



# Emergencia de linajes pandémicos de *Vibrio parahaemolyticus* en Perú

Junior Caro-Castro (1), Paul Fernandez (1), Willi Quino (1), Diana Flores-León (1,2), Ronnie G. Gavilán (1,2)

(1) Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú, (2) Universidad Privada San Juan Bautista, Lima, Perú.

## Introducción

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria patógena asociada con el consumo de productos marinos crudos o poco cocidos, cuya características clínica más común es una enfermedad diarreica aguda. Algunas de estas cepas pertenecen al serotipo O3:K6, genotipo CC-3/ST-3, ampliamente distribuida a nivel global, recibiendo la denominación de "clon pandémico", y que tiene como principal característica la presencia de múltiples genes de virulencia, destacando los que codifican la hemolisina directa termoestable (TDH) y/o hemolisina relacionada con TDH (TRH) (Nair et al., 2007).

Los aislamientos clínicos de *V. parahaemolyticus* en Perú adquirieron importancia a partir de 1997 con la introducción del O3:K6, el cual provocó una epidemia a lo largo de la costa peruana, lo que obligó a incrementar los esfuerzos para la caracterización de cepas circulantes mediante serología y métodos moleculares. La primera descripción utilizando métodos de secuenciación genómica con un importante número de cepas fue realizada por Gavilán et al. (2013), destacando la importancia del empleo de la secuenciación de genoma completo en la vigilancia y control de patógenos infecciosos como *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios detallados de las poblaciones circulantes de *V. parahaemolyticus* en el Perú.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar los linajes epidémicos circulantes de *V. parahaemolyticus* en Perú entre 1994 y 2017, utilizando métodos de secuenciación de última generación.

## Resultados y discusión

**DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA-TEMPORAL DE *V. parahaemolyticus* EN PERÚ:** Las cepas de *V. parahaemolyticus* utilizadas en este estudio (203) procedían de 11 regiones del Perú: Lima (n=127), Lambayeque (n=48), Piura (n=8), Cajamarca (n=6), Arequipa (n=5), Loreto (n=4), Tumbes (n=1), Moquegua (n=1), Cusco (n=1), Ancash (n=1) y La Libertad (n=1). La distribución temporal de las cepas aisladas por año se puede observar en la Figura 3.

