G. BALAKRISH NAIR

G. Balakrish Nair es Director del Laboratory Sciences Division, en el International Center for Diarrhoeal Diseases Research, Bangladesh (ICDDR,B)-Centre for Health and Population Research, Dhaka, Bangladesh.

Se graduó de Madras University en 1975, realizó una maestría en Biología Marina en 1977 en Annamalai University alcanzando el grado de PhD en 1982. Entonces se integró al Department of Microbiology, National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED), Calcutta, perteneciente al Indian Council of Medical Research and Collaborating Centre for Research and Training in Diarrhoeal Diseases, OMS, hasta el año 2000.

Ha trabajado en enteropatógenos con particular énfasis en *Vibrio cholerae*. Es el primer microbiólogo indio elegido para el Comité ejecutivo del International Union of Microbiological Society (IUMS). Además es miembro del Subcomité de Taxonomía de *Vibrionaceae*, en el International Committee on Systematic Bacteriology, desde 1986.

El Dr. Nair fue designado *Foreign Associate* de la National Academy of Sciences, E.U.A. En 2004 fue elegido Fellow of the Third World Academy of Sciences, Trieste, Italia, rebautizada como Academy of Sciences for the Developing Nations.

Entre otras distinciones ha recibido el *Certificate of Merit* del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, E.U.A., en reconocimiento a su enorme contribución a Educación en Salud Pública acerca de *Vibrio cholerae* y cólera, el *Professor S.C. Mahalanobis Memorial Award* de la Physiological Society of India, y el prestigioso *Shanti Swarup Bhatnagar for Medical Sciences* por su contribución al descubrimiento de un nuevo serogrupo de *Vibrio cholerae*, ahora identificado como O139 Bengal.

G.B. Nair es miembro del Comité Editorial de las siguientes publicaciones: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *Journal of Clinical Microbiology*, *Epidemiology and Infection*, *Microbes and Environment*, *Indian Journal of Experimental Biology* y de *Indian Journal of Microbiology*. Ha publicado más de 350 artículos en los tópicos de microbiología clínica, epidemiología molecular y patogenia molecular de bacterias entéricas.

JUAN CARLOS HORMAZÁBAL OPAZO

Juan Carlos Hormazábal Opazo, chileno, actualmente es Jefe del Subdepartamento de Microbiología Clínica del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), área a la cual pertenecen la Sección Bacteriología y el Laboratorio Nacional de Referencia de *Vibrio*.

Titulado de Médico-Cirujano en la Universidad de Concepción, Chile, en 1993. Obtuvo la especialidad en Laboratorio Clínico en la Facultad de Medicina de la Universidad de La República, Uruguay.

Durante los años 2000 al 2002 realizó el International Training and Research in Emerging Infectious Diseases Fellowship en el Center for Vaccine Development, School of Medicine, University of Maryland at Baltimore U.S.A., bajo el auspicio de The Fogarty International Center and The National Institute of Allergy and Infectious Diseases, E.U.A.

Ha estado encargado de la Sección Bacteriología y posteriormente del Sub-Departamento de Microbiología Clínica del ISP, incluyendo los laboratorios de Vigilancia y Referencia Nacional para agentes bacterianos.

Ha impulsado la implementación de técnicas diagnósticas de biología molecular en la institución y la incorporación de nuevas herramientas genéticas en el diagnóstico y tipificación microbiana.

Sus publicaciones han abarcado la caracterización epidemiológica y/o genética de infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Shigella* y ahondamientos en el conocimiento de *Enterococcus* sp multiresistente en el medio nacional.

Actualmente trabaja desde el Laboratorio Nacional de Referencia, y en conjunto con G. Balakrish Nair, en la comprensión de la pandemia de *Vibrio parahaemolyticus*.

EDITORIAL

The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic

G. Balakrish Nair

Juan C. Hormazábal O.

