

ORIGINAL BREVE

DIVERSIDAD MOLECULAR DE VARIANTES PATOGENICAS DE *Vibrio parahaemolyticus* EN EL PERÚ

Junior Caro-Castro ^{1,2,a}, Orson Mestanza ^{1,b}, Willi Quino ^{1,c}, Ronnie G. Gavilán ^{1,3,d}.

¹ Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

² Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

³ Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Privada San Juan Bautista, Lima, Perú.

^a Biólogo, bachiller en Microbiología y Parasitología; ^b biólogo, magíster en Bioinformática; ^c tecnólogo médico, magíster en Microbiología; ^d biólogo, doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la diversidad de variantes patogénicas de *Vibrio parahaemolyticus* en el Perú durante el periodo 1995-2017, se analizaron 102 genomas peruanos (97 clínicos y 5 ambientales) empleando el esquema de tipificación multilocus y BLASTn para la búsqueda de genes de virulencia. Se identificaron 15 tipos de secuencia diferentes, encontrándose que el genotipo ST3, perteneciente al clon pandémico, fue el más abundante, con 52% (n=53); seguido por el ST120, con 23,5% (n=24); y el complejo clonal CC345, con 11,8% (n=12). Un total de 89 cepas analizadas presentaron genes que codifican la isla de patogenicidad VpaI-7 (87,3%), mientras que 96 presentaron el gen *tdh* (94,1%), y 6, el *trh* (5,9%). Durante el periodo evaluado, se resalta la predominancia del ST3, causante de un importante brote en el pasado del Perú, además de otros genotipos patógenos que representan un riesgo latente en salud pública asociado al consumo de alimentos marinos.

Palabras clave: *Vibrio parahaemolyticus*; Salud Pública; Monitoreo Epidemiológico; Tipificación Molecular; Secuenciación Completa del Genoma (fuente: DeCS BIREME).

MOLECULAR DIVERSITY IN PATHOGENIC VARIANTS OF *Vibrio parahaemolyticus* IN PERU

ABSTRACT

During the period from 1995 to 2017, in order to determine the diversity of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenic variants in Peru, 102 Peruvian genomes (97 from a hospital setting and 5 from an out-of-hospital setting) were analyzed using the multilocus typification scheme and BLASTn in the search for virulence genes. Fifteen different sequence types were identified. It was found that the ST3 genotype, which is found in the pandemic clone, was the most abundant, with 52% (n=53); followed by ST120, with 23.5% (n=24); and the CC345 clonal complex, with 11.8% (n=12). A total of 89 analyzed strains presented genes encoding the pathogenicity island VpaI-7 (87.3%), while 96 presented the *tdh* gene (94.1%), and 6 the *trh* gene (5.9%). The ST3 genotype was the predominant one during the evaluated period, this genotype was the cause of a major outbreak in Peru's past history. Other pathogenic genotypes found represent a latent public health risk associated with seafood consumption.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; Public Health, Epidemiological Monitoring; Molecular Typing; Whole Genome Sequencing (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La presencia de bacterias patógenas en el ambiente marino incrementa el interés humano en seguridad alimentaria debido a su potencial para causar brotes. Entre ellas, destaca la *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria gramnegativa halófila ampliamente distribuida en ecosistemas costeros, cuya serotipificación depende de los antígenos somáticos (O) y capsulares (K) producidos en diversas condiciones ambientales ⁽¹⁾.

El interés por la *V. parahaemolyticus* se inició muchos años atrás, luego de ser agente causante de infecciones transmitidas por alimentos en un brote ocurrido en Japón. Históricamente, la *V. parahaemolyticus* ha sido responsable del 20-30% de los casos de infección

Citar como: Caro-Castro J, Mestanza O, Quino W, Gavilán RG. Diversidad molecular de variantes patogénicas de *Vibrio parahaemolyticus* en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2020;37(2):270-5. doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.372.4984>

Correspondencia: Junior Caro Castro; Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos, Instituto Nacional de Salud, Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú; juniorcaro12@hotmail.com

Recibido: 20/11/2019

Aprobado: 29/04/2020

En línea: 01/06/2020

alimentaria en Japón y otros países asiáticos ⁽²⁾. El Perú ha registrado brotes importantes desde 1997, los cuales han sido asociados a los cambios climáticos que forman parte del fenómeno de El Niño, y que alteran condiciones ecológicas marinas, como el incremento de la tasa de abundancia del plancton ⁽³⁾. La mayoría de estos informes asocian a la hemolisina directa termoestable (TDH, por sus siglas en inglés) con la virulencia de la *V. parahaemolyticus* ⁽⁴⁾.

