

## 한국과 일본에서 유행하는 장염비브리오의 병원성 인자와 유전자의 특성

홍석원 · 문지영 · 이복권<sup>1</sup> · 김영부\*

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실, <sup>1</sup>국립보건원 세균질환부 장내세균과

Received December 20, 2006 / Accepted January 17, 2007

**Genetic Characteristics and Virulence Factors of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* Isolated in South Korea and Japan.** Seuk Won Hong, Ji Young Moon, Bok Kwon Lee<sup>1</sup> and Yung Bu Kim\*. *Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, Busan, 602-739, Korea, <sup>1</sup>Laboratory of Enteric Bacteria, Department of Microbiology, National Institutes of Health, Seoul, 122-701, Korea* – A total of 27 strains of *Vibrio parahaemolyticus* (18 strains isolated from Korea and 9 strains from Japan) were serotyped and examined for biochemical characteristics, antimicrobial susceptibility patterns, cytotoxicity assay, thermostable direct hemolysin (TDH) production and molecular epidemiology. Using polymerase chain reaction (PCR) method and DNA probe hybridization method, the strains were tested for *toxR*, *tdh*, *trh* and ORF 8 genes. The *V. parahaemolyticus* isolated from patients were belonged to 8 different serotypes : O3:K6, O1:K38, O3:K57, O4:K9, O4:K12, O4:K68, O5:K15 and O6:K46. Urease-positive strain possessed the *trh* gene, and conversely, urease-negative strains lacked the gene, indicating that urease production by *V. parahaemolyticus* strains strongly correlates with the possession of the *trh* gene. Most strains showed multiple resistant to more than three antibiotics and the antibiogram could be classified into 6 group (I to VI). All of the O3:K6 strains isolated in South Korea and Japan produced TDH at high levels. The TDH titers ranged between 256 and 2,048, and the average titer was 1009. To distinguish the new and increasingly common *V. parahaemolyticus* strains from clinical isolates, ORF 8 is a useful genetic marker. After Southern hybridization, the *Hind*III restriction fragment patterns of the *tdh* gene were grouped one type, respectively. One type showed two bands one of which was 4.3kb and the other was 11.5kb in size. Variation between the O3:K6 serotype are minor when compared to the differences seen with the non O3:K6 strains. The migration patterns of *Not* I -digested of the total DNA of the O3:K6 strains were similar, and only slight variations were observed between the serotypes. By contrast, the O3:K6 strains and non O3:K6 had markedly different profiles. In conclusion, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) profile using appropriate primers was an effective epidemiological marker.

**Key words** – *Vibrio parahaemolyticus*, virulence factor, PCR, RAPD, PFGE

### 서 론

장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)의 장관 감염증은 한국, 일본, 대만 등 동남아시아를 비롯하여 유럽, 미국 등에서 유행하는 식중독의 원인균이며 또한 해외여행자 설사증의 주요한 원인균이다[2,10,25]. 장염비브리오의 혈청형은 13종의 O 균체항원과 75종의 K 협막항원으로 분류되고 있으며 감염증을 일으키는 혈청형은 다양하다. 장염비브리오의 중요한 병원인자로는 Wagatsuma 혈액한천배지에서 Kanagawa 현상(KP)을 일으키는 내열성 용혈독(thermostable direct hemolysin; TDH)와 TDH 유사독소(TDH-related hemolysin; TRH)의 2종류가 있으며[15,21,24,28,32], TDH와 TRH는 세포막에 pore를 형성하는 독소로서 장관독성과 심장독성이 있다[7]. 독소 생성 유전자인 *tdh*와 *trh*는 플라스미드 DNA와 염색체 DNA에 존재한다. 다른 비브리오균종에서는 *V. chol-*

*erae* non-O1, *V. hollisae*, *V. mimicus*가 TDH 유사독소(각각 NAG-rTDH, Vh-rTDH, Vm-TDH)를 생성하는데, Vm-TDH, NAG-rTDH는 내열성으로 TDH와 유사하고, Vh-rTDH는 이 열성으로 TRH와 유사하다[23]. *trh* 유전자는 염기배열이 84%의 상동성을 보이는 *trh1*과 *trh2*의 두 종류가 있다[12]. 병원성의 역학적 해석에서 *trh1* 보유균주와 *trh2* 보유균주는 모두가 설사증에 관계하는 병원성 균주이며[12,26,30] 최근에는 해외여행자의 설사증 환자에서 분리되는 장염비브리오 중에서 *trh* 보유 균주의 분리비율이 높고 urease 생성과 관련성이 보고되고 있다[31].