Among the 48 odd species currently recognized in the genus *Vibrio* belonging to the family Vibrionaceae (<http://www.theicsp.org/taxa/vibriolist.htm#vibrio>), 11 are recognized as human pathogens. Of these, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* are the most important pathogenic vibrios both in terms of disease causing ability and the magnitude of global disease burden. Among the pathogenic vibrios, only toxigenic strains of *V. cholerae* belonging to either the O1 or O139 serogroup, the causative agent of the disease cholera, have the ability to cause epidemics and pandemics. Until recently, other vibrios including *V. parahaemolyticus*, were associated only with sporadic infections or localized outbreaks.

V. parahaemolyticus causes gastroenteritis linked with the consumption of contaminated raw or undercooked seafood. The symptoms include diarrhea with abdominal cramps, nausea, vomiting, headache and low-grade fever. The mean incubation period for *V. parahaemolyticus* infection is 15 hours and ranges between 4 and 96 hours. The illness is self-limiting, of moderate severity and lasts an average of three days in immunocompetent patients. Two haemolysins of *V. parahaemolyticus*, the thermostable direct haemolysin (TDH) and the TDH-related haemolysin (TRH) are important virulence factors and either one or both are associated with clinical strains but not with environmental strains. The overall mechanism of pathogenesis of *V. parahaemolyticus* remains unclear, although Tdh has haemolytic, enterotoxic, cardiotoxic and cytotoxic activities. The serotyping scheme of *V. parahaemolyticus* includes 13 different O antigens and 71 different K types and the O:K serotype combination has proven to be useful in studying the epidemiology of the disease. Unlike *V. cholerae*, there is no association of a particular serotype with disease and any of the currently recognized 71 O:K types of *V. parahaemolyticus* can cause gastroenteritis.

In February 1996, an inexplicable increase in the incidence of the *V. parahaemolyticus* was observed among hospitalized patients in Calcutta, India¹. Analysis of the strains revealed that a unique serotype O3:K6 with identical genotype and arbitrary primed PCR (AP-PCR) profiles, not previously isolated during the surveillance in Calcutta, accounted for 50 to 80% of the infections. The pandemic propensity of this serotype became obvious when reports on the isolation of the O3:K6 serotype from clinical sources appeared in quick succession from Taiwan, Laos, Japan, Thailand and Korea². In the subsequent years, O3:K6 isolates similar to those isolated in Calcutta were reported from food borne outbreaks and from sporadic cases in Bangladesh, Chile, Japan, Korea, Laos, Russia, Taiwan, Thailand and the United States. In 2005, the pandemic clone was associated with hospitalized cases of diarrhoea in Mozambique, East Africa³ and O3:K6 strains with molecular traits of the pandemic clone were isolated from environmental sources in the French coast⁴. In southern and central Chile, this year more than 10.000 cases of *V. parahaemolyticus* infections were reported (<http://epi.minsal.cl/epi/html/Actualidad/vibrio/Mapa.htm>). This follows earlier outbreaks caused by the pandemic strain in the northern city of Antofagasta in Chile from November 1997 to March 1998 and another outbreak affecting approximately 1,500 persons occurred from January to March 2004, mainly in Puerto Montt^{5,6}. The O3:K6 clone of *V. parahaemolyticus* has now spread into four continents namely Asia, America, Africa and Europe. Such a widespread occurrence of a single serotype of *V. parahaemolyticus* was not previously reported and it became evident that a pandemic of *V. parahaemolyticus* gastroenteritis was happening.

Starting with arbitrarily primed PCR¹, a variety of molecular techniques including ribotyping and pulsed field gel electrophoresis have revealed that the O3:K6 strains associated with outbreaks in widely different geographic areas were genetically closely related group distinct from the O3:K6 and non O3:K6 strains isolated before 1996. A novel toxRS-targeted PCR method was developed to facilitate rapid diagnosis of the pandemic O3:K6 strains² which led to the serendipitous discovery of other serotypes like the O4:K68 and O1:KUT (untypable) that had AP-PCR profiles, toxRS sequences, ribotype and pulsotype identical to that of the pandemic O3:K6 clone^{2,7}. These new serotypes appeared to have diverged from the pandemic O3:K6 clone by alteration of the O:K antigens and were postulated to be clonal derivatives of the O3:K6 serotype^{2,7}. Of a possible 71 O:K serotype combinations currently recognized for *V. parahaemolyticus*, 28.2% have acquired the pandemic potential. Multilocus sequence typing provided strong molecular support for the clonal origin of pandemic *V. parahaemolyticus* O3:K6 and the pandemic strains regardless of serotype were clonal having identical allelic profile and serotype alone did not adequately define a pandemic strain⁸.