Actualmente, la prevalencia mundial y la emergencia de casos de infección por *V. parahaemolyticus* van en incremento, subrayando la necesidad de mantener una vigilancia adecuada de este patógeno. La microbiología convencional resulta insuficiente para determinar variantes patógenas y su distribución geográfica. En contraste, herramientas de epidemiología molecular, como el esquema de tipificación multilocus (MLST, por sus siglas en inglés) se proponen como nuevas alternativas que permiten el estudio de enfermedades infecciosas sobre la base de la diferenciación molecular de cepas. Este esquema permite la caracterización genotípica rápida de microorganismos, gracias al desarrollo de una base de datos centralizada (PubMLST) que permite comparar diversas variantes genéticas denominadas tipos de secuencias (ST, por sus siglas en inglés, *sequence type*,) y delinear rutas potenciales de dispersión ⁽⁵⁾.

El objetivo del presente estudio fue determinar las variantes genéticas de los aislados patógenos de la *V. parahaemolyticus* asociadas a casos humanos y alimentos marinos circulantes en el Perú entre 1995-2017, usando la técnica del MLST y detección *in silico* de genes de virulencia.

EL ESTUDIO

Se incluyeron 16 cepas remitidas como *V. parahaemolyticus* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS) (Bioproject: PRJNA556706) y 86 genomas peruanos disponibles en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para el análisis MLST (Tabla 1).

Las cepas fueron recuperadas en agua de peptona alcalina (Merck, Alemania) a 37 °C durante 68 horas. Posteriormente, fueron sembradas por estría en placas de agar tiosulfato citrato bilis esculina (Merck, Alemania), y se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 horas. El género *Vibrio* fue confirmado utilizando pruebas bioquímicas convencionales, y la especie *V. parahaemolyticus* mediante PCR por la presencia del gen *toxR* descrito por Kim *et al.* ⁽⁶⁾

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Alemania). La concentración y pureza del ADN se evaluaron mediante espectrofotometría (Denovix, EE. UU). La elaboración de bibliotecas de secuenciamiento se realizó con el kit Nextera XT (Illumina, EE. UU), y el secuenciamiento genómico, con el secuenciador de alto rendimiento MiSeq (Illumina, EE. UU) ⁽⁷⁾. La ca-

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio: Ante la eventual emergencia mundial de patógenos causantes de infecciones gastrointestinales, reforzar la vigilancia epidemiológica molecular de microorganismos como la *V. parahaemolyticus* contribuirá en la detección oportuna y control de brotes.

Principales hallazgos: Se detectaron 15 diferentes genotipos de *V. parahaemolyticus*, de los cuales, tres de ellos ya han causado importantes brotes en Perú, mientras que los otros 12 tienen potencial para causar epidemias a futuro debido a su carácter virulento.

Implicancias: Se actualiza la información sobre los genotipos circulantes en el Perú hasta el 2017, su prevalencia y distribución a través del tiempo.

lidad de las secuencias obtenidas fue evaluada mediante el programa FastQC v0.11.5. Las secuencias se ensamblaron *de novo* empleando el pipeline A5-miseq ⁽⁸⁾. La identificación del género y la detección de contigs contaminados se realizó con el programa Kraken ⁽⁹⁾.

Los perfiles alélicos y los ST de los genomas obtenidos se asignaron de acuerdo a la información de la base de datos del MLST para *V. parahaemolyticus* (<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus>), utilizando el programa MLST v2.10, sobre la base del esquema de siete locus descrito para la *V. parahaemolyticus* ⁽⁵⁾. La asignación de complejos clonales se realizó utilizando el programa BioNumerics v7.5 (Applied Maths). La inclusión en un complejo clonal (CC) se restringió a los ST que compartían al menos 6 de los 7 alelos, mientras que los *singletons* se definieron como ST que difieren en dos o más alelos de los otros STs. Con el mismo programa se generó un *minimum spanning tree* (MST) que muestra los ST y los CC incluidos en este trabajo. Adicionalmente, se construyó una gráfica de barras apiladas de los aislados estudiados empleando Infostat, para visualizar genotipos por año de aislamiento y por número de muestras.