단일 혈청형에 의한 식중독 발생은 멕시코와 미국 서부해안에서 발생한 O4:K12 균주에 의한 감염증 이라는 보고가 없었다[19]. 1996년 2월 이후부터 캘커타(Calcutta)에서 혈청형 O3:K6 균주가 처음으로 대유행을 하기 시작하여 1998년 이후 O4:K68 및 O1:K untypeable (KUT)의 장염비브리오가 범세계적으로 유행을 하고 있다. 이러한 혈청형의 유행균주는 독특한 open reading frame 8 (ORF 8)을 보유하는 삽입상 파지에 의한 horizontal gene transfer에 의한 것으로 연구되었다[1,3,16,19].

\*Corresponding author

Tel : +82-51-240-7712, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : ybkim@pusan.ac.kr

따라서 본 연구는 한국과 일본에서 유행하는 장염비브리오의 병원성 인자와 유전자의 역학적 연구에 도움이 될 특성을 비교하기 위하여 국내에서 분리된 환자유래 장염비브리오균주와 일본 후쿠오카 지역의 환자에서 분리한 장염비브리오균주에 대하여 *toxR* 유전자의 검출, 혈청형별 검사, 약제내성의 양상, *tdh*, *trh1* 및 *trh2* 유전자의 보유상태 및 생화학적 성상 중에서 urease 생성성에 대하여 검토하고, 특히 혈청형 O3:K6 장염비브리오에 대하여 TDH의 생성성에 대한 검사를 실시하였다. 또한 유전자형별을 검토하기 위하여 *tdh* 양성균주의 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 형별, ORF8의 분포, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 법과 random amplified polymorphic DNA (RAPD)법을 실시하여 분석하였다.

**재료 및 방법**

**사용 균주**

본 연구에서 사용된 균주는 1999년에서 2001년도에 걸쳐서 국내에서 분리된 환자유래의 장염비브리오 18균주, 2002년도에 일본 후쿠오카에서 분리된 환자유래의 장염비브리오 9균주 등 27균주를 대상으로 하였다. 균주는 Ewing[6]의 방법에 따라 생화학적 및 혈청학적인 방법으로 동정하였으며, 최종적인 장염비브리오의 동정은 *toxR* 유전자의 검출로 확인하였다[11].

**약제감수성 시험**

감수성 검사는 평판희석법에 의하여 Mueller-Hinton 한천 배지 (Difco)를 사용하였으며 방법 및 내성균의 판정은 Clinical and Laboratory Standards Institute의 기준[20]에 준하였다. 사용한 약제는 BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility Test Discs (Difco, Becton Dickinson Co, MD., USA)의 제품으로 tetracycline (Te, 30 µg), cefoperazone (Cfp, 75 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), penicillin (P, 10 µg), ox-

acillin (Ox, 1 µg), gentamicin (Gm, 10 µg) 및 vancomycin (Va, 30 µg)의 7가지를 사용하였다.

**TDH 생성 시험**

TDH 생성은 reversed passive latex agglutination (RPLA) 법으로 KAP-RPLA kit (Denka Seiken)를 사용하여 검출하였다[10,34]. 실험균주를 KP배지 (2% NaCl peptone, 0.5% D-mannitol 및 5% NaCl 함유한 액체배지, pH 7.8)에 접종하여 37°C에서 16시간 진탕 배양한 후 4°C, 12,000 rpm으로 원심분리하고 그 상청액을 2배 단계로 희석하여, KAP-RPLA kit 사용설명서에 준하여 microplate법으로 실시하였다.

