y 2004.

Memoria de Titulo

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Titulo de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Ursula León Retamal

Julio, 2005
Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Romilio Espejo T.





**“DIVERSIDAD GENÉTICA GENERADA EN UNA POBLACIÓN
CLONAL DE: *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE DE LOS
BROTOS DE DIARREA OCURRIDOS EN CHILE EN 1998 Y
2004.”**

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

URSULA LEON RETAMAL.

Dr. Romilio Espejo Torres
Director de Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente Comisión

Dr. Nicolás Guiliani
Corrector

Santiago de Chile, Diciembre de 2005



A mi vida entera. Mi hija Catalina.....

Agradecimientos.

Quisiera agradecer al Dr. Romilio Espejo por permitir realizar mi tesis en su laboratorio. Por su dedicación y paciencia al traspasar sus conocimientos, su sinceridad respecto a los errores que cometí, por que de esa forma entendí que los cometía y trate de solucionarlos. Por su buen humor y comprensión respecto de mi situación personal. Gracias.

Agradecer también a Claudia Acevedo y Narjol González por enseñarme todo lo que hay que saber de un laboratorio, a como manejarlo y trabajar en él. Gracias.
A todos los que conocí en mi estadía en el Laboratorio, de los que siempre se puede aprender algo nuevo. Gracias.

Agradecer a mi familia y seres queridos por apoyarme siempre. Cuando debía estudiar ó hacer un trabajo ó simplemente dormir más, por que estaba cansada. Agradecer especialmente este último tiempo de apoyo, que es cuando más lo he necesitado. Gracias.

Agradecer muy especialmente a mi madre que hizo posible que pudiera tener todo el tiempo que necesita para desarrollar de una manera integral mi tesis, al facilitarme la tarea de madre a mí. Infinitas Gracias.

Agradecer a mi hija Catalina por su comprensión, que en este momento no entiende, pero que cuando tenga ocasión de leer esto, lo hará. Por permitirme faltarle cuando me necesitaba, o cuando simplemente quería estar junto a mí. Gracias.

Índice de contenido.

	Página
Agradecimientos	iii
Índice de contenido	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xiv
Introducción	1
Materiales y Métodos	6
Obtención de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> y condiciones de cultivo.	6
Purificación de DNA genómico.	8
Cuantificación del DNA.	9
Amplificación mediante PCR.	9
Electroforesis en geles de poliacrilamida: (PAGE).	10
Test de ureasa.	11
Serotipificación.	12
Fenotipia.	12
Extracción DNA y digestión para PFGE.	13
Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE).	14

Construcción de dendrogramas.	14
Resultados.	15
Caracterización de aislados obtenidos del brote en el norte de Chile (Arica – Coquimbo, Febrero a Agosto de 1998).	15
Patrón espaciadores 16S-23S rDNA.	18
Patrón por AP-PCR.	20
Fenotipia.	22
RFLP-PFGE.	25
Agrupamiento de los aislados pertenecientes al Complejo clonal según los diferentes métodos analizados.	29
Discusión.	31
Caracterización aislados Chilenos pertenecientes al Complejo clonal.	31
Genes propios de Complejo clonal.	32
Serotipos.	32
Patrón de espaciadores 16S-23S rDNA.	34
Fenotipia.	34
Caracterización por métodos Moleculares con mayor resolución.	36
AP-PCR.	36
RFLP-PFGE.	37
Agrupamiento de los aislados pertenecientes al Complejo clonal según los diferentes métodos analizados.	38

Conclusión.	40
Referencias.	42
Anexo.	45

Índice de Figuras.

	Página
1. Ilustración de prueba de aglutinación de las bacterias.	17
2. Patrón de los espaciadores 16S-23S rDNA encontrados en los aislados clínicos y de mariscos.	19
3. Patrón por AP-PCR encontrados en los aislados clínicos y de mariscos.	21
4. Ilustración de los resultados de la galería API 20E para los aislados clonales.	23
5. Dendrograma asociado a los resultados del API 20E para los aislados clonales probados.	24
6. Patrones observados por PFGE de los aislados clonales Chilenos y del Sudeste asiático.	27
7. Dendrograma asociado a los patrones observados por PFGE de los aislados clonales.	28
8. Dendrograma asociado a las diferencias encontradas en cada uno de los aislados chilenos pertenecientes al Complejo clonal por cada uno de los métodos estudiados.	30

Índice de Tablas.

	Página.
1. Aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> utilizados en este estudio.	7
2. Partidores utilizados en la identificación de aislados pertenecientes al Complejo clonal pandémico.	10
3. Propiedades de las 23 cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> aisladas en el norte de Chile entre Febrero y Agosto de 1998.	16

Lista de abreviaturas.

UNIDADES DE MEDIDA

μl: microlitros
lt: litro
pb: pares de bases
Kb : kilo bases
°C: grados celcius.
V: volts
r.p.m: revoluciones por minuto.
nm: nanometro
ng: nanogramos
hr: hora

REACTIVOS

TBE: Tris-Borato , EDTA.
APS: persulfato de amonio.
PMSF: Phenyl methyl sulphonyl fluoride.

TECNICAS

RFLP-PFGE: Restriction fragment length polymorphism – pulsed field geles electrophoresis
MLST: multilocus sequence typing,
AP-PCR: Arbitrarily primed polymerase chain reaction
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida.

VpKX: *Vibrio parahaemolyticus* cepa KXV237.
DNA: ácido desoxiribonucleico
RNA: ácido ribonucleico
rDNA: ácido desoxiribonucleico ribosomal.
ORF. open reading frame: marco de lectura abierto.

Resumen

V. parahaemolyticus es una bacteria marina capaz de provocar gastroenteritis en humanos. Es responsable de la mayoría de las diarreas ocasionadas por consumo de mariscos crudos. Las diarreas por *V. parahaemolyticus* eran poco frecuentes y solo se observaban esporádicamente en el norte de Chile, durante el verano. El primer gran brote de diarrea por *V. parahaemolyticus* registrado ocurrió en el Norte, principalmente en Antofagasta y alrededores en 1998, con aproximadamente 300 casos clínicos registrados. A éste le han seguido dos brotes en el Sur. El primero principalmente en Puerto Montt y alrededores con cerca de 3000 casos clínicos, y el segundo principalmente en la misma región pero que se extendió por todo Chile ocasionando 10.000 casos, aproximadamente. Las bacterias aisladas de casos clínicos del brote en Antofagasta y del primero en Puerto Montt corresponden al denominado complejo clonal pandémico que ha causado la mayoría de los brotes en el Sudeste asiático a partir de 1996. El complejo clonal pandémico corresponde a un grupo de bacterias patógenas que comparten una serie de características, entre las que se incluye el serogrupo O3:K6, la presencia de una hemolisina TDH, de un único marco de lectura abierto ORF8, de una secuencia diferente al interior del operon *toxRS*, denominada *toxRS/new* y la ausencia de TRH acompañado de un negativo test de ureasa. Pero quizás lo que mejor los identifica son los patrones muy similares obtenidos por amplificación con partidores arbitrarios (AP-PCR) y de los fragmentos de restricción obtenidos por PFGE. Su naturaleza clonal está también demostrada por análisis de las secuencias de varios loci (multilocus sequence typing, MLST).

Aunque los estudios realizados en distintos aislados del complejo clonal del Sudeste asiático muestran una gran homogeneidad entre aislados, recientemente se ha mostrado cierto grado de diversidad al interior de este Complejo clonal, como lo es el surgimiento de nuevos serogrupos distintos al O3:K6, como O4:K12, O4:K68, O1: KUT, y la ausencia de ciertas propiedades comunes, como la pérdida de ORF8.

Las bacterias aisladas de los brotes en Chile (Antofagasta-1998 y Puerto Montt-2004) pertenecen al Complejo clonal pandémico y constituyen un grupo homogéneo, indistinguible por las propiedades descritas anteriormente.

Este trabajo consistió en el estudio del grado de diversidad que se ha generado al interior del Complejo en el tiempo transcurrido desde su arribo a Chile, estudiando un grupo de aislados, tanto clínicos como de mariscos, obtenidos durante los brotes ocurridos en Chile en 1998 y 2004. Se incluyeron aislados del Complejo clonal de los brotes ocurridos en Antofagasta-1998 y Puerto Montt-2004, con la expectativa de que las posibles diferencias entre ellos podrían indicar su posible origen y dispersión desde su arribo a Chile. Se estudió la diversidad en un grupo de 66 aislados clonales mediante el patrón de espaciadores 16S-23S rDNA, AP-PCR, patrón por RFLP-PFGE y propiedades metabólicas. Previamente y con el objeto de aumentar el número de aislados clonales, de diferente origen geográfico y temporal al de los aislados clonales disponibles, se analizaron otros 40 aislados obtenidos tanto de casos clínicos como de mariscos del brote ocurrido en el norte en 1998, por las características clásicas que definen clonalidad antes mencionadas. De este estudio se obtuvieron 18 aislados clínicos clonales de un total de 20 muestras clínicas y 5 aislados de mariscos clonales de un total de 20 muestras de mariscos que contenían *V. parahaemolyticus*. Estos aislados junto a los obtenidos anteriormente conformaron los 66 aislados estudiados.

El análisis por espaciadores 16S-23S rDNA no permitió distinguir diferencias entre aislados clonales. Por otro lado el análisis por AP-PCR permitió observar 3 grupos y, finalmente, el análisis por RFLP-PFGE permitió observar 5 grupos. En este estudio se incluyeron además aislados clonales del Sudeste asiático con el objeto de explorar el posible origen de las cepas clonales chilenas. En general, los resultados indicaron que el conjunto de los aislados chilenos constituyen un grupo mayoritario conformado también por la mayoría de los aislados asiáticos estudiados. Los demás están formados por aislados asiáticos y chilenos. De los grupos chilenos se destacan, dos formados por aislados clonales de mariscos, el otro por solo dos aislados de Chile, uno proveniente de Coquimbo-1998 y el otro de Puerto Montt-2004 y un último grupo conformado por un aislado que presenta un fragmento adicional de 324 kb .

Las propiedades metabólicas estudiadas en aislados representativos del conjunto de aislados clonales chilenos permitieron reconocer 3 grupos que se distinguen por la presencia o ausencia de dos enzimas: Lisina descarboxilasa y Ornitina descarboxilasa. Estas propiedades permitieron agrupar a los aislados de mariscos con la cepa tipo VpKX, no así la mayoría de los aislados clínicos.

La diversidad encontrada en los aislados chilenos pertenecientes al Complejo clonal pandémico es menor que la encontrada en los del Sudeste asiático. Esta diversidad podría haberse generado en Chile a partir de una sola cepa llegada al país solo dos años después de su aparente surgimiento en el Sudeste asiático en 1996.

No fue posible diferenciar entre los aislados pertenecientes a los brotes del norte de Chile de los del sur por los análisis realizados. Pero la presencia de aislados con el mismo patrón por PFGE en el norte y el sur, en distintos tiempos sugiere que las mismas bacterias llegadas al Norte del país podrían haberse propagado al Sur.

En todos los análisis la mayoría de los aislados chilenos agruparon con el aislado del Sudeste asiático VpKX, sugiriendo que este podría constituir el grupo original.

Abstract.