Since the discovery of the pandemic clone of *V. parahaemolyticus* efforts were centered on identifying the factor(s) that endowed them with the pandemic potential. No difference in production of TDH and no significant differences between the survival rate under the same environmental stresses like extreme temperatures, low pH, and high salinity was observed between the pandemic and non-pandemic strains of *V. parahaemolyticus*^{1,9}. The discovery of the *V. parahaemolyticus* phage, f237 and its similarity to the CTX filamentous phage of *V. cholerae* O1¹⁰ led investigators to believe that the phage may be responsible for the pandemic potential. It was thought that ORF8 of f237 speculated to encode an adherence protein might play a significant role in the enhanced infectivity of the pandemic isolates¹¹. *In vitro* adherence and cytotoxicity studies with human epithelial cells showed that O3:K6 isolates exhibited statistically higher levels of adherence and cytotoxicity to host cells than non-O3:K6 isolates¹². Studies in Bangladesh, however, showed that the ORF8 could not be detected in several of the O3:K6 pandemic strains isolated from hospitalized diarrhoea cases¹³. Other factors unique to the pandemic group relate to the presence of a sequence found to be 80% homologous to the Mn²⁺ and Fe²⁺ transporter of the NRAMP family of *V. vulnificus*¹⁴ and the identification of a histone-like DNA-binding protein, HU- α with a C-terminal amino acid sequence different from those of other strains of *V. parahaemolyticus*¹⁵. Again specific functions to these factors are unknown.

There has been the occurrence of other extraordinary events in relation to pathogenic *Vibrio* species. In the summer of 1996, a major outbreak of systemic *V. vulnificus* infections started among Israeli fish market workers and fish consumers¹⁶. Molecular analysis show that this strain evolved by the hybridization of the genomes of two existing non-pathogenic forms of *V. vulnificus* which apparently led to the emergence of an epidemic caused by the newly evolved pathogenic variant¹⁷. Similarly, the appearance of new hybrids between classical and El Tor biotypes of *V. cholerae* O1 have been reported from Matlab, Bangladesh¹⁸ and Mozambique¹⁹.

The detection of virulent *V. parahaemolyticus* in the environment against a background of numerically greater numbers of avirulent *V. parahaemolyticus* has remained a daunting problem. Undifferentiated total *V. parahaemolyticus* counts is therefore used as an indicator for the control of food contamination and towards prevention of infection. Clearly, this is inadequate as has been reflected in the outbreaks caused in the United States where despite bacteriologic monitoring at harvest sites and despite the number of *V. parahaemolyticus* being lower than the permissible 10,000 most-probable-number (MPN), the outbreaks could not be prevented²⁰.

The epidemiology of *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* are somewhat different in the sense for *V. cholerae*, the contamination through faecal-oral route is particularly important and seafood may not play the same degree of importance in transmission of cholera as it does for *Vibrio parahaemolyticus* or *V. vulnificus* infections. The transmission and epidemiology of *V. parahaemolyticus* infections in places like Calcutta in India and Bangladesh is entirely different where seafood is never eaten raw and where freshwater fish is preferred over sea water fish by the local population. Contamination of freshwater fish by sea fish at the fish market and secondary contamination of other foods in the kitchen by *V. parahaemolyticus* contaminated fish brought from markets is thought to be the most likely route of transmission in this setting²¹.