***tdh*, *trh1* 및 *trh2* 유전자 검출**

*tdh*와 *trh*의 유전자 검출은 PCR법과 DNA probe hybridization법으로 하였다.

**PCR법**

Table 1과 같이 primers는 *tdh*[22], *trh 1* 및 *trh 2*[24] 유전자의 염기배열 중에서 특이영역 oligonucleotides를 합성하여 사용하였다. 실험균주의 DNA 추출과 PCR은 위의 *toxR* 유전자의 검출과 동일하게 실시하였으며, 증폭과정은 94°C 5분간 예비 가열한 후, 열변성 94°C, 1분간 실시하고, 1분간 55°C에서 annealing 과정, 1분간 72°C 신장 과정을 35 cycles을 실시하여 2% agarose gel에서 확인하였다.

**DNA probe hybridization법**

**a) Probe DNA의 제작**

*tdh*, *trh1* 및 *trh2* 유전자의 형별은 polynucleotide probe를 사용한 DNA colony blot으로 실시하였다. 즉, *tdh* 유전자는 클론화된 plasmid pCVD518를 QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)로 분리한 후, 415 bp *Pst* I 단편을 probe로서 사용하였으며, *trh1* 유전자는 클론화된 plasmid pKTN 101을 분리하여 334 bp *Bam*HI-*Eco*RI 단편을 그

Table 1. Sequences of primer pairs for polymerase chain reaction for the detection of target DNA fragments

Target genes	Primer pairs	Annealing temperatures	Size of amplified products
<i>toxR</i>	5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3' 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'	63°C	368 bp
<i>tdh</i>	5'-CCAAATACATTTTACTTGG-3', 5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3'	55°C	199 bp
<i>trh 1</i>	5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3' 5'-TGGCGTTTCATCCAAATACG-3'	55°C	210 bp
<i>trh 2</i>	5'-GGCTCAAAATGGTTAAGCG-3' 5'-CAITTCGGCTCTCATATGC-3'	55°C	250 bp
ORF 8	5'-GTTTCGCATACAGTTGAGG-3' 5'-AAGTACAGCAGGAGTGAG-3'	57°C	700 bp

리고 *trh2*는 plasmid pKTN 909를 분리한 후, 419 bp *Bam*HI-*Eco*RI 단편을 probe로 사용하였다. 위의 probe DNA의 표지는 DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 시행하였다[12].

#### b) Southern blot hybridization

Probe의 labeling은 random primed DNA labeling법에 의해서 digoxigenin-11-deoxyuridine-triphosphate (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 시행하였다.

#### ORF 8 유전자의 검출

ORF 8 유전자[8]의 염기배열 중에서 특이영역 oligonucleotide를 합성한 primer를 사용하여 PCR은 앞에서 언급된 *toxR* 유전자의 검출과 동일하게 실시하였다. 그리고 유전자 증폭과정은 96°C 5분간 예비 가열한 후, 열변성 94°C, 1분간 실시하고, 1분간 53°C에서 annealing 과정, 1분간 72°C에서 신장과정을 25 cycles을 실시하였다. 10 $\mu$ L의 PCR 증폭산물과 molecular weight marker로는 100 kb DNA ladder (TaKaRa Biomedicals)를 2% agarose gel 전기영동하였다.

#### 유전자 형질의 시험

*Not* I 효소를 이용한 PFGE, arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR)을 이용한 RAPD법으로 실시하였다.

#### Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Mold 제작은 CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 시행하였다. 각 plug당 30U의 *Not* I (TaKaRa Biomedicals) 제한효소를 첨가하여 37°C에서 24시간 처리 후 CHEF-DR III system (Bio-Rad)을 사용하여 1% pulsed field certified agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 영동조건은 pulse시간 2초에서 40초, 전압 6V/cm, 18시간으로 하였다. 영동 후 EtBr로 염색하고 사진촬영을 실시하였으며 Lambda DNA ladders를 molecular weight marker로서 사용하였다[8,33].