V. parahaemolyticus is a marine bacteria able caused gastroenteritis in humans, it is responsible for the majority of diarrheas caused by consumption of raw shellfish. These diarrheas are unfrequent and they only appear in North Chile in summer time. The first registred outbreak of diarrhea caused by *V. parahaemolyticus* occurred mainly in Antofagasta and surroundings in 1998, with approximately 300 clinical cases registered. To this outbreak followed two more in the South. The first one mainly in Puerto Montt and surroundings with near 3000 clinical cases, and the second mainly in the same region but it extended for all Chile causing 10.000 cases, approximately. The bacteria isolated from clinical cases in Antofagasta and in the first outbreak in Puerto Montt correspond to the called pandemic clonal complex that has caused the majority of the Asian Southeast outbreaks in 1996. This complex corresponds to a group of pathogenic bacteria that share a series of characteristic that includes the serovar O3:K6, The precense of a TDH hemolisine, that has only one open reading frame ORF8, of a different sequence to the inside of the *toxRS* operon, named *toxRS/new* and the absence of TRH with a negative urease test. But perhaps what better identifies them is the very similar patterns obtained by amplification with arbitrary primers (AP-PCR) and of the restriction fragments obtained by PFGE. There clonal nature is also demonstrated by the analysis of various loci sequence (multilocus sequence typing, MLST).

Although the studies carried out in different isolates from the clonal complex of the Asian Southeast show a great homogeneity among isolates, recently certain degree of diversity has been shown inside of this clonal complex like the appearance of new serovar such as

O4:K12, O4:K68, O1: KUT, and the absence of certain common features like the lost of ORF8.

The isolated bacteria from the Chilean outbreak (Antofagasta-1998 and Puerto Montt-2004) belong to the pandemic clonal complex and they constitute a homogeneous group, indistinguishable by the properties described previously.

This work consisted of the study of the degree of diversity inside the complex in the time of its arrival to Chile, studying a group of clinical and shellfish isolates, obtained during the outbreak occurred in Chile in 1998 and 2004. We included isolates from the clonal complex of the outbreak occurred in Antofagasta-1998 and Puerto Montt-2004, with the expectation that the possible differences among them would be able to indicate their possible origin and dispersion since their arrive to Chile. The diversity in a group of 66 clonal isolates was studied by means of the pattern of 16S-23S rDNA spacer region, AP-PCR, by RFLP-PFGE pattern and metabolic properties. Previously and with the purpose to enlarge the number of clonal isolates, of different time and geographical origin to the available clonal isolates we analyzed other 40 isolates obtained of clinical cases and shellfish of the outbreak occurred in the north in 1998, by the classical characteristics that define clonality before mentioned. From this study we obtained 18 clinical clonal isolates of a total of 20 clinical samples and 5 clonal isolates from shellfish of a total of 20 shellfish samples that contained *V. parahaemolyticus*. These isolates plus the ones obtained previously conformed the 66 studied isolates.

The analysis of pattern 16S-23S rDNA spacer region did not it permit to distinguish differences among clonal isolates. On the other hand the analysis by AP-PCR permitted to observe 3 groups and, finally, the analysis by RFLP-PFGE permitted to observe 5 groups. In this study we included also clonal isolates of the Asian Southeast with the purpose of

determine the origin of clonal Chilean strains. In general, the results indicate that the assembly of Chilean isolates constitute a majority group conformed also by the majority of the Asian isolates studied. The others are formed by Asian and Chilean isolates. Of the Chilean groups that are important, two are formed by clonal isolates from shellfish, another by only two clonal isolates from Chile, one from Coquimbo-1998 and the other from Puerto Montt-2004 and a last group conformed by an isolate that presents an additional fragment of 324 kb. The metabolic properties studied in representative clonal isolates of the assembly of Chilean clonal isolates permitted to recognize 3 groups that are distinguished for the presence or absence of two enzymes: Lysine decarboxylase and Ornithine decarboxylase. These properties permitted to group the isolates from shellfish with the type VpKX strain, not like the majority of clinical isolates. The diversity found in Chilean isolates belonging to the pandemic clonal complex is smaller than the one found in those of the Asian Southeast. This diversity could have been generated from the arrival of a single strain only two years after its apparent rise in the Asian Southeast in 1996. It was not possible to differentiate among the isolates belonging to the outbreaks in northern Chile from the ones of southern Chile by the analyses made. But the presence of isolates with the same pattern of PFGE in the north and the south, in different times suggests that the same bacteria that arrived to the North had spread to the South. In all the analyses the majority of the Chilean isolates group with the VpKX isolate from the Asian Southeast, suggesting that this might constitute the original group.

Introducción.

Vibrio parahaemolyticus, una bacteria marina ampliamente distribuida en ambientes marinos, causa la mayoría de las gastroenteritis asociadas al consumo de mariscos crudos (Blake y col., 1980). Su genoma está compuesto de 2 cromosomas, 3.3Mb y 1.9 Mb, y posee 11 operones ribosomales (Makino y col., 2003). Los diferentes aislados pertenecientes a esta especie se pueden clasificar según los antígenos externos que presente, en 13 serotipos O, antígeno ubicado en el LPS de la bacteria, y 71 serotipos K, antígeno ubicado en la cápsula, (Igushi y col., 1995). Las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* se asociaban a diversos serogrupos hasta antes de 1996. A partir de esa fecha, la mayoría de los casos ocurridos en el Sudeste asiático han sido causados por cepas del serogrupo O3:K6 (Bag y col., 1999, Chiou y col., 2000, Okuda y col., 1997). Estudios moleculares con electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) (Arakawa y col., 1999, Wong y col., 2000) y partidores arbitrarios PCR (AP-PCR) (Okuda y col., 1997, Matsumoto y col., 2000), revelan que estas cepas pandémicas poseen patrones de fragmentos de DNA idénticos, indicando que están clonalmente relacionadas, o sea derivan de una misma bacteria, y constituyen lo que se ha denominado “Complejo clonal pandémico”. Los aislados pertenecientes a este grupo muestran una secuencia única al interior del operón *toxRS* (*toxRS/new*), el cual codifica para proteínas de transmembranas involucradas en la regulación de genes asociados a virulencia en el género *Vibrio* (Matsumoto y col., 2000). Estos aislados también poseen un único marco de lectura abierto, ORF8 (Nasu y col., 2000), correspondiente a un fago filamentoso asociado a esta bacteria. Otra propiedad

común de estas cepas pandémicas es la presencia de un gen estructural *tdh* que codifica para la hemolisina, TDH, la cual se considera el mayor factor de virulencia de *V. parahaemolyticus*. Esta hemolisina produce una hemólisis del tipo β en un medio especial de agar sangre llamado “agar Wagatsuma”. Todas las cepas aisladas de muestras clínicas presentan este tipo de actividad hemolítica, conocido como “fenómeno Kanawagua” (KP) (Nishibushi y Kaper, 1995). Estas cepas se caracterizan también por la ausencia de *trh*, el cual codifica para TRH, una hemolisina alternativa, que presenta un 67% de identidad en la secuencia aminoacídica respecto a TDH. Junto a este gen se encuentra el gen de ureasa, el cual también está ausente en las cepas pandémicas (Suthienkul y col., 1995).

Usando todos los criterios anteriores, se han identificado cepas pertenecientes al Complejo clonal pandémico en casos clínicos de brotes de diarrea ocurridos en distintos países del Sudeste asiático como: India, Japón, Tailandia, Bangladesh, Taiwán y Vietnam, entre otros. También se han encontrado casos en Estados Unidos (Bag y col, 1999, Wong y col, 2000, Matsumoto y col, 2000, Bhuyan y col, 2000, Chowdhury y col, 2000a, Daniels y col, 2000, Vuddhakul y col, 2000) y más recientemente en Chile (González y col., 2005).

En los últimos años, se ha mostrado la presencia de cierta diversidad al interior del Complejo clonal pandémico, como lo es el surgimiento de nuevos serogrupos (por ejemplo: O4:K68, O1:K25, O4:K12, O1: KUT), y la ausencia de ciertas propiedades comunes (por ejemplo: ORF8) (Matsumoto y col, 2000, Bhuyan y col, 2000, Chowdhury y col, 2000a).

Epidemiológicamente *V. parahaemolyticus* no ha sido mayormente estudiado en Chile debido a que las infecciones por esta bacteria eran muy poco frecuentes hasta la aparición de los brotes ocurridos en el norte en 1998. Entre 1992 y 1997, el Instituto de Salud Pública (ISP) recibió tan solo 30 aislados provenientes desde laboratorios de hospitales regionales

para confirmación de identidad. Sin embargo, un brote de diarrea ocurrido en el norte de Chile entre noviembre de 1997 y marzo de 1998 causó aproximadamente 300 casos. El brote se extendió al sur alcanzando incluso la ciudad de Coquimbo. Estos casos fueron confirmados mediante estudios bacteriológicos (Córdova y col, 2002).

Un segundo brote de diarrea afectó a aproximadamente 1500 personas en el Sur en la ciudad de Puerto Montt en el verano del 2004, una región de aguas costeras frías. Además de contar con las repercusiones en salud pública, el brote tuvo un gran impacto en lo social y económico de la región, que depende de la producción de mariscos y pescados, pues a una importante disminución en las ventas se sumó la prohibición de extracción de mariscos en esa zona.

Los aislados de *V. parahaemolyticus* obtenidos de muestras clínicas de ambos brotes (Antofagasta-1998 y Puerto Montt-2004) resultaron pertenecer al Complejo clonal pandémico antes descrito, originado en el Sudeste asiático. La caracterización de los aislados mostró una separación de los aislados chilenos con respecto a la cepa tipo pandémica, VpKX, por sus patrones por AP-PCR (González y col., 2005).

Según lo mencionado anteriormente, al interior del Complejo clonal se ha generado cierto grado de diversidad, relacionado con la variación de algunas de las características clásicas que lo definen (pérdida de ORF8 ó cambio de serogrupo). Existen herramientas que permiten resolver más claramente pequeñas diferencias, como lo son la comparación de cepas por patrones de espaciadores 16S-23S rDNA (González y col., 2003), de RFLP-PFGE (Sambrook y Russell, 2001) y de AP-PCR (Welsh y McClelland, 1990). El patrón de espaciadores 16S-23S rDNA permite distinguir diferencias menores dentro de una misma especie, ya que entre los genes 16S y 23S rDNA existen regiones que pueden variar entre

especies y aún entre cepas de la misma especie. Debido a su alto grado de variabilidad ellos constituyen un excelente elemento para distinguir y comparar cepas bacterianas estrechamente relacionadas filogenéticamente. *V. parahaemolyticus* posee 11 operones ribosomales (Makino y col., 2003) siendo un candidato favorecido para comparar y diferenciar los aislados en estudio mediante este método. Otra de las herramientas útiles para resolver diferencias entre los aislados clonales es el patrón de fragmentos de restricción obtenidos del genoma completo, RFLP-PFGE (Sambrook y Russell, 2001). Para observar las diferencias en estos fragmentos es necesario utilizar electroforesis en campo pulsado debido al gran tamaño de los fragmentos ya que sería imposible lograr una separación en geles convencionales. Es posible que al mirar el genoma completo de la bacteria se puedan encontrar variaciones, como rearrreglos, inserciones o deleciones, difícilmente vistos por las técnicas antes utilizadas, debido a que estas sólo permiten conocer información de una pequeña parte del genoma bacteriano. AP-PCR, corresponde al patrón de amplicones obtenido por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (Welsh y McClelland, 1990). En este PCR se utiliza un solo partidor, de secuencia al azar y muy pequeño, alrededor de 10 bp, con el fin de permitir la presencia en el genoma de secuencias complementarias a distancias entre 100 a 1000 bp. El resultado es que se obtiene un patrón de bandas amplificadas representativas de parte del genoma de la bacteria. Si otra bacteria presentase el mismo patrón implicaría que ésta posee una secuencia genómica muy similar a la anterior (Welsh y McClelland, 1990).

Para comprender sobre la diversidad, posible origen y dispersión de las cepas de *V. parahaemolyticus* pertenecientes a este Complejo clonal patógeno que causó los brotes en Chile se estudiaron las características de aislados clínicos y de mariscos obtenidos en los

brotos de 1998 y 2004. En este estudio se utilizaron aislados ya clasificados en Complejo clonal y nuevos aislados del brote ocurrido en el norte de Chile en 1998, caracterizados en esta tesis.