The O3:K6 and other pandemic isolates seem to have established an ecological niche in Asia²². However, because of the inability to isolate the O3:K6 serotype nor any of the ribogroups associated with the pandemic clone from environmental or food isolates in the US²³, it was felt that the pandemic O3:K6 does not have an environmental reservoir in the United States and the origin and spread of this pandemic organism may have occurred via ship ballast water. The *V. parahaemolyticus* pandemic offers an invaluable opportunity to examine factors that abet and perpetuate a pandemic and also understand factors that contribute to the decay of a pandemic as it is happening. Put together, it is a time when a judicious blend of applied and basic microbiology will reveal why such events occur and with perceptive epidemiological studies we will be able to combat and perhaps prevent the spread of this new emerging pathogen.

La pandemia de *Vibrio parahaemolyticus*

Entre las 48 diferentes especies actualmente reconocidas en el género *Vibrio* perteneciente a la familia *Vibrionaceae* (<http://www.theicsp.org/taxa/vibriolist.htm#vibrio>), 11 son identificadas como patógenas para el Hombre. De ellas, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son los vibrios de mayor trascendencia patógena tanto por su habilidad para causar enfermedad como por la magnitud de la carga de enfermedad que ocasionan. Entre los vibrios patógenos, sólo cepas de *V. cholerae* toxigénicas de los serogrupos O1 y O139, agentes causales del cólera, tienen la habilidad de causar epidemias y pandemias. Hasta muy poco tiempo atrás, otros vibrios incluyendo *V. parahaemolyticus*, eran asociados sólo con infecciones esporádicas o brotes epidémicos localizados.

Vibrio parahaemolyticus causa gastroenteritis asociada al consumo de pescados y mariscos contaminados, crudos o insuficientemente cocidos. Los síntomas incluyen diarrea con cólicos abdominales, náuseas, vómitos, cefalea y fiebre de baja cuantía. El período de incubación promedio para la enfermedad por *V. parahaemolyticus* es de 15 horas oscilando entre 4 y 96 horas. La afección es auto-limitada, de moderada severidad y dura en promedio tres días en pacientes inmunocompetentes. Dos hemolisinas de *V. parahaemolyticus*, hemolisina directa termoestable (*thermostable direct haemolysin* -TDH) y hemolisina relacionada a TDH (*TDH-related haemolysin*-TRH), son importantes factores de virulencia y la presencia de una de ellas, o ambas, están asociadas con cepas de origen clínico pero no con las de procedencia medioambiental. El mecanismo patogénico global para *V. parahaemolyticus* está aún poco esclarecido, aunque TDH tiene efectos hemolíticos, enterotóxicos, cardiotoxicos y citotóxicos. El sistema de serotipificación de *V. parahaemolyticus* incluye 13 diferentes antígenos O y 71 diferentes tipos K, y la determinación de serotipos por combinación O:K ha resultado ser útil para el estudio epidemiológico de la enfermedad. A diferencia de lo que sucede con *V. cholerae*, no hay asociación de un serotipo en particular con enfermedad, y de los actualmente 71 tipos O:K reconocidos en *V. parahaemolyticus*, todos pueden causar gastroenteritis.

En febrero de 1996 se observó un incremento inexplicable en la incidencia de *V. parahaemolyticus* entre pacientes hospitalizados en Calcuta, India¹. El análisis de las cepas reveló que un único serotipo O3:K6, con idéntico genotipo y perfil por RPC con partidores arbitrarios (AP-PCR), no aislado previamente por el sistema de vigilancia en Calcuta, era el causante de 50 a 80% de los casos. La tendencia pandémica de este serotipo se hizo evidente cuando comenzó a reportarse el aislamiento del serotipo O3:K6 de muestras clínicas en rápida sucesión en Taiwan, Laos, Japón, Tailandia y Corea². En los años siguientes, fueron reportados aislamientos de O3:K6 similares a aquellos obtenidos en Calcuta en brotes asociados a alimentos y casos esporádicos en Bangladesh, Chile, Japón, Corea, Laos, Rusia, Taiwan, Tailandia y Estados Unidos de Norteamérica. En el año 2005 el clon pandémico fue asociado con casos hospitalizados de diarrea en Mozambique, África del Este³, y se aislaron también cepas O3:K6 con rasgos moleculares del clon pandémico a partir de fuentes ambientales en la costa francesa⁴. En el sur y zona central de Chile, han sido reportados este año más de 10.000 casos de infección por *V. parahaemolyticus* (<http://epi.minsal.cl/epi/html/Actualidad/vibrio/Mapa.htm>). Este