#### AP-PCR을 이용한 random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis

염색체 DNA의 분리는 실험균주를 LB 한천평판배지에서 37°C 24시간 배양한 후 1개의 집락만을 선택하여 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 사용하였으며 primers는 Table 2와 같이 사용하였다.

#### *tdh* 유전자의 restriction fragment length polymorphism (RFLP)

염색체 DNA의 분리는 Wizard Genomic DNA purification

Table 2. Primers used in the AP-PCR profile of *V. parahaemolyticus*

Primers	Oligonucleotide sequences	G+C contents (%)
OPE-16	5'-GGTGACTGTG-3'	60
OPK-01	5'-CATTCGAGCC-3'	60
OPK-04	5'-CCGCCCAAAC-3'	70
OPP-03	5'-CTGATACGCC-3'	60

Kit (Promega)를 이용하여 분리한 후 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다. 염색체 DNA는 제한효소 *Hind* III을 사용하여 37°C, 20시간 반응시켜 절단하고 처리된 DNA를 1.0% agarose gel에서 10 mA 15V로 18시간 전기영동한 후 위와 같이 Southern hybridization을 실시하였다[29]. Molecular weight marker로 DNA Molecular Weight Marker VII, digoxigenin-labeled (Roche)를 사용하였다.

## 결 과

#### 장염비브리오의 혈청형의 분포와 *toxR* 유전자의 검출 및 생화학적 성상

장염비브리오 27균주에 대한 혈청형의 분포, urease 생성, *toxR* 유전자의 보유 상황은 Table 3, 4와 같다. 혈청형의 분포는 국내 분리주의 경우 1999년도 환자유래 9균주 중 8균주가 O3:K6, 1균주가 O4:K9이었고, 2000년 환자유래 4균주는 모두 O6:K46이었으며, 2001년 환자유래 5균주 중 2균주는 O3:K6, 3균주는 각각 다른 O4:K9, O3:K57, O5:K15으로 모두 5종류의 혈청형을 나타내었다. 반면 일본 분리주의 경우 9균주 중 3균주는 각각 O1:K38, O4:K68, O4:K12이었고, 나머지 6균주는 모두 O3:K6로 모두 4종류의 혈청형을 나타내었다. 그리고 일본 분리균주 1 균주를 제외하고는 모두 urease 음성이었다. 또한 *toxR* 유전자는 실험균주 전부가 보유하고 있어 장염비브리오로 확인 동정할 수 있었다.

#### 약제감수성 시험

7종류의 항생제를 사용한 항생제 감수성 시험에서는 vancomycin과 oxacillin은 27균주 (100%), penicillin에 대하여서는 26균주 (96.3%)에서 높은 내성을 나타내었고 gentamicin에 대하여서는 10균주 (37.0%)가 내성을 나타내는 반면에 그 외 항생제에 대해서는 tetracycline 4균주 (14.8%), chloramphenicol 1균주 (3.7%), cefoperazone 1균주 (3.7%)를 제외한 대부분의 균주에서 감수성을 나타내었다. 그리고 각 항생제의 내성 양상을 살펴보면 I-VI형의 6종류로 분류할 수 있었으며 한국 및 일본의 대부분의 균주는 혈청형별에 관계없이 vancomycin, oxacillin, penicillin에 내성을 나타내는 V형이 15균주 (55.6%)로 가장 많이 나타났고 그 다음으로 vancomycin, oxacillin, gentamicin 및 penicillin에 내성을 나타

Table 3. Biochemical characteristics and detection of *tdh*, *trh1* and *trh2* gene by polymerase chain reaction in *Vibrio parahaemolyticus* strains