Se utilizó la herramienta BLASTn para buscar factores de virulencia de la *V. parahaemolyticus*: la isla de patogenicidad de tipo 7 (VpaI-7) que contiene internamente la variante más común de la TDH obtenida del cromosoma 2 del genoma RIMD 2210633 (número de acceso: NC_004605.1) y la TRH obtenida del aislado AQ4299 (número de acceso: LC271586.1), identificando como homólogos aquellos que presenten <90% de identidad y una cobertura <60% de alineamiento a la referencia. El código empleado para la anotación se encuentra disponible en <http://github.com/OrsonMM/Blast-score-ratio-for-genomics>. Los resultados obtenidos fueron ordenados en formato de tabla en la que se indica la presencia o la ausencia de genes. Todas las secuencias obtenidas durante el estudio han sido depositadas en el GenBank (número de acceso de Bioproject: PRJNA556706).

Tabla 1. Tabla de datos de *Vibrio parahaemolyticus* peruanos utilizados en este estudio.

Año de aislamiento	Nombre de aislado	Serotipo	Origen	Tipo de secuencia	Referencia
1995	324-95, 326-95, 267-95	O4:K8	Clínico	88	11
	288-95	O5:KUT	Clínico	89	5
1996	212-96	O4:K8	Clínico	265	11
	090-96				5
1997	875-97, 906-97	O3:K6	Clínico	3	11
	763-97				5
1998	780-98, 971-98	O3:K6	Clínico	3	5
	3435-98, 784-98				5
1999	275-99, 276-99, 278-99, 279-99	O3:K6	Clínico	3	5
	698-99				11
	357-99				5
2000	330-00, 405-00	O3:K6	Clínico	3	5
	461-00, 462-00, 512-00, 429-00, 430-00, 511-00				5
	776-00				5
2001	056-01, 565-01	O3:K6	Clínico	3	5
	Peru-288				3
	498-01, 568-01				11
	463-01				5
	2564-01				Este estudio
2002	240-02	O3:K6	Clínico	3	11
	004-02, 020-02, 169-02, 551-02, 552-02, 553-02				5
	vp196-02				5
2003	038-03, 039-03, 131-03	O3:K6	Clínico	3	5
	302-03				5
2005	205-05	O3:K6	Clínico	3	5
	155-05, 156-05				5
2006	691-05	O4:K8	Clínico	265	5
	232-06				11
2007	301-07, 304-07, 369-07, 437-07, 438-07	O3:K6	Clínico	3	11
	245-07, 1257-07, 1262-07, 371-07				11
2008	514-08	O3:K59	Clínico	120	Este estudio
	P682, P729, P890				17
2009	283-09, C224-09, CO1409, C220-09, C226-09, C244-09, C235, PIURA 17, C237, 239-09, 241-09, 245-09, 247-09, 250-09, CO1609, 285-09, 287-09, 379-09, P306, Guillen 151 Peru, P310, P17-09	O3:K59	Clínico	120	16
	281-09				120
2011	1202-11	O3:K6	Clínico	3	Este estudio
2013	613-13	UT	Clínico	199	Este estudio
	1168-13	UT	Clínico	1737	Este estudio
2014	G1	O3:K6	Clínico	3	Este estudio
	1833-14	UT	Clínico	64	Este estudio
2015	249-15, 276-15	O3:K6	Clínico	3	Este estudio
	147-15, 146-15	O4:KUT	Clínico	36	Este estudio
2016	001-15	UT	Clínico	417	Este estudio
	164-16	O3:K6	Clínico	3	Este estudio
2017	686-17, 2214-17	O3:K6	Clínico	3	Este estudio
	710-17	UT	Clínico	1169	Este estudio

UT: No se pudo tipificar.