brote le sucede a otros previamente ocurridos por la misma cepa pandémica en la ciudad norteña de Antofagasta, Chile, desde noviembre de 1997 hasta marzo de 1998, y en Puerto Montt, desde enero a marzo de 2004, que afectó aproximadamente a 1.500 personas^{5,6}.

El clon de *V. parahaemolyticus* O3:K6 se ha diseminado actualmente en cuatro continentes: Asia, América, África y Europa. Tal diseminación de un solo serotipo de *V. parahaemolyticus* no había sido reportada anteriormente, haciéndose evidente que estamos frente a una pandemia de gastroenteritis causada por *V. parahaemolyticus*.

Comenzando por tipificación por RPC con partidores arbitrarios (AP-PCR)¹, una serie de técnicas moleculares que incluye ribotipificación y electroforesis en gel de campo pulsado ha permitido comprobar que las cepas O3:K6 asociadas con brotes epidémicos en áreas geográficas ampliamente diferentes conformaban un grupo genético estrechamente relacionado, distinto de las cepas de O3:K6 y de las cepas no O3:K6 aisladas antes de 1996. Un novedoso método de tipificación por RPC, cuyo blanco es una región específica del operón *toxRS*, fue desarrollado para facilitar el diagnóstico rápido de las cepas O3:K6 pandémicas² que condujeron al descubrimiento fortuito de otros serotipos como el O4:K68 y O1:KUT (*untypable*- no tipificable) que tenían perfil AP-PCR, secuencias *toxRS*, ribotipos y pulsotipos idénticos al del clon pandémico O3:K6^{2,7}. Estos nuevos serotipos parecieran haber divergido del clon pandémico O3:K6 por alteración de los antígenos O:K y se ha postulado que constituyen derivados clonales del serotipo O3:K6^{2,7}. De un potencial de 71 combinaciones de serotipos O:K, hoy en día reconocidas para *V. parahaemolyticus*, 28,2% han adquirido el potencial pandémico. La tipificación por secuencia de multilocus ha proporcionado un fuerte soporte molecular para establecer el origen clonal del *V. parahaemolyticus* O3:K6 pandémico, y las cepas pandémicas, independientemente del serotipo, son clonales, con la base de un perfil alélico idéntico y evidenciando que sólo el serotipo no puede definir adecuadamente una cepa pandémica⁸.

Desde el descubrimiento del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* se han centrado los esfuerzos en identificar el o los factor (es) determinantes de este potencial pandémico. No se han observado diferencias en la producción de TDH ni diferencias significativas entre el porcentaje de sobrevivencia en similares condiciones de stress medioambientales (temperaturas extremas, pH bajo, y alta salinidad), entre las cepas pandémicas y no-pandémicas de *V. parahaemolyticus*^{1,9}. El descubrimiento del fago de *V. parahaemolyticus* f237 y su similitud con el fago filamentoso CTX de *V. cholerae* O1¹⁰, indujo a los investigadores a creer que este fago podría ser el responsable del potencial pandémico. Se pensó que el ORF8 de f237 podría codificar una proteína de adherencia con un rol significativo en la capacidad infectante exacerbada de los aislados pandémicos¹¹. Estudios de adherencia *in vitro* y de citotoxicidad con células epiteliales humanas han comprobado que aislados de O3:K6 exhiben niveles mayores, estadísticamente significativos, de adherencia y citotoxicidad a células huéspedes que aislados no-O3:K6¹². Sin embargo, estudios en Bangladesh comprobaron que el ORF8 no pudo ser detectado en varias de las cepas O3:K6 pandémicas recuperadas desde pacientes hospitalizados por diarrea¹³. Otros factores exclusivos del grupo pandémico se relacionan con la presencia de una secuencia con 80% de homología con el transportador de Mn²⁺ y Fe²⁺ de la familia NRAMP de *V. vulnificus*¹⁴ y la identificación de una proteína de unión de ADN histona-simil, HU- α con una secuencia aminoacídica C-terminal diferente a las de otras cepas de *V. parahaemolyticus*¹⁵. Nuevamente las funciones específicas de estos factores permanecen desconocidas.