Strain no.	Source (Yr of isolation)	O:K serovar	Urease	Detection of gene by PCR			TDH titer <sup>c</sup>	RFLP (kb) <sup>d</sup>
				<i>tdh</i>	<i>trh1</i>	<i>trh2</i>		
V. <i>parahaemolyticus</i> O3:K6	KVP-01	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	256	4.3, 11.5
	02	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	256	4.3, 11.5
	03	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	256	4.3, 11.5
	04	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	512	4.3, 11.5
	05	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	512	4.3, 11.5
	06	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	512	4.3, 11.5
	07	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	256	4.3, 11.5
	08	Korea, (1999)	O3:K6	-	+	-	256	4.3, 11.5
	09	Korea, (2001)	O3:K6	-	+	-	2048	4.3, 11.5
	10	Korea, (2001)	O3:K6	-	+	-	2048	4.3, 11.5
	11	Korea, (2001)	O3:K6	-	+	-	2048	4.3, 11.5
V. <i>parahaemolyticus</i> non O3:K6	JVP-01	Japan, (2002)	O3:K6	-	+	-	1024	4.3, 11.5
	02	Japan, (2002)	O3:K6	-	+	-	1024	4.3, 11.5
	03	Japan, (2002)	O3:K6	-	+	-	1024	4.3, 11.5
	04	Japan, (2002)	O3:K6	-	+	-	1024	4.3, 11.5
	05	Japan, (2002)	O3:K6	-	+	-	2048	4.3, 11.5
	06	Japan, (2002)	O3:K6	+	-	+	1024	ND <sup>e</sup>
V. <i>parahaemolyticus</i> non O3:K6	KVP-12	Korea, (1999)	O4:K9	-	+	-	ND	ND
	13	Korea, (2000)	O6:K46	-	+	-	ND	ND
	14	Korea, (2000)	O6:K46	-	+	-	ND	ND
	15	Korea, (2000)	O6:K46	-	+	-	ND	ND
	16	Korea, (2000)	O6:K46	-	+	-	ND	ND
	17	Korea, (2001)	O3:K57	-	+	-	ND	ND
	18	Korea, (2001)	O5:K15	-	+	-	ND	ND
	JVP-07	Japan, (2002)	O4:K12	-	+	-	ND	ND
	08	Japan, (2002)	O4:K68	-	+	-	ND	ND
09	Japan, (2002)	O1:K38	-	+	-	ND	ND	

<sup>a</sup> +; present, -; absent

<sup>b</sup> C; chloramphenicol, Cfp; cefoperazone, Gm; gentamicin, Ox; oxacillin, P; penicillin, Te; tetracycline, Va; vancomycin

<sup>c</sup> Reciprocal of the highest dilution of the culture supernatant that gave positive reaction in the RPLA test

<sup>d</sup> Determined by the Southern blot analysis with the *tdh* gene probe

<sup>e</sup> ND, not determined.

내는 IV형 7균주 (25.9%)로 높게 나타났으며 전체 27균주 중 14균주 (51.9%)가 4가지 이상의 항생제에 다제내성을 나타내었다. 또한 국내 분리주의 경우 V형이 가장 많이 나타났으며, 특히 혈청형 O3:K6균주들은 대부분이 V형의 내성 양상을 나타냈다 (Table 3, 4).

**병원성 유전자의 보유상황 및 TDH 생성성**

PCR법과 DNA probe법의 두 가지 방법으로 *tdh*, *trh1* 및 *trh2* 유전자를 검출한 결과는 다음과 같다. *tdh* 유전자는 실험균주 27균주 중에서 26균주가 PCR법과 DNA probe hybridization법의 결과에서 양성으로 나타났으며 (Fig. 1), 27균주 중에서 26균주는 urease를 생성하지 않았으나, 일본 환자유래 혈청형 O3:K6 1균주만이 *tdh* 유전자 음성, *trh2* 유전

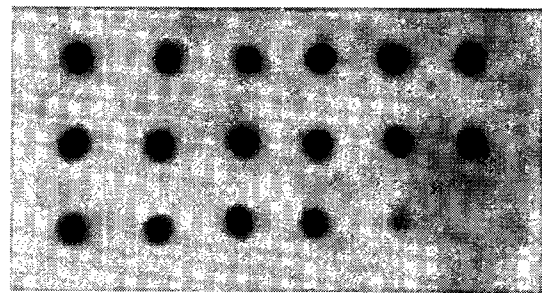


Fig. 1. Results of the DNA colony hybridization tests for the detection of *tdh* genes in *V. parahaemolyticus* serotype O3:K6 strains. Strains were grown on identical spots on all the blots. The blots were hybridized with polynucleotide probes for the *tdh* gene under high-stringency condition.