EL HALLAZGO

Las 16 cepas fueron confirmadas como *V. parahaemolyticus* por la presencia del gen *ToxR*. En cuanto a la información genómica, se obtuvo, en promedio, un tamaño genómico de 5,18 pb, compuestas por 80 contigs y un porcentaje de GC de 45,2%.

En total, se analizaron 102 genomas de cepas peruanas de origen clínico (97) y ambiental (5), aisladas en el periodo 1995-2017 (Tabla 1). Los 102 genomas fueron clasificados en 15 ST diferentes, que fueron agrupados por año de aislamiento y origen del aislado (Figura 1). Se observa que no se obtuvieron aislados en los años 2004, 2010 y 2012.

La estructura poblacional de las cepas de la *V. parahaemolyticus* peruanos (n=102) analizadas por MLST se puede visualizar mediante un MST (Figura 2). Todas las cepas pertenecientes al complejo pandémico O3:K6 se agruparon en el ST3 (n=53), correspondiente al 52% de las cepas analizadas. Además, se identificó el complejo clonal 345 (CC345) compuesto por los ST88 (n=3) y ST265 (n=9), ambas del serotipo O4:K8 que difieren en un solo locus, con una frecuencia de aislamiento de 11,8%. Las cepas restantes se incluyeron en 12 ST no relacionados, resaltando al ST120 23,5% (n=24) y ST36 1,9% (n=2) por estar relacionados con brotes o epidemias a nivel local o global (Anexo 1).

De los 102 genomas analizados, 89 aislados poseían la isla de patogenicidad *VpaI-7* (87,3%). Las copias de los genes que codifican la TDH se encontraron en 96 aislados (94,1%), siendo los ST más frecuentes: ST3, ST36, ST88, ST120 y ST265, mientras que los genes de la TRH se encontraron únicamente en los ST36, ST64, ST65 y ST417, dando un total de 6 aislados (5,9%). Los resultados agrupados por ST se

pueden visualizar en la Tabla 2, mientras que los resultados por aislado de los genes que componen la *VpaI-7* se pueden ver en el Anexo 2.

DISCUSIÓN

V. parahaemolyticus es un patógeno transmitido por alimentos de alto consumo, y, a pesar de ello, se tiene poca información sobre las variantes patogénicas y la prevalencia temporal de sus genotipos en el Perú. Este reporte subestimado de infecciones por *V. parahaemolyticus* en el ámbito hospitalario se debe a las deficiencias en el monitoreo y la investigación de enfermedades transmitidas por alimentos ⁽¹⁰⁾.

Analizando la prevalencia temporal de genotipos detectados, los aislados con mayor antigüedad corresponden a los años 1995-1996, en especial al serotipo O4:K8, pero de genotipos distintos: ST88 y ST265. Estudios previos reportan a este serotipo desde 1980 causando casos esporádicos y pequeños brotes asociado al consumo de alimentos marinos crudos, siendo en 1983 el más prevalente ⁽¹¹⁾. Estudios de vigilancia molecular revelaron a China como el origen de este serotipo, compuesto por diversos genotipos que no tienen relación clonal con el serotipo O3:K6, sugiriéndolo como un importante complejo clonal, CC345. Además, análisis de genómica comparativa revelaron que estos aislados presentaban las regiones del sistema de secreción tipo 3 (T3SS) y la *VpaI-7* ⁽¹²⁾, lo cual es acorde a lo encontrado aquí.

Por otro lado, la presencia del ST3 resalta en la distribución por año y en el MST, al ser el genotipo con mayor número de aislados secuenciados, abarcando cepas aisladas entre 1997-2017. Todas ellas presentaron la *VpaI-7* completa. El primer brote peruano del ST3 se produjo en 1997; sin