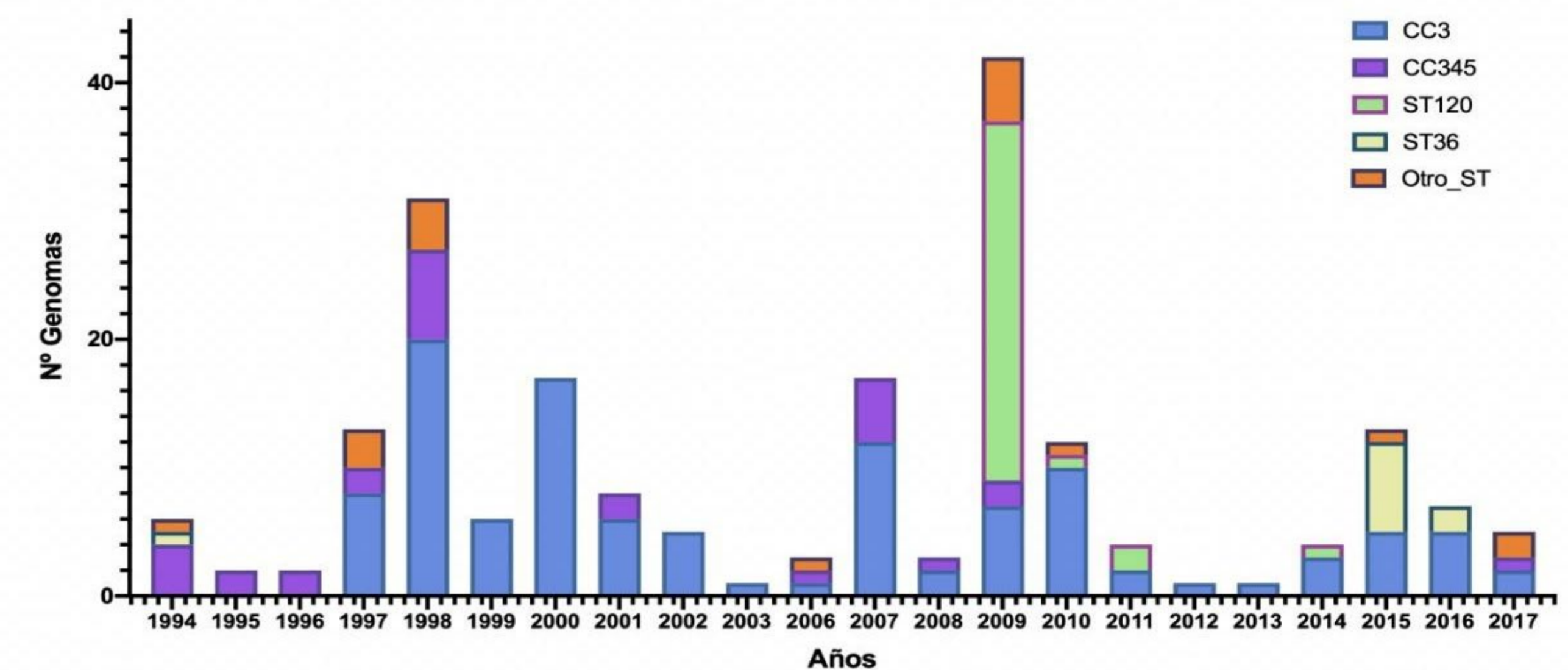


Figura 3. Cepas de *V. parahaemolyticus* secuenciadas por año, en función al complejo clonal (CC) al que pertenece cada una de ellas.

**GENOTIPOS DE *V. parahaemolyticus* CIRCULANTES EN PERÚ:** Las 203 cepas pertenecieron a 16 ST y 4 CC según MLST. El genotipo predominante fue el CC-3/ST-3 (n=114), seguido del CC-120/ST-120 (n=32), las cepas del CC-345, ST-88 (n=18) y ST-265 (n=11) diferenciados por uno de sus siete alelos; y el CC-36/ST-36 (n=10). Otros genotipos de menor presencia también fueron reportados (Figura 4). Muchos de estos genotipos han sido reportados como causantes de epidemias a nivel local, regional y mundial (Caro-Castro et al., 2020).