Otros extraordinarios acontecimientos han ocurrido en relación con las especies patógenas de *Vibrio*. En el verano de 1996, una epidemia importante de infecciones sistémicas causadas por *V. vulnificus* se presentó entre trabajadores de un mercado de pescados y consumidores de los mismos en Israel¹⁶. El análisis molecular reveló que esta cepa se generó mediante la hibridación del genoma entre dos formas preexistentes de *V. vulnificus* no patógenos, lo que aparentemente derivó en la emergencia de una epidemia causada por la variante patogénica de reciente evolución¹⁷. Del mismo modo, la aparición de nuevos híbridos entre en *V. cholerae* O1 clásico y el biotipo El Tor había sido reportada en Matlab, Bangladesh¹⁸ y Mozambique¹⁹.

En el medioambiente la detección de *V. parahaemolyticus* virulento en un universo predominante de *V. parahaemolyticus* avirulento, constituye un gran problema. El recuento total indiferenciado de

V. parahaemolyticus es usado como indicador para el control de contaminación de alimentos y con el objetivo de prevenir infecciones. Claramente, es un indicador inadecuado como se ha comprobado en los brotes epidémicos ocurridos en los Estados Unidos de Norteamérica donde, pese a el monitoreo bacteriológico en sitios de recolección y a pesar que el número de *V. parahaemolyticus* era inferior al permisible 10.000 número más-probable- (NMP), los brotes epidémicos no han podido ser evitados²⁰.

Las epidemiologías de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* son algo diferentes entre sí, en el sentido que para *V. cholerae*, la contaminación vía fecal-oral es particularmente importante y los alimentos procedentes del mar pueden no jugar el mismo grado de importancia en la transmisión de esta infección, como sí sucede con las infecciones ocasionadas por *V. parahaemolyticus* o *V. vulnificus*. La transmisión y epidemiología de las infecciones por *V. parahaemolyticus* en lugares como Calcuta, India, y en Bangladesh es totalmente diferente; allí los alimentos marinos nunca son consumidos crudos y la población local prefiere el consumo de pescado de agua dulce por sobre el pescado de agua salada. En este caso se piensa que la principal ruta de transmisión sería la contaminación cruzada por pescados marinos sobre pescados de agua dulce en el mercado de expendio o la contaminación secundaria de otros alimentos en la cocina por pescado contaminado con *V. parahaemolyticus* que ha sido adquirido en los mercados²¹.

La cepa del serotipo O3:K6 y otros aislados pandémicos parecen haber establecido un nicho ecológico en Asia²². Sin embargo, a raíz de la incapacidad de aislar el serotipo O3:K6, como tampoco ninguno de los ribogrupos asociados con el clon pandémico desde el medioambiente o alimentos en E.U.A.²³, hace presumir que la cepa pandémica O3:K6 no tiene un reservorio ambiental en E.U.A. y que el origen y diseminación de este microorganismo pandémico puede haber ocurrido vía el agua de lastre de los barcos.

La pandemia de *V. parahaemolyticus* ofrece una inapreciable oportunidad para analizar los factores que favorecen y perpetúan una pandemia y además comprender aquellos factores que contribuyen al decrecimiento de una pandemia cuando aún está sucediendo. En suma, es un momento en que una juiciosa conjunción de microbiología básica y aplicada revelará porqué tales eventos ocurren, y con estudios epidemiológicos perceptivos, seremos capaces de combatir, y quizás prevenir, la diseminación de este nuevo patógeno emergente.