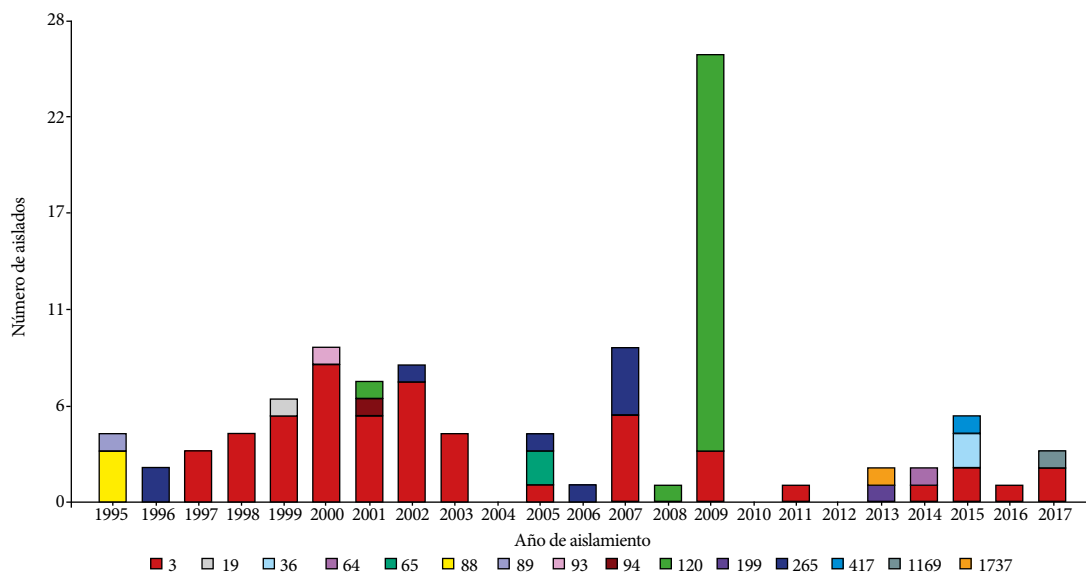


Figura 1. Distribución de *Vibrio parahaemolyticus* por año de aislamiento, elaborado con el programa InfoStat. La leyenda inferior indica el color según el tipo de secuencia.

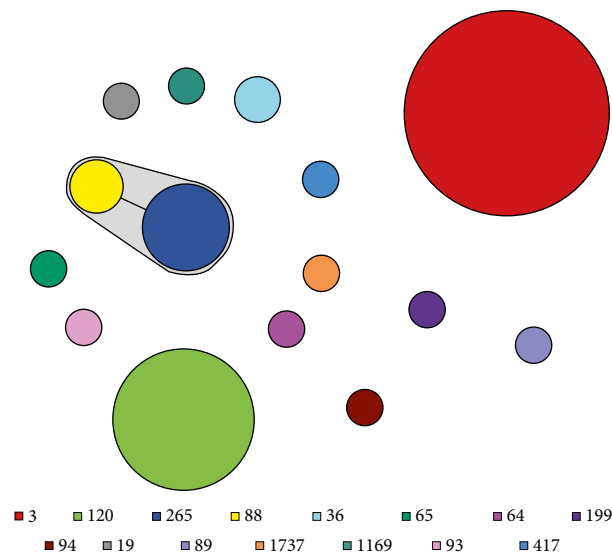


Figura 2. *Minimum spanning tree* (MST) de 102 perfiles alélicos de MLST de *V. parahaemolyticus* incluidos en este estudio diseñado con el programa BioNumerics v7.5. La leyenda indica cada tipo de secuencia, diferenciado por colores. Cada círculo representa un genotipo MLST y el tamaño es proporcional al número de cepas que incluye cada uno. Las ramas que conectan los círculos indican que pertenecen al mismo complejo clonal.

embargo, se conoce que emergió en la India en 1996 expandiéndose hasta alcanzar el continente americano (13). Este genotipo pertenece al complejo clonal pandémico (CC3) de amplia distribución mundial, siendo el clon dominante hasta hoy (5), además de ser el genotipo más explorado por poseer la mayoría de VpAI reportadas para *V. parahaemolyticus*,

Tabla 2. Detección *in silico* de factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* por tipo de secuencia

Tipo de secuencia	n	VpAI-7	tdhA	tdhS	trh
ST3	53	53	53	53	0
ST19	1	0	0	0	0
ST36	2	0	2	2	2
ST64	1	0	1	1	1
ST65	2	0	0	0	2
ST88	3	3	2	2	0
ST89	1	0	1	1	0
ST93	1	0	1	1	0
ST94	1	0	0	0	0
ST120	24	24	23	23	0
ST199	1	0	1	1	0
ST265	9	9	9	9	0
ST417	1	0	1	1	1
ST1169	1	0	1	1	0
ST1737	1	0	1	1	0
Total	102	89	96	96	6

n: número de aislados, VpAI-7: isla de patogenicidad 7, *tdhA*: gen de la hemolisina directa termoestable A, *tdhS*: gen de la hemolisina directa termoestable S, *trh*: gen de la hemolisina relacionada a la TDH.

siendo la VpAI-7 la más importante, asociada a citotoxicidad y enterotoxicidad por la presencia de la TDH y el T3SS (14).