El objetivo general consistió en la determinación de distintas propiedades que pudieran ayudar a entender más sobre la relación filogenética entre los aislados clonales y con estos elementos estimar la diversidad, y el posible origen y propagación de los aislados clonales que provocaron los brotes en Chile.

Materiales y Métodos

Obtención de las cepas de *V. parahaemolyticus* y condiciones de cultivo.

Las cepas de *V. parahaemolyticus* fueron obtenidas del Instituto de Salud Pública (ISP), Servicio Sanitario del Ambiente (SESMA) de Puerto Montt y de Dr. Mitsuaki Nishibuchi, como se muestra en la TABLA 1.

El protocolo de conservación de las cepas consistió en mantener las cepas, previamente aisladas en Agar TCBs (Merck, Alemania), en tubos eppendorf con 1 ml agar de mantención (medio Luria-Bertani (triptona, 1%; extracto de levadura, 0.5%), 3% NaCl y 0.3% agar) a temperatura ambiente o en criotubos, en cultivos en glicerol al 30% a -70°C .

Otras cepas de *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 (VpKX), ATCC17802T (VpD), RIMD 2210856 (VpAQ), RIMD 2210086 (VpI) y la cepa *V. alginolyticus* ATCC17749 (Va) fueron obtenidas directamente desde el Research Institute of Medical Diseases (Japón), siguiendo el mismo protocolo de mantención.

Antes de realizar los estudios, las cepas fueron inoculadas en medio líquido Luria-Bertani suplementado con 3% NaCl y crecidas toda la noche con agitación a 37°C . Luego se sembró 100 μl de este cultivo “overnight” en placas de agar TCBs (Merck, Alemania) y se dejaron crecer a 37°C por toda la noche. Se tomó una colonia de cada aislado para la realización de las diferentes pruebas descritas en este trabajo.

Tabla 1: Aislados de *v. parahaemolyticus* utilizadas en este estudio.

Nombre de la Cepa	Año de aislamiento	Lugar de aislamiento	Origen	Proveídas por
PMA114	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (Ostras)	SESMA
PMA128	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (Cholgas)	SESMA
PMA112	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (Navajuelas)	SESMA
PMA184	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos	SESMA
PMA118	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (Choritos)	SESMA
PMA27	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (ostras)	SESMA
PMA338	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (Almejas)	SESMA
PMA339	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (Almejas)	SESMA
PMA3312.	Enero-04	Pto. Montt	Mariscos (Almejas)	SESMA
HUC-265	Febrero-98	Huasco	Humano	ISP
HUC-266	Febrero-98	Huasco	Humano	ISP
HUC-269	Marzo-98	Huasco	Humano	ISP
HUC-275	Marzo-98	Huasco	Humano	ISP
COC-276	Marzo-98	Coquimbo	Humano	ISP
COC-279	Marzo-98	Coquimbo	Humano	ISP
COC-284	Marzo-98	Coquimbo	Humano	ISP
COC-285	Marzo-98	Coquimbo	Humano	ISP
COC-286	Marzo-98	Coquimbo	Humano	ISP
COC-289	Marzo-98	Coquimbo	Humano	ISP
ATC-296	Marzo-98	Antofagasta	Humano	ISP
ATC-297	Marzo-98	Antofagasta	Humano	ISP
ATC-298	Marzo-98	Antofagasta	Humano	ISP
ATC-316	Abril-98	Antofagasta	Humano	ISP
ARC-324	Abril-98	Arica	Humano	ISP
ARC-329	Abril-98	Arica	Humano	ISP
ARC-336	Abril-98	Arica	Humano	ISP
ARC-344	Abril-98	Arica	Humano	ISP
ATC-345	Abril-98	Antofagasta	Humano	ISP
ATC-375	Julio-98	Antofagasta	Humano	ISP
NOA 51	Diciemb-97	Antofagasta	Mariscos	ISP
COA 20	Febrero-98	Copiapo	Mariscos (ostiones)	ISP
ATA 30	Febrero-98	Antofagasta	Mariscos (cholgas)	ISP
ATA 31	Febrero-98	Antofagasta	Mariscos (cholgas)	ISP
ATA 32	Febrero-98	Antofagasta	Mariscos (cholgas)	ISP
COA 62	Abril-98	Coquimbo	Mariscos (cholgas)	ISP
COA 63	Abril-98	Coquimbo	Mariscos (cholgas)	ISP
ATA 65	Abril-98	Antofagasta	Mariscos (mariscal)	ISP
TAA 66	Abril-98	Taltal	Mariscos (almejas)	ISP
ATA 69	Abril-98	Antofagasta	Mariscos (cholgas)	ISP
KXV237	1996	Kansai A.P	Humano	Dr. Nishibushi
KXV737	1999	V. I	Humano	Dr. Nishibushi
KXV225	1996	Kansai, A.P	Humano	Dr. Nishibushi
OP-424	1998	Osaka, Japon	Humano	Dr. Nishibushi
Vp2	1998	Korea	Humano	Dr. Nishibushi
JKYVp6	1998	Japón	Humano	Dr. Nishibushi
AN-8373	1998	Bangladesh	Humano	Dr. Nishibushi
AN-5034	1998	Bangladesh	Humano	Dr. Nishibushi
97LVp2	1997	Laos	Humano	Dr. Nishibushi
Vp47	1998	Tailandia	Humano	Dr. Nishibushi

A.P.: Aeropuerto V.I.: Viajero internacional.

Purificación de DNA genómico.

La extracción de DNA se realizó con Wizard Genomic Dna purification KIT (PROMEGA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Básicamente este procedimiento comprendió los siguientes pasos:

Las bacterias se crecieron en 3 ml de medio LB suplementado con 3% NaCl, a 37°C con agitación de 150 r.p.m. durante toda la noche. De 1 ml de cultivo, se recolectaron las células mediante centrifugación a 13000 g x 2 min. El pellet se resuspendió en 600 µl de "Nuclei Lysis Solution", mezclando suavemente por pipeteo, se incubó por 5 min. a 80°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se agregó 3 µl de "Rnase Solution" incubándose a 37°C por 30 min. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 µl de "Protein Precipitation Solution" agitándose vigorosamente en vórtex durante 30 s., se incubó en hielo por 5 min., y se centrifugó a 16000 g x 3 min.

El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio que contenía 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, mezclándose cuidadosamente hasta visualizar el ovillo de DNA. Se centrifugó a 16000 g x 3 min., descartándose el sobrenadante. Al pellet se le agregaron 600 µl de etanol al 70%, repitiéndose el paso de centrifugación anterior.

El pellet se secó al vacío por 10 min. para luego rehidratarse en 100 µl de "Rehydration Solution" por 1 hr a 65°C.

Cuantificación del DNA.

La cuantificación se realizó por comparación con estándares de concentración conocida. Para la cuantificación se utilizó 1 μ l del DNA resuspendido y 5 μ l del Standard λ HindIII (GIBCO) diluido 10 veces, y la posterior electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% en TBE 1X (diluido del stock TBE 5X (Tris 54 g, Ácido bórico 27.5 g, 3.7 g EDTA (disódico) para 1L de agua destilada), corrido por 1hr a 70 V. La tinción se realizó con bromuro de etidio (1 mg/ml) durante 30 min. y la visualización se efectuó en transiluminador 200 nm U.V. Los DNAs estaban limpios y no mostraban degradación, resultando con una concentración aproximada de 100 ng/ μ l.

Amplificación mediante PCR.

Para las reacciones de PCR se utilizó aproximadamente 10 ng de DNA por tubo de reacción, exceptuando el AP-PCR en donde se utilizó 25 ng de DNA.

Las amplificaciones de los diferentes marcadores fueron realizadas utilizando los partidores y condiciones de PCR descritas en las referencias señaladas en la Tabla 2.

Tabla 2: Partidores utilizados en la identificación de aislados pertenecientes al complejo clonal pandémico.

Tipo de experimento	Nombre del partidor	Secuencia (5'→3')	Referencia
<i>tdh</i>	Tdh 382-1 Tdh 382-2	GATACCGATATTTTGCAAA ATGTTGAAGCTGTACTIONGA	Suthienkul y col. 1995.
<i>trh</i>	Trh 460-1 Trh 460-2	CTCTACTTTGCTTTTCAGT AATATTCTGGAGTTTCAT	Suthienkul y col. 1995.
<i>orf8</i>	VP36RF8U VP36RF8L	GCATACAGTTTGAGGGGAAAG AGCGCTCTTTGTTTTCTATATG	Nasu y col., 2000
<i>toxRS/new</i> (GS-PCR)	GS-VP 1 GS-VP 2	TAATGAGGTAGAAACA ACGTAACGGGCCTACA	Matsumoto y col., 2000
AP-PCR	P1 P3	GGTGCGGGAA GTAGACCCGT	Nasu y col., 2000
16S rDNA	27F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTACCTTGTTACGACTT	Espejo y col., 1997
16S-23S rDNA (ISR)	G1 L1	GAAGTCGTAACAAGG CAAGGCATCCACCGT	Gonzalez y col., 2003

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Las electroforesis de los productos de PCR se realizaron en geles de poliacrilamida al 8%, preparados de la siguiente manera: agua destilada 3.25 ml, acrilamida 15%- bis-acrilamida 0.4% 6.6 ml, TBE 5X 2.5ml, APS (persulfato de amonio) 25% 65 µl, Temed 12.5 µl para un gel. Corridos a 150V por 60min. (AP-PCR, ORF8, 16S rDNA, 16S-23S rDNA) y por 45 min. (*tdh*, *trh*, GS-PCR). El gel se cargo con 4µl de amplificadas.

La tinción de los geles se realizó con nitrato de plata (Sanguinetti y col., 1994), que consistió básicamente en:

Terminada la electroforesis, el gel se retiró de la cámara y se agregaron 50 ml de SOLUCION DE FIJADO (5 ml etanol-acético 10%, 45 ml agua bidestilada) poniéndolo en microondas por 10 s. Esta solución es recuperada para uso posterior.

Luego se agregaron 50 ml de SOLUCION DE TINCION (500 μ l de nitrato de plata (180 mg/ml) en 50 ml de agua destilada) llevándolo a microondas 10 s. Después se retiró la solución de plata y se lavo el gel 2 veces con agua bidestilada. Se agregó la SOLUCION DE REVELADO (20 ml hidróxido de sodio 7.5% más 500 μ l de formaldehído 37%, 30 ml agua bidestilada) y se llevó a microondas por 15 s. Se agitó suavemente hasta visualizar las bandas. Se retiró la SOLUCIÓN DE REVELADO y se fijó nuevamente en la SOLUCIÓN DE FIJADO.

Test de ureasa.

El test de ureasa se realizó según lo descrito por Christensen (1946).

El procedimiento consistió en preparar un cultivo fresco desde una colonia en medio líquido. Luego sembrar en estrías en tubos que contienen medio Christensen-urea-agar, por 12 hr a 37°C. La producción de ureasa se visualizó por cambio de pH por la aparición de un color rojo (del indicador rojo fenol) (pH 6.8-8.4), púrpura (pH<8.4).La aparición de un color amarillo indica ausencia de ureasa.

Para la realización del experimento se necesita una Solución de urea al 20% (Urea 20 g en 100 ml de agua destilada estéril. Filtrada por 0.2 μ m), la cual se agrega al Agar Christensen

(Peptona 1 g, glucosa 1 g, NaCl 5 g, K₂HP04 2 g, rojo fenol 0.012 g, agar 20 g, agua destilada 900 ml y extracto de levadura opcional 0.1 g. pH 6.8, autoclavado a 15 psi (121°C) por 15 min.) dispensando en tubos y enfriando en posición diagonal.

Serotipificación.