G. Balakrish Nair, PhD, FNA

Director, Laboratory Sciences Division,
International Centre for Diarrhoeal Diseases Research,
Bangladesh (ICDDR,B)
gbnair@icddr.org

Juan C. Hormazábal Opazo, M.D.

Jefe Subdepartamento Microbiología Clínica,
Instituto de Salud Pública de Chile
jchormazabal@ispch.cl

Bibliografía

- 1.- Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay A K, et al. 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: 3150-5.
- 2.- Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Ramamurthy T, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 578-85.
- 3.- Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen J L, Bhuiyan N A, Safa A, Sultana M, et al. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhoea in Mozambique : Spread of the pandemic into the African continent. *J Clin Microbiol* 2005; (in press).
- 4.- Quilici M-L, Robert-Pillot A, Picart J, Fournier J-M. Molecular evidence for the spread of the new O3:K6 pandemic clone of *Vibrio parahaemolyticus* in France. *Emerg Infect Dis* 2005.
- 5.- Cordova J L, Astorga J, Silva W, Riquelme C. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biol Res* 2002; 35: 433-40.
- 6.- González-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco M L, Vergara J A, Cabello F, et al. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 129-31.
- 7.- Chowdhury N R, Chakraborty S, Ramamurthy T, Nishibuchi M, Yamasaki S, Takeda Y, et al. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 631-6.
- 8.- Chowdhury N R, Stine O C, Morris J G, Nair G B. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequencing typing. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1280-2.
- 9.- Wong H C, Liu S H, Wang T K, Lee C L, Chiou C S, Liu D P, et al. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 3981-6.
- 10.- Waldor M K, Mekalanos J J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 1996; 272: 1910-4.
- 11.- Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park K S, Yokoyama K, et al. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2156-61.
- 12.- Yeung P S M, Hayes M C, DePaolo A, Kaysner C A, Kornstein L, Boor K J. Comparative phenotypic, molecular and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 isolates. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2901-9.
- 13.- Bhuiyan N A, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, Alam K, Chowdhury N R, Nishibuchi M, et al. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 284-6.
- 14.- Okura M, Osawa R, Iguchi A, Takagi M, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. PCR-based identification of pandemic group of *Vibrio parahaemolyticus* with a novel group-specific primer pair. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 787-90.
- 15.- Williams T L, Musser S M, Nordstrom J L, Paola A D, Monday S R. Identification of a protein biomarker unique to the pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1657-65.
- 16.- Bisharat N, Raz R. *Vibrio* infection in Israel due to changes in fish marketing. *Lancet* 1996; 348: 1585-6.
- 17.- Bisharat N, Cohen D I, Harding R M, Falush D, Crook D W, Peto T, et al. Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 30-5.
- 18.- Nair G B, Faruque S M, Bhuiyan N A, Kamruzzaman M, Siddique A K, Sack D A. New variants of *Vibrio cholerae* biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3296-9.
- 19.- Ansaruzzaman M, Bhuiyan N A, Nair G B, Sack D A, Lucas M, Deen J L, et al. The Mozambique Cholera Vaccine Demonstration Project Coordination Group. Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2057-9.
- 20.- Pal S C, Sircar B K, Nair G B, Deb B C. Epidemiology of bacterial diarrhoeal diseases in India with special reference to *Vibrio parahaemolyticus* infections. In: *Bacterial Diarrhoeal Disease*, Eds. Y. Takeda and T. Miwatani. KTK Scientific Publishers, Tokyo, p. 1984; 65-73.
- 21.- Daniels N A, MacKinnon L, Bishop R, Altekruze S, Ray B, Hammond RM, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect Dis* 2000; 181: 1661-6.
- 22.- Arakawa E, Murase T, Shimada T, Okitsu T, Yamai S, Watanabe H. Emergence and prevalence of a novel *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Japan. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 246-7.
- 23.- DePaola A, Ulaszek J, Kaysner C A, Tenge B J, Nordstrom J L, Wells J, et al. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 3999-4005.