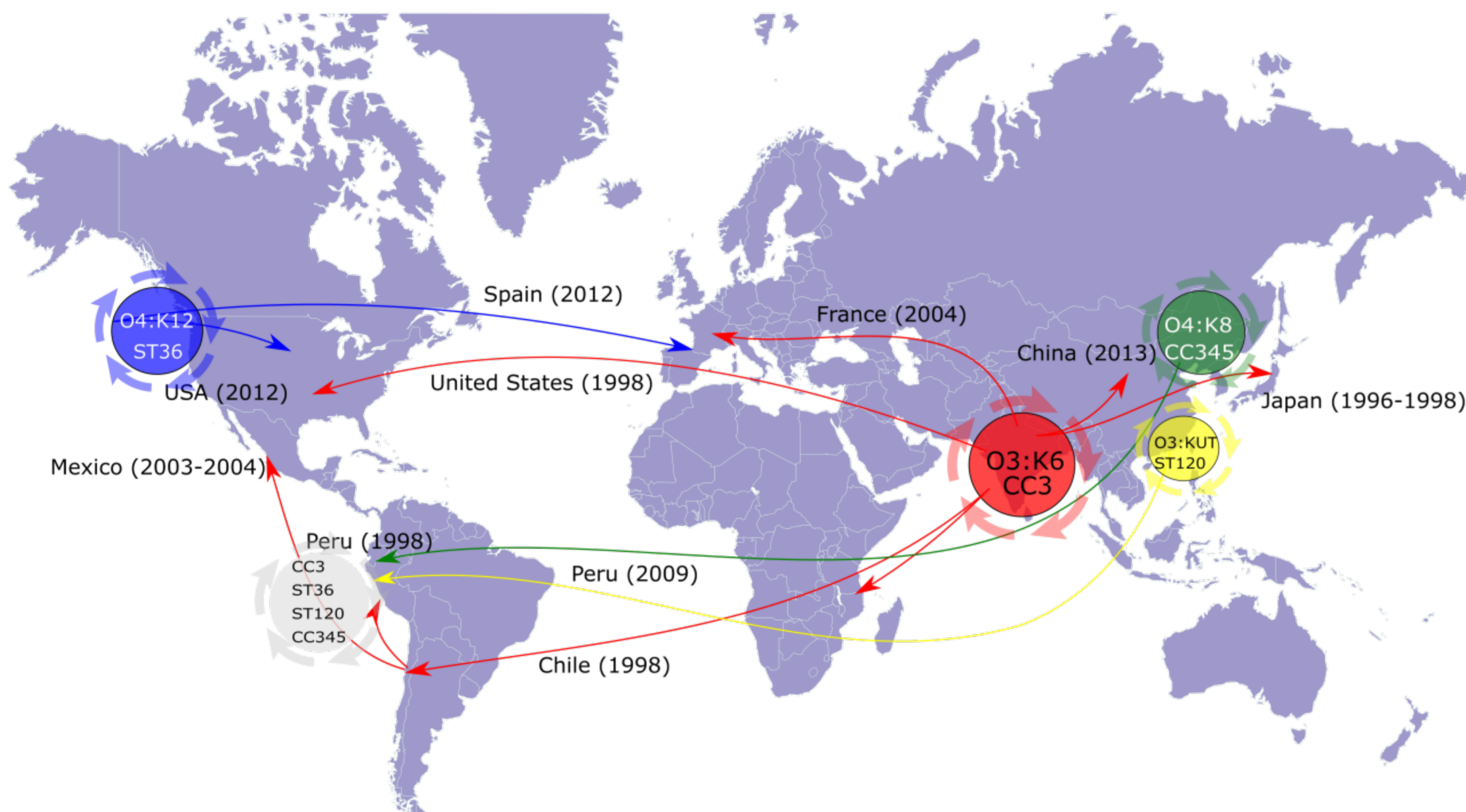


Figura 1. Circulación de linajes pandémicos de *V. parahaemolyticus* a nivel global.

## Metodología

**DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN:** El estudio incluyó 203 cepas peruanas de *V. parahaemolyticus* recibidas por el Laboratorio de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Salud (INS) entre los años 1994-2017.

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *V. parahaemolyticus*:** Las cepas se reactivaron en agua peptonada alcalina (Merck, Alemania) a 37 °C de 6 a 8 horas. Posteriormente, se sembraron en agar TCBS (Merck, Alemania) y agar cromogénico, para posteriormente incubar a 37 °C de 18 a 24 horas. El género *Vibrio* fue confirmado por pruebas bioquímicas convencionales. Los aislamientos se confirmaron como *V. parahaemolyticus* mediante la detección del gen *toxR* mediante PCR (Kim et al., 1999). Además, se determinó la presencia de los genes TDH y TRH. (Tada et al., 1992).

**PREPARACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE BIBLIOTECAS:** La extracción del ADN genómico se realizó con el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Alemania). La concentración del ADN se cuantificó en un fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen, Malasia). Las bibliotecas se realizaron con el kit de preparación Nextera XT (Illumina, EE. UU.) y la secuenciación genómica con un secuenciador MiSeq (Illumina, EE. UU.).

**ANÁLISIS GENÓMICO:** La calidad de la secuencia se evaluó mediante FastQC v0.11.5. Las secuencias se ensamblaron de novo utilizando A5-miseq (Coil et al., 2015). Los genotipos se asignaron empleando el esquema MLST para *V. parahaemolyticus* (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>). Las relaciones genéticas poblacionales entre cepas de *V. parahaemolyticus* se realizó basándose en los perfiles alélicos de la MLST empleando el programa GrapeTree.