La determinación de los antígenos O y K de las cepas de *V. parahaemolyticus* fue realizada por aglutinación en portaobjetos con antisuero de conejo obtenido desde Seiken (Denka Seiken. Co. Ltd. Japón), como se describe en el manual de instrucciones, con las siguientes modificaciones: se realizó primero la determinación de serotipo para el antígeno O y dependiendo del resultado se probó con el antisuero K compatible, con el fin de determinar el serogrupo. La prueba se realizó mezclando 5 µl de suspensión de bacterias con igual volumen de antisuero tanto O como K.

Fenotipia.

Las propiedades metabólicas de *Vibrio parahaemolyticus* fueron estudiadas a través del API 20E (BioMerieux, Inc. Hazelwood, Mo), según las instrucciones del fabricante, que consistían básicamente en: resuspender una colonia de la cepa a estudiar en una solución salina (NaCl 0.85 %) y luego proceder a llenar la galería con la resuspensión, siguiendo las instrucciones para cada ensayo, e incubar a 37°C por 18-24 hrs.

Extracción DNA y digestión para PFGE.

La preparación de los bloques de agarosa conteniendo el DNA total íntegro se realizó según lo descrito por Chowdhury y col. (2000b), con las siguientes modificaciones:

Los aislados a probar se crecieron sobre medio LB sólido (1.5% agar) suplementado con 3% NaCl y se tomó una colonia la cual se resuspendió en 3ml de LB líquido 3% NaCl y posteriormente se cultivó hasta el día siguiente con agitación. Posteriormente 150 µl de este cultivo se transfirieron a 15 ml de medio LB 3% NaCl y se incubó a 37°C con agitación de 200 r.p.m., hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 620 nm.

Las bacterias se recogieron de un ml de cultivo por centrifugación y se resuspendieron en 150 µl de Solución de resuspensión (10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0)).

Los bloques de agarosa se prepararon mezclando volúmenes iguales de la suspensión bacteriana con agarosa LMP (Low Melting Point) 1.6% (BioRad). Las células bacterianas en los bloques de agarosa se lisaron por tratamiento con Solución de Lisis (Lisozima 1mg/ml en 10 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100 mM EDTA pH 8, Deoxicolato de sodio 0.2%, SLS 0.5%, Rnasa 2 µg/ml.) a 37°C por 3 hr y luego se trataron con Solución Proteinasa K (1 mg/ml en 0.5 M EDTA (pH 8), SLS 1%) a 50°C por 22 hrs.

Los bloques se lavaron con Solución Lavado (20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8) por 2 hrs. y se incubaron con Solución PMSF (1/100 en Solución de Lavado Stock 0.1M) durante toda la noche.

Se repitió el paso de lavado 2 veces y se guardaron en TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl).

La mitad de un bloques de agarosa conteniendo el DNA genómico, se equilibró en 100 µl de buffer de la enzima *Not I* por 1 hr a temperatura ambiente. Luego se transfirió a 100 µl

de buffer conteniendo 50 U de enzima *Not* I, y se incubó toda la noche a 37°C. Estos bloques que contienen los digeridos con *Not* I se equilibraron con 20 volúmenes de TE por al menos 2 hr quedando listos para la electroforesis.

Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE).

Se realizó según lo descrito por Hara-Kudo y col.(2003). La electroforesis de los digeridos de DNA fue realizada en CHEFF-DR II (BioRad) en gel de agarosa al 1% (pulsed-field agarose certified, BioRad) en 150 ml de TBE 0.5X (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA en 1 l agua estéril MilliQ). Las condiciones de corrida consisten en 2 bloques de pulsos de 1-18 s por 12hr y 3-80 s por 12 hr a 6V/cm. y 14°C. La tinción se realiza en 300 ml de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 30 min. para luego ser desteñido en 300 ml de agua destilada por 30 min.

Construcción de dendrogramas.

Los dendrogramas fueron creados usando el programa Treecon for Windows (Van de y De Watchter, 1994). Las distancias entre cepas se calcularon basadas en el número de bandas (resultantes de la amplificación o digestión) del mismo tamaño o migración compartidos entre los diferentes OTUs, de acuerdo a Nei y Li (1979). El agrupamiento fue realizado mediante WPGMA.

Resultados

Caracterización de aislados obtenidos del brote en el norte de Chile (Arica – Coquimbo, Febrero-Agosto de 1998).

La caracterización previa de aislados del complejo clonal chileno realizada por González y col., (2005) había distinguido solo pequeñas diferencias entre los aislados incluidos en el estudio, utilizando AP-PCR. Estos aislados habían sido, sin embargo, obtenidos de muestras poco diversas. Diecinueve aislados provenían de casos ocurridos en Antofagasta en febrero de 1998 y 24 de casos en Puerto Montt en enero del 2004. Para explorar la diversidad en cepas obtenidas de casos más diversos se obtuvieron aislados clonales en casos ocurridos con mayor distancia geográfica y temporal. Se analizaron aislados de casos ocurridos desde Arica a Coquimbo, entre Febrero a Agosto de 1998. En total se analizaron 40 aislados de *V. parahaemolyticus*, 20 de casos clínicos y 20 de muestras de mariscos. Para identificar los aislados clonales se determinó la presencia del marco abierto de lectura (ORF8). Este marcador se encontró en 18 de las 20 muestras clínicas y en 5 de las 20 muestras de mariscos. Estas 23 cepas positivas para ORF8 fueron posteriormente caracterizadas en mayor detalle por las mismas propiedades ya estudiadas en los primeros aislados.

La tabla 3 resume los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas para la caracterización de las cepas. De acuerdo a estos resultados los 23 aislados ORF8 positivos contenían todas las propiedades clásicas de las cepas pertenecientes al complejo clonal pandémico originado en el Sudeste asiático. Las características propias de este complejo

clonal son: serogrupo O3:K6, ORF8+, *tdh*+, *trh*-, *toxRS/new*+ y Ureasa negativo. No se consideraron los resultados no determinados de la serología y queda la duda si estas cepas son serogrupo O3:K6.

Tabla 3. Propiedades de las 23 cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas en el norte de Chile entre febrero y agosto de 1998.

Aislados clínicos y de mariscos	Serogrupo	ORF8	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	ure	<i>toxRS/new</i>
PMA 114	O3:K6	+	+	-	ND	+
NOA 51	O3:K6	+	+	-	ND	+
COA 20	O3:K6	+	+	-	ND	+
TAA 66	O3:K6	+	+	-	ND	+
ATA 69	I	+	+	-	ND	+
HUC-265	O3:K6	+	+	-	-	+
HUC-266	O3:K6	+	+	-	-	+
HUC-269	O3:K6	+	+	-	-	+
HUC-275	O3:K6	+	+	-	-	+
COC-276	O3:K6	+	+	-	-	+
COC-279	I	+	+	-	-	+
COC-284	O3:K6	+	+	-	-	+
COC-285	I	+	+	-	-	+
COC-286	I	+	+	-	-	+
COC-289	O3:K6	+	+	-	-	+
ATC-296	O3:K6	+	+	-	-	+
ATC-316	I	+	+	-	-	+
ARC-324	I	+	+	-	-	+
ARC-329	I	+	+	-	-	+
ARC-336	O3:K6	+	+	-	-	+
ARC-344	I	+	+	-	-	+
ATC-345	I	+	+	-	-	+
ATC-375	O3:K6	+	+	-	-	+

+: Presencia de marcador. -: ausencia del marcador. I: prueba indeterminada. ND: prueba no determinada. Los aislados destacados en color corresponden a los obtenidos de muestras de mariscos.

La determinación de serogrupo indicó que de los 23 aislados, 14 presentaron el serogrupo O3:K6 característico de las cepas clonales pandémicas (Fig. 1). No fue posible determinar el serogrupo de los 9 aislados restantes. En algunos aislados, ésto se debió a que se observó aglutinación sin suero (cepas COC 285, ATC 316, ARC 324, ARC 329, ARC 344). En las cepas COC 279, COC 286, ATC 345 y ATA 69 no se observó aglutinación con ninguno de los antisueros contra los 11 serotipos O conocidos. Nuevos intentos con el objeto de aclarar los serogrupos fueron infructuosos. Es posible que la inconsistencia de los resultados se haya debido a pequeñas variaciones en la preparación de los antígenos, como se discute en la próxima sección.

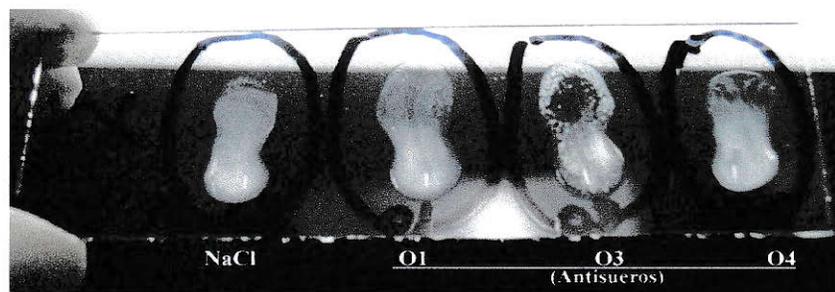


Fig. 1. ILUSTRACIÓN DE PRUEBA DE AGLUTINACIÓN DE LAS BACTERIAS. En la parte inferior de cada ovalo se indica el antisuero utilizado. La bacteria probada es VpKX la cepa tipo del complejo clonal pandémico O3:K6.

Con el objeto de distinguir una posible diversidad generada durante la expansión clonal después de su aparición en Chile, las 23 cepas obtenidas en este estudio fueron caracterizadas, además, por dos propiedades ya estudiadas en las cepas de Antofagasta 1998 y Puerto Montt 2004; el patrón de espaciadores 16S-23S rDNA y el patrón por AP-PCR.

Patrón espaciadores 16S-23S rDNA.

El patrón de espaciadores 16S-23S rDNA permite distinguir diferencias entre aislados de una misma especie de *V. parahaemolyticus* (González y col., 2003).

Los 23 aislados analizados presentaron patrones indistinguibles entre ellos y de la cepa tipo del Complejo clonal pandémico VpKX. Como control se incluyeron dos cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* no clonales con patrones de espaciadores 16S-23S rDNA diferentes (ATC 297 y ATC 298).

En la Fig. 2 se muestran los patrones de espaciadores 16S-23S rDNA observados en dos de los aislados del Complejo clonal pandémico estudiado; uno obtenido de muestras clínicas y otro de mariscos (ATC 316 y PMA 114). También se muestran los patrones de aislados clínicos no clonales (ATC 297 y ATC 298), utilizados para comprobar la capacidad resolutive del método.