El ST120 es el segundo grupo con mayor número de aislados en este estudio, obtenidos mayormente durante el 2009 debido a un brote del serotipo O3:K59 en el norte del país (15), el cual luego de la aplicación de vigilancia molecular por MLST fue definido como ST120, cuyo origen es China, representando la tercera introducción de poblaciones patógenas de *V. parahaemolyticus* (16). En los resultados, llama la atención la presencia de este genotipo durante 2001, muchos años antes de su primer reporte, lo cual permitiría replantear la introducción de este genotipo al Perú. Estudios de genómica comparativa serían necesarios para encontrar diferencias entre estos aislados y los que causaron el brote del 2009, los cuales comparten la presencia de la VpAI-7.

Adicionalmente, el ST36, un grupo pequeño de importancia epidemiológica dentro de los aislados peruanos analizados, tiene su origen en la región noroeste del pacífico de Norteamérica causando brotes en los Estados Unidos y Canadá (1), el cual se ha expandido desde el 2012 hasta alcanzar rápidamente otras áreas geográficas como el noroeste de España (17). En base a nuestros resultados, las primeras cepas pertenecientes a este ST aparecen en Perú en el 2011, siendo parte de la expansión de este clon en el Pacífico (18), y aunque no se ha reportado ningún brote de este genotipo, representa un riesgo epidemiológico latente debido a su potencial patogénico por la presencia de la TDH y la TRH. En este aspecto, la vigilancia molecular por MLST puede ser aplicada para el rastreo oportuno de estos aislados y frenar brotes.

En cuanto a los otros ST, no se encontró información que los señale como causantes de brote o de las epidemias alrededor del mundo. Sin embargo, no se descarta su potencial patogénico, debido a la presencia de genes que codifican la TDH o la TRH, resultados que incluyen genotipos como los ST1169 y ST1737.

El análisis de factores de virulencia detectó la presencia de los genes que codifican la TDH en gran parte de aislados clínicos, particularmente en los genotipos con mayor número de aislados analizados. Se conoce que los genes que codifican la TDH mayormente se ubican dentro de la VpAI-7, por lo que la presencia de esta región tendrá un impacto en el incremento de la virulencia de *V. parahaemolyticus* (19); sin embargo, la delección genética de las copias del gen *tdh* o de la VpAI-7 completa no es determinante para la ausencia de virulencia (14), lo que explica la detección de cepas clínicas con ausencia de TDH. Por otro lado, se detectaron genomas con TDH pero sin VpAI-7, lo cual ya fue descrito como variantes TDH no asociadas a VpAI-7 (20). Finalmente, el gen que codifica la TRH, el cual causa un efecto similar a la TDH, se encontró en un grupo muy reducido de aislados.

En conclusión, el ST3 predomina tanto temporal como numéricamente en el Perú, por lo que hasta el día de hoy es un genotipo de riesgo en salud pública asociado al consumo

de alimentos marinos crudos o semicrudos, destacando su potencial patógeno debido a la presencia de la Vpa1-7 portadora de hemolisinas. Esto, sumado a la data epidemiológica subestimada, así como la circulación de otras variantes patógenas de esta bacteria en el país, sugiere incrementar los esfuerzos en la vigilancia molecular, la cual está resultando ser una herramienta poderosa para detectar y controlar brotes e infecciones.

Agradecimientos: A Gustavo Bellido Mendoza por su incalculable apoyo técnico y a todo el equipo del Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Contribución de los autores: JC, RG y WQ participaron en la concepción, delineación de hipótesis y diseño del estudio. JC y OM participaron en el análisis, interpretación de datos y redacción del artículo. RG y OM participaron en la revisión crítica del artículo. Todos aprobaron la versión final.