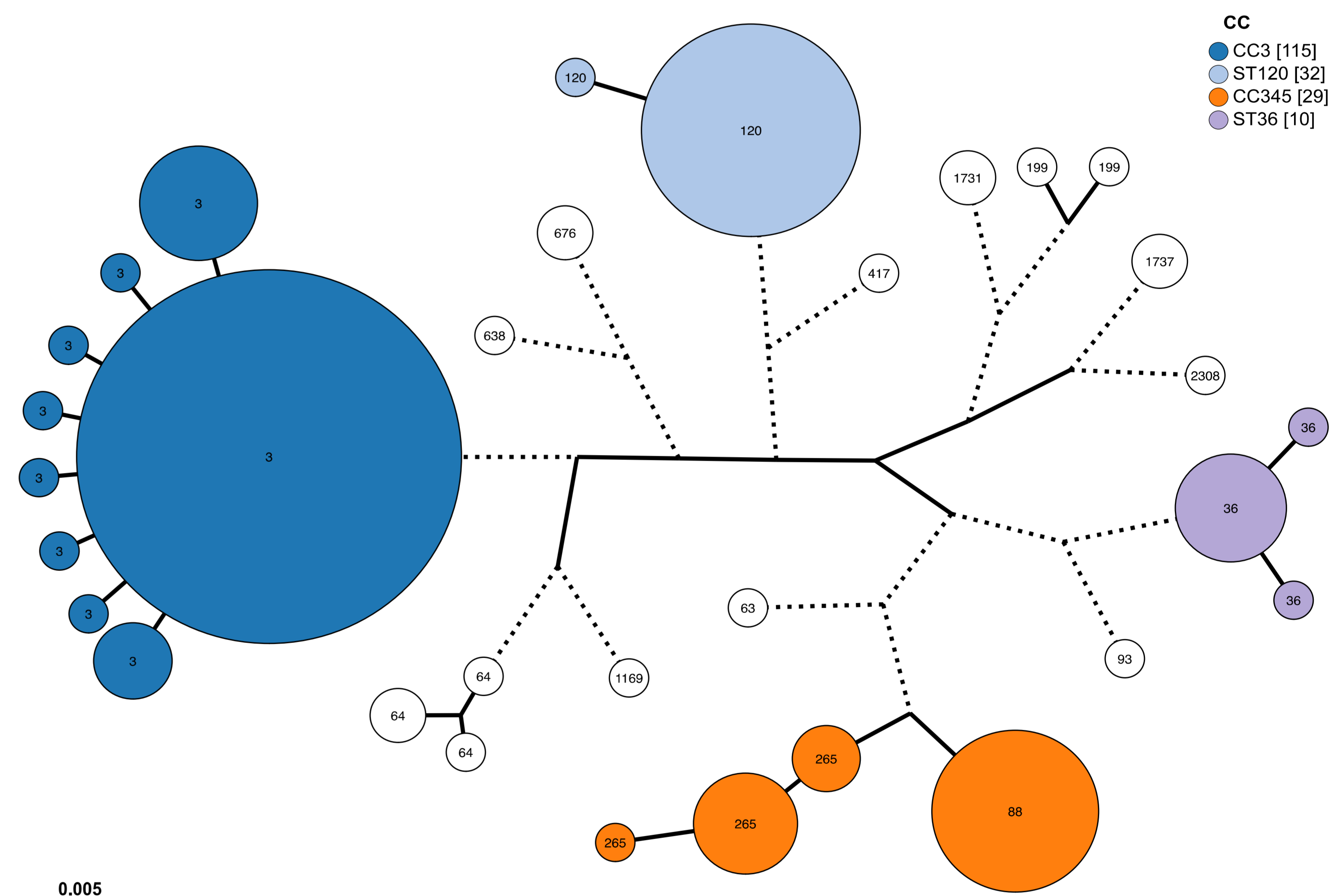


Figura 4. MST de *V. parahaemolyticus* secuenciados en Perú. Los nodos que representan los ST principales están coloreados. El tamaño de los nodos indica el número de cepas por grupo, y el número de las ramas indica las distancias alélicas entre cada uno de ellos.