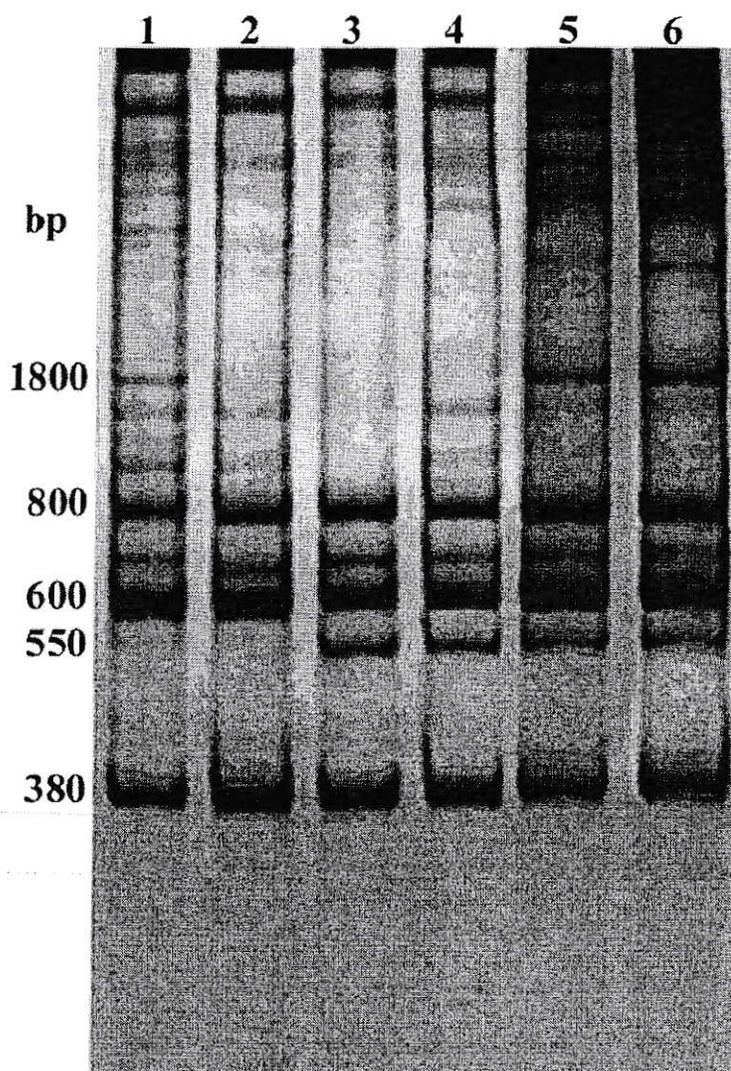


FIG.2 PATRÓN DE LOS ESPACIADORES 16S-23S rDNA ENCONTRADOS EN AISLADOS CLINICOS Y DE MARISCOS.

Carriles 1 y 2: cepas no clonales ATC 297 y ATC 298. 3: aislado ATC 316 uno de los 23 aislados del complejo clonal estudiado. 4 y 6: VpKX. 5: Aislado PMA 114, uno de los 23 aislados del complejo clonal estudiado aislado, aislado de muestras de mariscos. Gel poliacrilamida 8%, 150V por 60 min.

Patrón por AP-PCR.

La caracterización por AP-PCR de los aislados obtenidos anteriormente había distinguido 4 grupos. Este método había resultado ser el más resolutivo en la distinción de los aislados del complejo clonal empleados en el estudio (González y col, 2005).

El AP-PCR de las 23 cepas en estudio permitió distinguir 3 grupos (Fig. 3). El primer grupo es mayoritario y se encuentran la mayoría (19) de los aislados clonales analizados. Este grupo posee el mismo patrón encontrado en VpKX, la cepa tipo del complejo clonal. El segundo grupo lo conforman 3 aislados clínicos (ARC 336, HUC 269 y COC 286) y el tercero está compuesto de un aislado clínico (HUC 275) con un patrón único. El patrón IV corresponde a una cepa de *V. parahaemolyticus* no pandémica. En la Fig. 3 se observa que las diferencias encontradas entre los aislados clonales con esta técnica son sutiles, de una o dos bandas adicionales al patrón común. Los aislados de mariscos resultaron tener patrones idénticos a los de la cepa control VpKX por lo que no se muestran en el gel.

En esta técnica se utiliza un solo partidor de 10 bases. Los datos en la Fig. 3 corresponden a los obtenidos con el partidor P1. La agrupación obtenida al comparar los patrones observados con un segundo partidor, P3, fue idéntica, entregando un dendrograma con los mismos grupos y por lo tanto no se muestra.

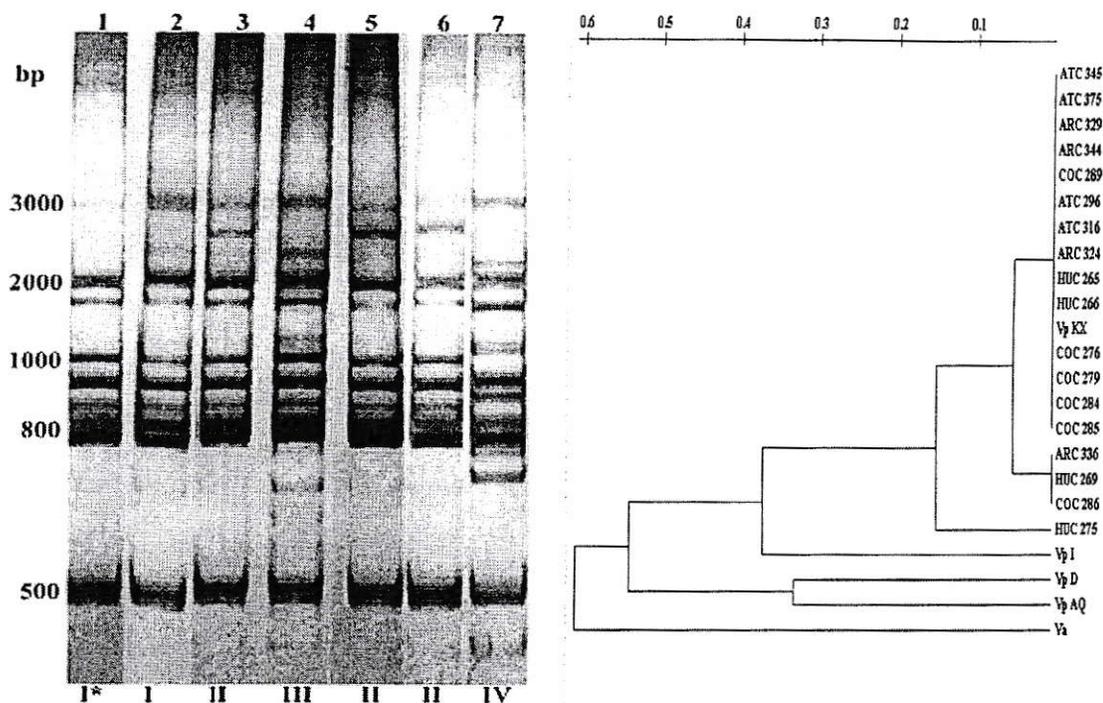


Fig.3: PATRONES OBTENIDOS POR AP-PCR y DENDROGRAMA ASOCIADO.

En la figura se muestran los patrones de VpKX, I*, la cepa pandémica tipo (carril 1) y de aislados representativos de cada patrón. Carriles 2, aislado HUC 266. 3,5 y 6 cepas ARC 336, HUC 269 y COC 286 pertenecientes al grupo II. 4: aislado HUC 275, grupo III. 7: cepa VpD, no clonal. Patrones obtenidos con partidior P1. Gel poliacrilamida 8%, 150 V por 90 min.

Los 41 aislados pertenecientes al Complejo clonal con que ya se contaba antes de este estudio, habían sido distinguidos en 4 grupos por sus patrones por AP-PCR. Con el objeto de comparar todos los aislados obtenidos a la fecha, o sea los obtenidos en el estudio previo (González y col., 2005) y en este estudio, se incluyeron en las comparaciones posteriores cepas representativas de los aislados obtenidos de casos ocurridos en Antofagasta en 1998 y Puerto Montt en 2004.

Fenotipia.

Para detectar posibles diferencias en las propiedades bioquímicas y metabólicas entre los aislados se utilizó la prueba API 20E (Biomerieux). Este método consiste en la determinación de 21 reacciones bioquímicas utilizando sustratos deshidratados incluidos en una galería que contiene 20 cúpulas (Fig. 4). Se probaron 36 aislados clonales representativos de los brotes de Antofagasta (1998), Norte de Chile (1998: Marzo-Agosto) y Puerto Montt (2004) tanto clínicos como de mariscos.

Los resultados mostraron inicialmente una gran diversidad pero posteriormente se comprobó que muchas de las diferencias antes observadas eran sutiles y no reproducibles (ver anexo). Por esta razón solo se consideraron para estimar la diversidad de las pruebas aquellas con resultados claros y reproducibles. Éstas correspondieron solo a las pruebas de ornitina descarboxilasa y lisina descarboxilasa para los aislados del clon pandémico.

En la Fig. 4 se muestran las diferencias reproducibles como la presencia de ornitina descarboxilasa (cuarta cúpula de izquierda a derecha) y pruebas no reproducibles como la utilización de amigdalina (segunda cúpula de derecha a izquierda).

En otros ensayos repetidos ocurre lo mismo para otras reacciones, como la utilización de arabinosa, por ejemplo (primera cúpula de derecha a izquierda). Todos los resultados no consistentes no se consideraron en la estimación de diversidad. Se consideró que las diferencias encontradas se debían probablemente a otros factores como rapidez de

crecimiento, diferencia entre inóculos, y no a una propiedad de cada aislado, como se discutirá en la próxima sección.



FIG.4: ILUSTRACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA GALERÍA API 20E PARA LOS AISLADOS CLONALES.

La figura muestra las reacciones del API 20E para los aislados clonales. La primera y tercera galería muestran los resultados de las reacciones para la misma cepa HUC 266. La segunda muestra las reacciones para ATC 208.

El agrupamiento de los aislados según los resultados con estas pruebas permitió distinguir tres grupos (Fig. 5). El primer grupo está compuesto en su mayoría por aislados obtenidos de muestras de mariscos, que agrupan con la cepa tipo pandémica VpKX; el segundo comparte aislados tanto de la zona norte como del sur de Chile. El tercer grupo es el más abundante y está conformado por aislados provenientes mayoritariamente de Puerto Montt. Las cepas de *V. parahaemolyticus* no clonales, VpAQ, VpD, y VpI no agruparon con ninguno de los aislados clonales, mostrando una diferencia entre aislados pertenecientes al complejo clonal y no clonales. La cepa de *V. alginolyticus*, correspondiente a otra especie, muestra la mayor separación en los grupos.

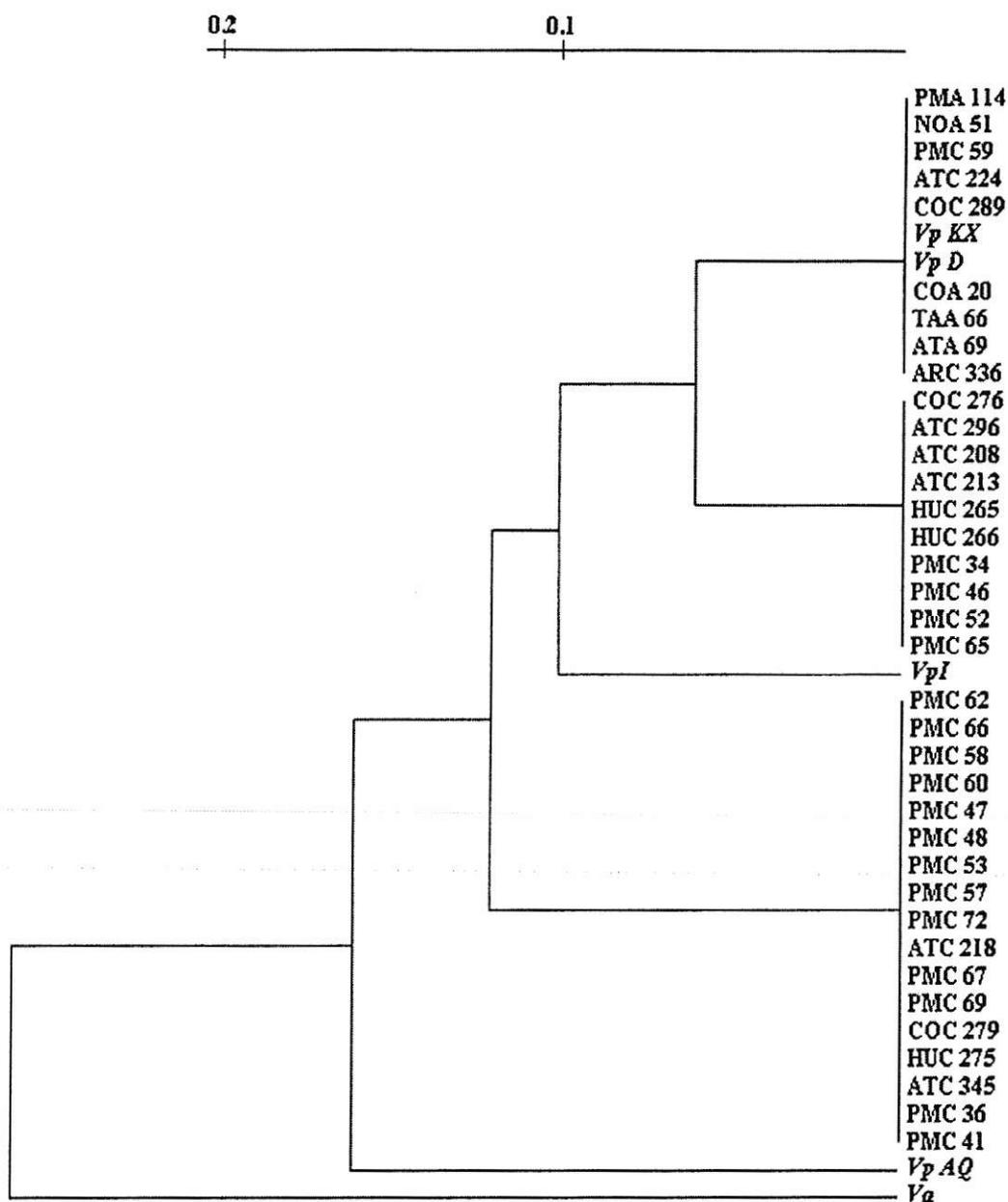


FIG.5: DENDROGRAMA ASOCIADO A LOS RESULTADOS DEL API 20E PARA LOS AISLADOS CLONALES PROBADOS.