Fuentes de financiamiento: La investigación fue financiada por Cienciaactiva/FONDECYT (Convenio 145-2017-FONDECYT) y por el Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú (OGITT: OI-0037-17).

Conflictos de interés: Ninguno.

Material suplementario: Disponible en la versión electrónica de la RPMESP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banerjee SK, Kearney AK, Nadon CA, Peterson C-L, Tyler K, Bakouche L, *et al.* Phenotypic and Genotypic Characterization of Canadian Clinical Isolates of *Vibrio parahaemolyticus* Collected from 2000 to 2009. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1081-8. doi: 10.1128/JCM.03047-13.
- Alam MJ, Tomochika KI, Miyoshi SI, Shinoda S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;208(1):83-7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11064.x.
- Aliaga R, Miranda J, Zevallos J. Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Rev Medica Hered.* 2010;21(3):139-45. doi: 10.20453/rmh.v21i3.1123.
- Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):39-48. doi: 10.1128/CMR.00025-06.
- Gonzalez-Escalona N, Jolley KA, Reed E, Martinez-Urtaza J. Defining a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for the Global Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 2017;55(6):1682-97. doi: 10.1128/JCM.00227-17.
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):1173-7.
- Quino W, Hurtado CV, Escalante-Maldonado O, Flores-León D, Mestanza O, Vences-Rosales F, *et al.* Multidrogresistencia de *Salmonella* infantis en Perú: un estudio mediante secuenciación de nueva generación. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2019;36(1):37-45. doi: 10.17843/rpmpesp.2019.361.3934.
- Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinforma Oxf Engl.* 2015;31(4):587-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu661.
- Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014;15(3):R46. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46.
- Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, Ishibashi M, Shimada K, Nishibuchi M, *et al.* Characterization of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Clinical Sources in Spain and Comparison with Asian and North American Pandemic Isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4672-78. doi: 10.1128/JCM.42.10.4672-4678.2004.
- Gavilan RG, Zamudio ML, Martinez-Urtaza J. Molecular epidemiology and genetic variation of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2210. doi: 10.1371/journal.pntd.0002210.
- Li B, Yang X, Tan H, Ke B, He D, Ke C, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* O4:K8 forms a potential predominant clone in southern China as detected by whole-genome sequence analysis. *Int J Food Microbiol.* 2017;244:90-5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.001.
- Guerrero A, Lizárraga-Partida ML, Gil BG, Licea-Navarro AF, Revilla-Castellanos VJ, Wong-Chang I, *et al.* Genetic Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Strains That Have Been Isolated in Mexico Since 1998. *PLoS ONE.* 2017;12(1): e0169722. doi: 10.1371/journal.pone.0169722.
- Ceccarelli D, Hasan NA, Huq A, Colwell RR. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:97. doi: 10.3389/fcimb.2013.00097.
- Zamudio ML, Meza A, Bailón H, Martinez-Urtaza J, Campos J. Experiences in the epidemiological surveillance of foodborne pathogens by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2011;28(1):128-35.
- Gonzalez-Escalona N, Gavilan RG, Toro M, Zamudio ML, Martinez-Urtaza J. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Sequence Type 120, Peru, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1235-7. doi: 10.3201/eid2207.151896.
- Martinez-Urtaza J, Aerle RV, Marin MA, Haendiges J, Myers RA, Trinanes J, *et al.* Genomic variation and evolution of *vibrio parahaemolyticus* ST36 over the course of a transcontinental epidemic expansion. *mBio.* 2017;8(6):e01425-17. doi: 10.1128/mBio.01425-17.
- Abanto M, Gavilan RG, Baker-Austin C, Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J. Global Expansion of Pacific Northwest *Vibrio parahaemolyticus* Sequence Type 36. *Emerging Infectious Diseases.* 2020;26(2):323-6. doi: 10.3201/eid2602.190362.
- Raghunath P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol.* 2015;5:805. doi: 10.3389/fmicb.2014.00805.
- Okada N, Iida T, Park KS, Goto N, Yasunaga T, Hiyoshi H, *et al.* Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infection and immunity.* 2009;77(2):904-13. doi: 10.1128/IAI.01184-08.