## Conclusiones

- CC-3/ST-3 es el genotipo circulante predominante en el Perú, tanto temporal como numéricamente entre los años que comprende este estudio.
- Además, se reporta la circulación de otros genotipos con importancia clínica como lo son CC-120/ST-120, CC-345 y CC-36/ST-36, los cuales poseen numerosos genes de virulencia que codifican toxinas como la TDH y TRH.
- Es necesario incrementar los estudios de epidemiología molecular y genómica comparativa para comprender a fondo la dinámica y efecto de las variantes moleculares de *V. parahaemolyticus* en el Perú.

## Referencias

1. Nair GB et al. 2007. Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. Clin Microbiol Rev. (1), vol 20, 39-48.
2. Gavilán RG et al. 2013. Molecular epidemiology and genetic variation of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Peru. PLoS Negl Trop Dis. (5), vol 7, e2210.
3. Coil D et al. 2015. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. Bioinforma Oxf Engl. (4), vol 31, 587-589.
4. Caro-Castro J et al. 2020. Diversidad molecular de variantes patógenicas de *Vibrio parahaemolyticus* en el Perú. Rev Peru de Med Exp Salud Pública (2), vol 37, 270-275.

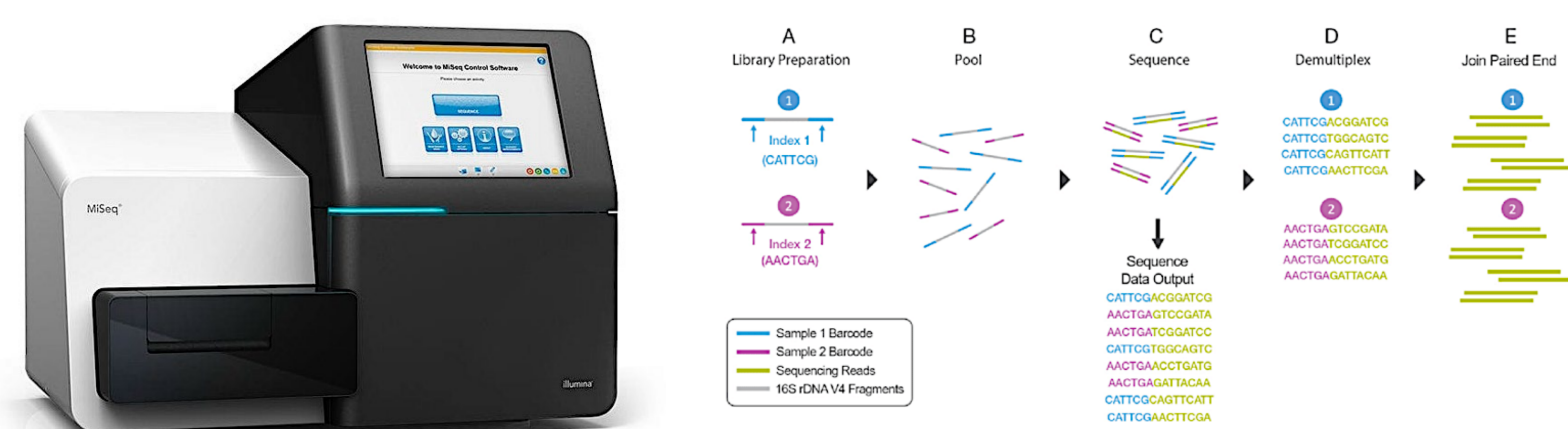


Figura 2. Izquierda: Secuenciador MiSeq-Illumina. Derecha: Flujograma de trabajo en base a la química paired-end.