La construcción del dendrograma se realizó comparando las 21 reacciones componentes del API 20E de cada aislado. En las pruebas no reproducibles se consideró que el resultado era igual al de la cepa tipo pandémica VpKX. La cepa tipo pandémica VpKX y otras cepas no clonales se destacan en cursiva.

RFLP-PFGE.

Los aislados fueron finalmente comparados por los patrones de los fragmentos de restricción obtenidos del genoma completo. Este método es considerado el de mayor capacidad para distinguir cepas relacionadas cercanamente por filogenia (Hara-Kudo y col., 2003).

Para poder comparar el genoma completo se deben generar fragmentos de cientos de kb que no pueden ser separados en geles convencionales y deben por lo tanto utilizarse electroforesis en campo pulsado. Los fragmentos fueron generados con la enzima *Not I*. Como esta metodología no había sido utilizada para la comparación de los aislados chilenos obtenidos previo a este estudio, se incorporaron varios aislados, representativos de estos grupos. Se incorporaron además aislados del Sudeste asiático pertenecientes a grupos con patrones diferentes. Esto permitiría determinar una posible relación de los aislados chilenos con alguno de los aislados asiáticos y así un posible origen.

De acuerdo a los patrones observados (Fig. 6), las 40 cepas chilenas analizadas se diferenciaron en 5 grupos. La gran mayoría presentó el patrón A, igual al de la cepa pandémica tipo, VpKX. Este grupo comprende aislados chilenos obtenidos tanto del brote en Antofagasta-1998, de Puerto Montt-2004 y del norte de Chile 1998 (clínicos y de mariscos) y también varios de los aislados obtenidos del Sudeste asiático (Fig. 7).

Solo 5 aislados chilenos de los 40 estudiados, resultaron diferentes y formaron 4 grupos distintos, el primero formado por dos aislados clínicos (COC 285-PMC 48), que presentan el patrón J. Un segundo y tercer grupo formados por aislados obtenidos de mariscos, PMA

114 (patrón G) y NOA 51 (patrón H) (Fig. 6). El último grupo está formado por el aislado clínico ATC 227 (patrón I).

El patrón I además de las bandas observadas en las cepas clonales mostró una banda adicional. De acuerdo a la migración de esta banda, su tamaño correspondería a 324 kb en su genoma.

Los patrones observados en los aislados provenientes del Sudeste asiático corresponden a lo descrito previamente en la literatura (Chowdhury y col., 2000; Hara-Kudo y col., 2003).

Los tamaños de las bandas observados en la cepa tipo pandémica VpKX corresponden a la calculada a partir de los sitios de restricción encontrados en la secuencia del genoma (Tagomori y col., 2002).

Los diferentes patrones encontrados se muestran en la Fig. 6.

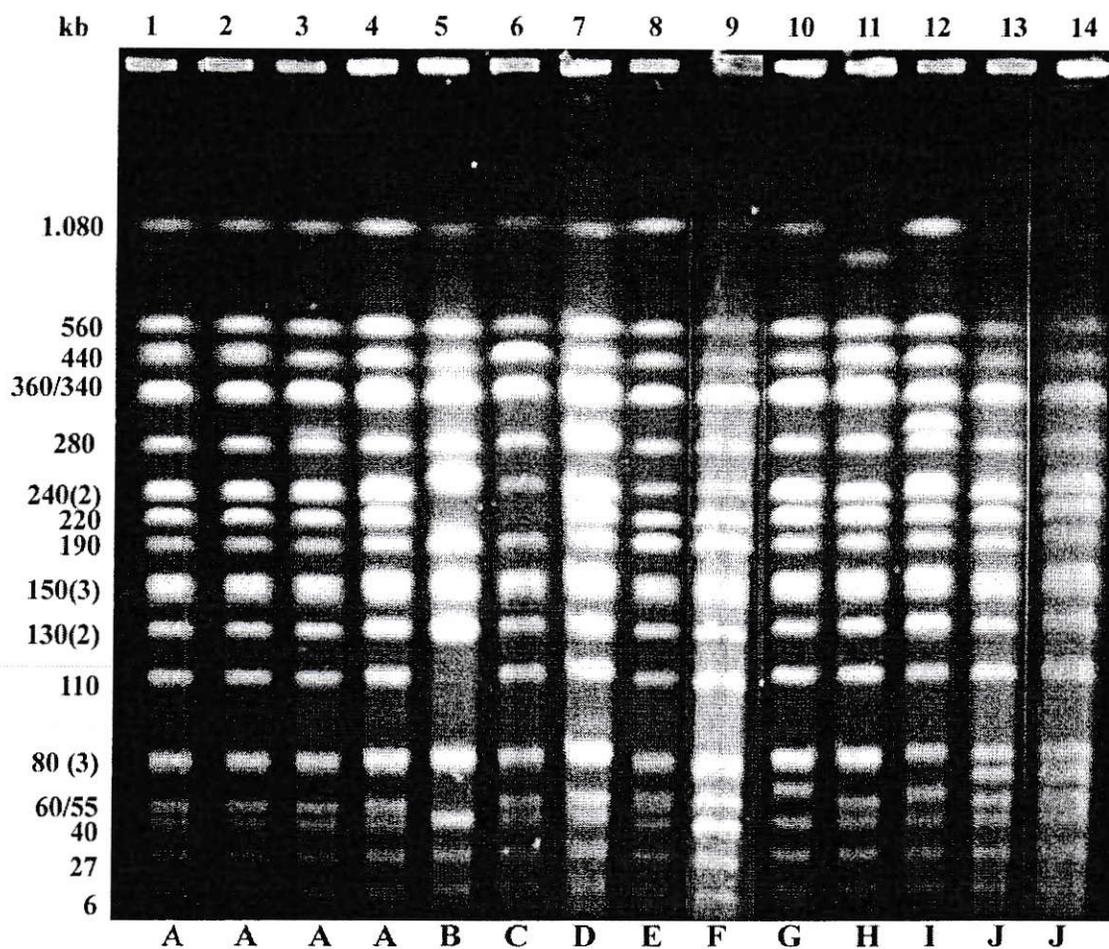


FIG.6: PATRONES OBSERVADOS POR PFGE DE LOS AISLADOS CLONALES CHILENOS Y DEL SUDESTE ASIÁTICO.

Carriles: 1: cepa control pandémica VpKX. 2: COA20. 3: HUC 266. 4: KXV225. 5: Vp2. 6: KXV737. 7: JKYVp6. 8: AN-5034. 9: OP-424. 10: PMA 114. 11: NOA 51. 12: ATC 227. 13: COC 285. 14: PMC 48. Los patrones observados asignados a los aislados variantes se muestran en la parte inferior de la figura con letras.

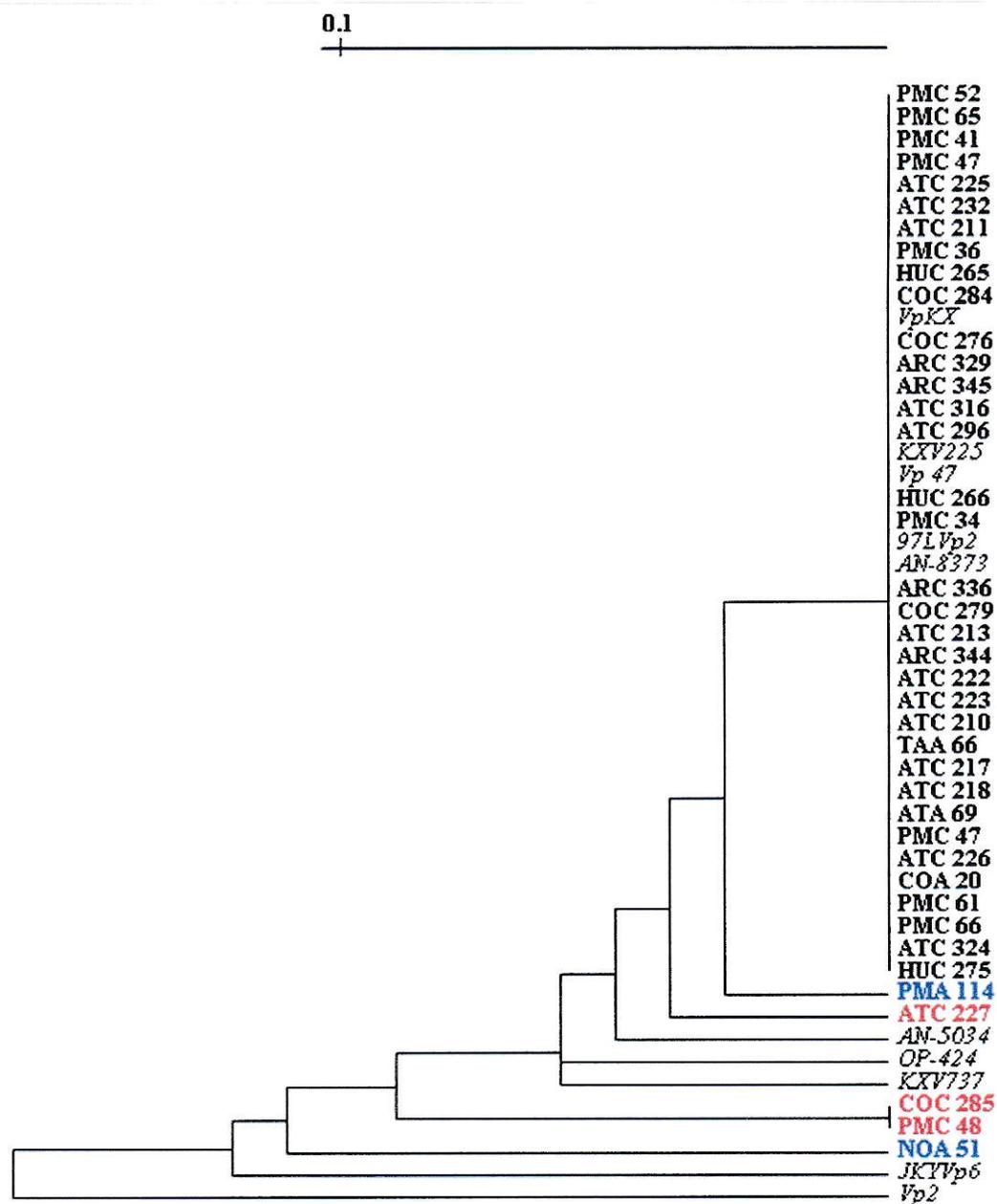


FIG.7: DENDROGRAMA ASOCIADO A LOS PATRONES OBSERVADOS POR PFGE DE LOS AISLADOS CLONALES.

El dendrograma se construyó en base a la comparación de las bandas observadas en la cepa tipo VpKX con respecto a las observadas en los aislados estudiados. Los aislados del Sudeste asiático se destacan en cursiva, en color azul los aislados variantes provenientes de aislados de mariscos y en rojo los aislados variantes provenientes de muestras clínicas.

Agrupación de los aislados estudiados pertenecientes al Complejo clonal según los diferentes métodos analizados:

Los resultados obtenidos de los diferentes métodos estudiados mostró que existe diversidad al interior del Complejo clonal, sin embargo las diferencias observadas a través de los métodos por separado, son mínimas.

Con el fin de relacionar las diferencias encontradas en los aislados pertenecientes al Complejo clonal chileno y así estimar un mayor grado de diversidad, se estudiaron los resultados de todas las propiedades analizadas para cada uno de los aislados chilenos tanto de muestras clínicas como de mariscos pertenecientes al Complejo clonal.

Los 46 aislados seleccionados mostraron que al relacionar los métodos anteriormente estudiados aumenta el grado de diversidad, ya que estos forman un mayor número de grupos diferentes. Cabe destacar que ninguno de los aislados variantes encontrados por los métodos anteriormente estudiados coincidía en los distintos grupos obtenidos.

En la Fig. 8 se muestra el agrupamiento obtenido de acuerdo a los resultados que mostraron los 46 aislados analizados.

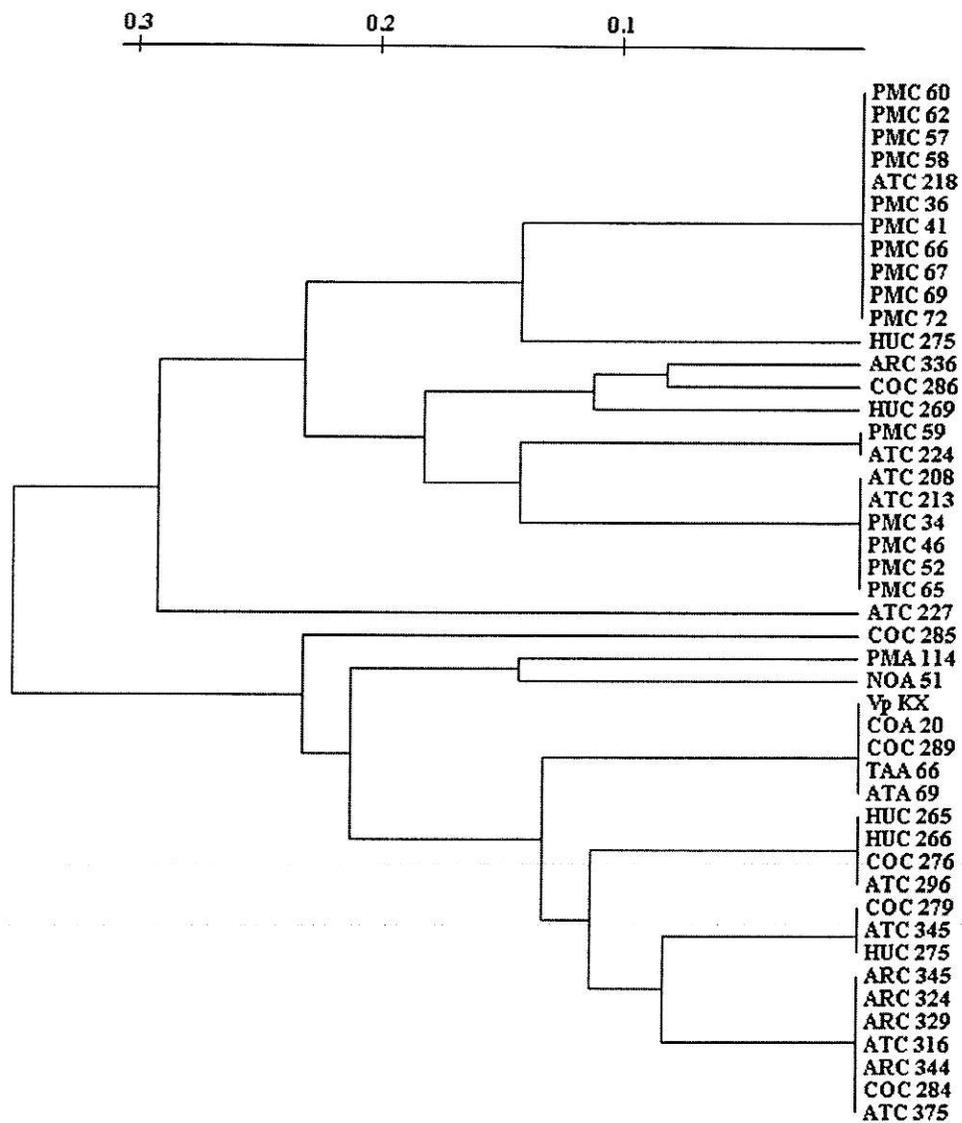


FIG.8: DENDROGRAMA ASOCIADO A LAS DIFERENCIAS ENCONTRADAS EN CADA UNO DE LOS AISLADOS CHILENOS PERTENECIENTES AL COMPLEJO CLONAL POR CADA UNO DE LOS MÉTODOS ESTUDIADOS.

El dendrograma se construyó seleccionando los aislados que compartían cada una de las propiedades analizadas en este estudio.

Discusión

Caracterización de los aislados Chilenos pertenecientes al Complejo clonal.

La caracterización de los aislados clínicos y de mariscos obtenidos en los brotes de 1998 y 2004 permitió distinguir una diversidad dentro de este complejo clonal, cuyo significado se tratará de interpretar en esta sección.

Como se explicó anteriormente, el grupo de aislados de este tipo que estaban disponibles para este estudio, correspondían a casos clínicos ocurridos en Antofagasta en Febrero de 1998 y en Puerto Montt en Enero del 2004. Para tener una muestra más representativa de las bacterias circulando en Chile, este grupo fue complementado con aislados de casos clínicos obtenidos en diversos sitios desde Arica a Coquimbo entre Febrero y Agosto de 1998 y con aislados de mariscos obtenidos de esa misma zona y provenientes de Puerto Montt 2004. La identificación de los aislados correspondientes al complejo clonal pandémico fue parte de este trabajo. La caracterización inicial de estos aislados indicó que la cepa clonal pandémica se encontraba bastante dispersa en la región del Norte desde 1998 ya que de los 20 aislados de casos clínicos, 18 resultaron pertenecer a este clon, algunos de sitios tan al Sur como Coquimbo. La cepa también ya estaba bastante dispersa en el mar pues la caracterización de aislados de 11 muestras de mariscos permitió distinguir 4 aislados clonales en muestras originarias de Antofagasta, Copiapó y Taltal. De 9 aislados de *V. parahaemolyticus* analizados provenientes de Puerto Montt, sólo uno resultó perteneciente al complejo clonal.

En general, los aislados tanto clínicos como de mariscos, obtenidos del norte de Chile dentro de un rango geográfico y temporal mayor que las muestras caracterizadas anteriormente, no mostraron mayor diversidad respecto de los aislados de Antofagasta-1998 y Puerto Montt-2004, tanto en serogrupo como en la presencia o ausencia de genes considerados típicos del clon pandémico. A continuación se discutirá en forma separada los resultados obtenidos en las diferentes caracterizaciones.

Genes propios de Complejo clonal.

Existen antecedentes de que cepas clonales obtenidas de brotes del Sudeste asiático pueden carecer del marco de lectura abierto (ORF8) o presentar variaciones en el serogrupo O3:K6 derivándose en O4:K12, O1:K68, etc. (Matsumoto y col, 2000, Bhuyan y col, 2000, Chowdhury y col, 2000a).

La caracterización de los aislados obtenidos del norte de Chile no mostró variaciones en las propiedades típicas del complejo clonal, incluida presencia de ORF8.

Serotipos.

Existen también antecedentes que las cepas clonales pueden variar en serogrupo (Chowdhury y col, 2000a). Todos los aislados en que se pudo determinar el serogrupo mostraron los antígenos característicos del clon pandémico, específicamente O3:K6. De los 23 aislados analizados fue posible determinar el serogrupo en 14. Nueve dieron resultados indefinidos en esta prueba. Es probable que esto se debiera a problemas en la preparación

de los antígenos. Con las cepas que aglutinaron con 3% NaCl, se repitió el protocolo de preparación de antígenos, sin obtener resultados claros. Con las cepas que no reaccionaron con ninguno de los antisueros O (1-11), se siguieron las instrucciones indicadas en estos casos por el proveedor. Se procedió a autoclavar la suspensión nuevamente (121°C-60min.) y realizar una segunda determinación del serogrupo. El segundo resultado fue que estas cepas volvieron a aglutinar con 3% NaCl.

Con respecto a la serotipificación del antígeno K no hubo problemas y de allí la inconsistencia de los resultados anteriores, las cepas problemáticas al antígeno O resultaron ser K6, lo que muestra correspondencia con un serotipo O3.

La explicación para estos resultados probablemente se deba a que el antígeno O está ubicado en el LPS de la bacteria y el antígeno K en la superficie, (cápsula). Por este motivo se debe autoclavar la suspensión bacteriana por 1hr a 121°C, para romper la cápsula y exponer el antígeno O. El resultado negativo para los 11 antisueros O se explica por la no exposición del antígeno, al no destruir la cápsula, es por esto que el protocolo indica repetir el paso de autoclave. Respecto de la aglutinación con 3% NaCl la explicación sería una mala resuspensión de las bacterias en una etapa inicial del procedimiento lo que provocaría un cúmulo de bacterias que facilitarían su aglutinación en cualquier condición. Esta situación podría quizás evitarse agregando glicerol, en una concentración mayor a la recomendada.

Patrón de espaciadores 16S-23S rDNA.

Los patrones de espaciadores 16S-23S rDNA son una herramienta útil para determinar diferencias entre especies y aún entre cepas, debido a la gran variabilidad en la secuencia espaciadora de DNA no funcional amplificable.

Aunque esta propiedad es bastante variable aún dentro de la especie *V. parahaemolyticus* (González y col., 2003), cada aislado analizado mostró un idéntico patrón de espaciadores e idéntico al de la cepa tipo pandémica VpKX.

Fenotipia.

La caracterización por fenotipia de la colección completa de aislados clonales chilenos, obtenidos de los casos ocurridos tanto en Antofagasta 1998, Norte de Chile 1998 y Puerto Montt 2004, mostró que existe diversidad al interior del complejo clonal, al observar diferencias en dos propiedades: lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa. Estas diferencias permiten separar en 3 grupos a los aislados clonales probados. El primer grupo está compuesto por los aislados que resultaron positivos para ambas pruebas, el segundo está compuesto por los aislados que resultaron negativos para la presencia de ornitina descarboxilasa y el tercero para los que resultaron negativos para ambas. No se encontraron cepas negativas para lisina decarboxilasa exclusivamente.

Las descarboxilasas (Lisina (LDH), Ornitina (ODH) y Arginina (ADH) se denominan “descarboxilasas de Möller” y están incluidas en vías biosintéticas importantes en todas las bacterias estudiadas. LDH está involucrada en la síntesis de cadaverina a partir de L-lisina y es inducible en cepas de *V. parahaemolyticus* (Yamamoto y col., 1991). ODH está

involucrada en la biosíntesis de putrecina en conjunto con otras descarboxilasas (ADC y AUH). Aparentemente LDH no estaría relacionada con el metabolismo de *V. parahaemolyticus* en concentraciones bajas de sal (Yamamoto y col., 1988).

Es posible que las diferencias encontradas en los aislados, respecto de estas dos enzimas, se deba a la existencia de procesos metabólicos diferentes por haber evolucionado en el mar en diferentes habitats.

VpKX, la cepa tipo del complejo clonal pandémico contiene ambas enzimas. Sólo 4 de los 31 aislados clínicos comparten esta característica. Por el contrario los cinco aislados obtenidos de mariscos contienen al igual que VpKX ambas enzimas. Es probable aunque solamente especulativo que las descarboxilasas hayan sido perdidas por las cepas aparecidas en los casos clínicos después de su arribo a Chile.

La indeterminación en algunas reacciones de utilización de sustratos, se debe a que la interpretación de los resultados es a nivel cualitativo y subjetivo. En las reacciones de lisina o ornitina descarboxilasa, el resultado es claro rojo ó amarillo, no así en las de utilización de sustratos, el resultado positivo ó negativo es subjetivo, como se trata de un cambio de pH el color amarillento puede ser relativo (amarillo verdoso) y se puede tomar una reacción positiva siendo que es negativa. Otro factor a considerar es el inóculo. Las instrucciones del API 20E sólo se remiten a escoger una colonia y resuspender en solución salina, es probable que la concentración del inóculo varíe al no escoger colonias de tamaño similar, al igual que el tiempo de incubación entre 18-24hrs. Un inóculo de una colonia de menor tamaño tardará más en crecer y provocar el viraje en el indicador, al mismo tiempo de incubación, lo que finalmente lo hace subjetivo.

Caracterización por Métodos Moleculares con mayor resolución.

AP-PCR.

AP-PCR es un tipo de PCR en donde se utiliza un solo partidor pequeño (10bp) y su secuencia es escogida al azar. Las bandas resultantes de la amplificación muestran un patrón característico y representativo del genoma de la bacteria estudiada.

Los patrones de los aislados obtenidos por AP-PCR permitieron distinguir tres grupos. El primer grupo comprende la mayoría de los aislados clínicos y la totalidad de los aislados obtenidos de mariscos, además de la cepa tipo pandémico VpKX. Tres aislados clínicos forman un segundo grupo y un único aislado (HUC 275), forma el tercero, que corresponde al de mayores diferencias.

Los patrones fueron obtenidos con dos partidores diferentes P1 y P3 para aumentar la posibilidad de encontrar diferencias, sin embargo los patrones obtenidos resultaron en una idéntica agrupación.

Los 41 aislados pertenecientes al Complejo clonal con que ya se contaba antes de este estudio, presentaron también diferencias en sus patrones por AP-PCR. Del análisis se pudo determinar la formación de 4 grupos, los cuales no agrupan con VpKX, formando grupos entre ellos.

Las diferencias observadas a través de los patrones por AP-PCR son mínimas, se trata de dos o tres bandas adicionales a un patrón común. Ocasionalmente, estas bandas nuevas encontradas se pueden generar en la reacción de PCR debido a un exceso de DNA, (la cantidad indicada es de 25 ng por tubo de reacción). La poca reproducibilidad de este

método ha sido reportada anteriormente. Los resultados en un laboratorio no pueden ser reproducibles en otro, incluso en experiencias repetidas en un mismo lugar. Es por esta razón que la diversidad encontrada no tiene mayor análisis.

RFLP-PFGE

RFLP-PFGE resultó ser la técnica con mayor resolución y permitió distinguir 5 grupos. Treinta y cinco de los 41 aislados chilenos cayeron en un mismo grupo. Éste estaba formado por 3 de los 5 aislados de mariscos y 32 de los 35 aislados clínicos. En este grupo también se encontraron 4 de los 9 aislados del Sudeste asiático. De esta agrupación se puede inferir que los aislados chilenos derivarían de alguno de los aislados del Sudeste asiático de este grupo. Sin embargo, el origen de los aislados del Sudeste asiático en este grupo es muy diferente, provienen de países como Japón, Corea, Bangladesh, Laos, Tailandia, entre otros.

Los cinco aislados chilenos con patrón diferente al mayoritario resultaron muy diversos y pudieron agruparse en 4 grupos, todos constituidos por solo un aislado excepto uno que comprendía dos aislados. De estos aislados 2 eran de mariscos y 3 provenían de muestras clínicas. Se esperaba encontrar una mayor diferencia en los aislados obtenidos de mariscos ya que no son seleccionados por su capacidad infecciosa en humanos. Los dos aislados que conforman uno de los grupos diferentes son clínicos pero de origen muy distinto, uno obtenido en Coquimbo en 1998 y el otro en Puerto Montt el 2004. No es apropiado, sin

mayor caracterización molecular, discutir si ambas cepas corresponden al mismo clon donde se originó la diferencia observada. Todos los patrones diferentes encontrados, excepto uno, pudieron originarse por mutaciones o rearrreglos que cambiaron la posición relativa de los sitios de restricción, pues la suma de los tamaños de los diferentes segmentos da un valor similar al del genoma completo de *V. parahaemolyticus*. El patrón I (Fig. 6) en cambio tiene bandas adicionales que no pueden explicarse por la disminución en tamaño de las observadas en el grupo mayor. Esta banda adicional corresponde a un fragmento de 324 kb. Un aumento de este tipo pudo generarse por transferencia lateral. La magnitud del cambio sugiere una variación mayor en las propiedades de la cepa, sin embargo, ésta resultó idéntica al clon pandémico en todas las otras propiedades estudiadas.

Los patrones encontrados para los aislados clonales del Sudeste asiático coinciden con los descritos en la literatura.

Agrupación de los aislados estudiados pertenecientes al Complejo clonal según los diferentes métodos analizados:

El análisis realizado a un grupo de aislados pertenecientes al Complejo clonal y que compartían cada una de las características estudiadas mostró que existe un mayor grado de diversidad al interior del grupo comparado con el obtenido por cada método. Es claro que al aumentar el número de características se detecta mayor diversidad, sin embargo la naturaleza del carácter estudiado está involucrada en el grado de diversidad encontrada.

La diversidad observada al interior del complejo clonal pandémico solo es distinguible a través de técnicas de alta resolución como lo es los patrones de restricción del genoma completo, RFLP-PFGE. Estos resultados sugieren que la cepa o cepas llegadas a Chile pertenecen a un grupo común y ya expandido en el Sudeste asiático, del cual VpKX es la cepa tipo. Sugieren además que probablemente han surgido variantes desde su arribo a Chile. Estas variantes no serian escasas, encontrándose 5 entre 41 cepas.

Conclusiones

- La gran mayoría de los aislados clínicos resultaron de origen clonal, 18 de 20; a diferencia de los aislados obtenidos de mariscos, donde solo 5 de 20 mostraron esta propiedad.
- Los aislados clonales tienen el mismo patrón de espaciadores 16S-23S rDNA, idéntico al observado en la cepa tipo pandémica VpKX, aislada en el Sudeste asiático.
- Los aislados clonales chilenos pueden separarse en tres grupos por el patrón AP-PCR.
- Los aislados clonales chilenos pueden separarse en tres grupos de acuerdo a la presencia de las enzimas Lisina descarboxilasa y Ornitina descarboxilasa.
- Los aislados clonales chilenos pueden separarse en cinco grupos de acuerdo al patrón de fragmentos de restricción del genoma completo, obtenido por RFLP-PFGE.

- Al reunir todas las características estudiadas para los aislados pertenecientes al Complejo clonal, se obtiene un mayor grado de diversidad al interior del grupo, permitiendo así una mejor separación e identificación de cada aislado.
- Uno de los aislados clínicos clonales presenta fragmentos de restricción adicionales correspondientes a la posible introducción de aproximadamente 324 kb.
- Las diferencias observadas en aislados chilenos del Complejo clonal indican que en el lapso transcurrido desde su introducción en Chile (aproximadamente 10 años) ya se han generado importantes cambios genéticos en este clon.

Referencias

- Arakawa E, Murase T, Shimada T, Okitsu T, Yamai S, Watanabe H. Emergence and prevalence of novel a *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 clone in Japan. *Jnp.J.Infect.Dis.* 1999; 52:246-247.
- Bag PK, Nandi S, Bhadra RK y col. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J.Clin.Microbiol* 1999; 37:2354-2357.
- Bhuyan NA, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M y col. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh and Significance of its distribution across different serotypes. *J.Clin.Microbiol* 2002;40:284-286.
- Blake PA, Weaver RE, Hollis DG. Diseases of human (other than cholera) caused by *vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol* 1980; 34:341-367.
- Chiou CS, Hsu SY, Chiu SI, Wang TK, Chao CS. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-born disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J.Clin.Microbiol* 2000; 38:4621-4625.
- Chowdhury NR, Chakraborty S, Eampokalap B y col. Clonal dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* displaying similar DNA fingerprint but belonging to two different serovars (O3:K6 and O4:K68) in Thailand and India. *Epidemiol. Infec.* 2000; 125:17-25.
- Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T. y col. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg. Infect. Dis.* 2000; 6:631-636.
- Christensen, W.B.: Urea decomposition as means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bact.* 1946; 52: 461-466.
- Cordova JL, Astorga J, Silva W, Riquelme C. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collect during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biol. Res.* 2002; 35:433-440.
- Daniels NA, Ray B, Easton A y col. Emergence a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *JAMA* 2000; 284:1541-1545.

Espejo, R.T and Romero, J. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from a commercial-scale copper leaching plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 1344-1348.

González N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara J, Cabello F, Romero J, Espejo RT. Recently emerged pandemic strain O3:K6 of *Vibrio parahaemolyticus* caused two large diarrhea outbreaks in the Southern hemisphere, Chile in 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11: 129-131.

González N, Romero J and Espejo RT. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rDNA spacer region. *J. Microbiol. Methods.* 2003; 55(1):91-97.

Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibushi M y col. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol* 2003; 69:3883-3891.

Iguchi T, Kondo S, Hisatsune K. *Vibrio parahaemolyticus* O Serotypes from O1 to O13 all produces R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 130:287-292.

Laohaprertthisan V, Chowdhury A, Kongmuang U y col. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130:395-406.

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

Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M y col. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidence by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38:578-585.

Nasu H, Iida T, Sugahara T y col. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38:2156-2161.

Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979; 76:5269-5273.

Nishibushi m, Kaper JB. Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a Virulence Gene Acquired by a Marine Bacterium. *Infection and Immunity.* 1995; 63:2093-2099.

- Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E y col. 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* 1997; 35:150-155.
- Pizarro J, Jedlicki E, Orellana O, Romero J, Espejo RT. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environ. Microbiol* 1996; 62:1323-1328.
- Sambrook J and Russell D. *Molecular Cloning. A laboratory manual. Third Edition.* 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T y col. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J. Infect. Dis.* 1995; 172:1405-1408.
- Tagomori K, Iida T, Honda T. Comparison of genome structures of *Vibrios*, bacteria possessing two chromosomes. *J. of Bacteriology.* 2002; 184:4351-4358.
- Vuddhakul V, Chowdhury A, Laohaprertthisan V y col. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol* 2000; 66:2685-2689.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(24):7213-7218.
- Wong HC, Liu SH, Wang TK y col. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol* 2000; 66:3981-3986.
- Yamamoto S, Imamura T, Kusaba K, Shinoda S. Purification and some properties of inducible lysine decarboxylase from *Vibrio parahaemolyticus*. *Chem. Pharm Bull* 1991; 39(11):3067-3070.
- Yamamoto S, Nakao H, Yamasaki K, Takashina K, Suemoto Y, Shinoda S. Activities and properties of putrescine-biosynthetic enzymes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol.* 1988; 32(7):675-687.