Table 4. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* strains by serobar, antibiogram, RAPD, PFGE, virulence factors and geographical origin

Strain no.	O:K serovar	PCR		RAPD profiles pattern				PFGE	Antibiogram <sup>a</sup>	
		<i>toxR</i>	ORF8	OPE-16	OPK-01	OPK-04	OPP-03			
V. <i>parahaemolyticus</i> O3:K6	KVP-01	O3:K6	+	+	A	A	A	A	1	III <sup>b</sup>
	02	O3:K6	+	+	B	B	A	A	2	IV
	03	O3:K6	+	+	B	B	A	B	3	I
	04	O3:K6	+	+	B	B	A	B	3	V
	05	O3:K6	+	+	B	B	A	B	3	V
	06	O3:K6	+	+	B	B	A	B	3	V
	07	O3:K6	+	+	B	B	A	B	3	V
	08	O3:K6	+	+	B	B	A	B	3	V
	09	O3:K6	+	+	B	B	A	C	4	V
	10	O3:K6	+	+	B	B	A	A	2	V
	11	O3:K6	+	+	B	B	A	A	2	V
V. <i>parahaemolyticus</i> non O3:K6	JVP-01	O3:K6	+	+	B	B	A	A	2	V
	02	O3:K6	+	+	B	B	A	A	2	V
	03	O3:K6	+	+	C	B	A	A	5	IV
	04	O3:K6	+	+	B	B	B	A	6	II
	05	O3:K6	+	+	D	B	A	A	7	IV
	06	O3:K6	+	+	E	B	C	C	8	IV
V. <i>parahaemolyticus</i> non O3:K6	KVP-12	O4:K9	+	-	a	a	a	a	i	IV
	13	O6:K46	+	+	b	b	b	b	ii	V
	14	O6:K46	+	+	b	b	b	b	ii	IV
	15	O6:K46	+	+	b	b	b	b	ii	V
	16	O6:K46	+	+	b	b	b	b	ii	II
	17	O3:K57	+	-	c	c	c	c	iii	V
	18	O5:K15	+	-	d	d	d	d	iv	IV
	JVP-07	O4:K12	+	-	e	e	e	e	v	VI
	08	O4:K68	+	+	b	b	b	b	ii	V
09	O1:K38	+	-	f	f	f	f	vi	V	

<sup>a</sup> Antibiogram, expressed as the resistance profile observed with the following antimicrobial agents: chloramphenicol (C), cefoperazone (Cfp), gentamicin (Gm), oxacillin (Ox), penicillin (P), tetracycline (Te) and vancomycin (Va)

<sup>b</sup> I; VaOxGmPCTe, II; VaOxGmP, III; VaOxPCfpTe, IV; VaOxGmP, V; VaOxP, VI; VaOx

<sup>c</sup> ND, not determined.

자 양성으로 urease 양성을 나타냈다 (Table 3).

또한 혈청형 non O3:K6를 제외한 혈청형 O3:K6 16균주를 대상으로 RPLA 실험에 의한 TDH 생성성을 살펴본 결과는 Table 3과 같이 균주에 따라 TDH 생성 역가는 다소 차이는 있었으나 전 균주가 256배에서 2,048배 정도로 나타났으며, 특히 일본분리주의 경우 1,024배에서 2,048배로 TDH 생성성의 역가가 상당히 높았다. *tdh* 유전자 양성 16균주의 RFLP 양상은 모든 균주가 11.5 kb와 4.3 kb *Hind*III DNA 단편위에 *tdh* 유전자를 보유하고 있었다 (Fig. 2).

**유전자형별**

ORF 8의 DNA-specific oligonucleotide primer에서 혈청형 O3:K6 16균주에서 증폭되었으나, 혈청형 non O3:K6 균주인 혈청형 O4:K9, O3:57, O5:K15, O4:12 및 O1:K38 균주에서

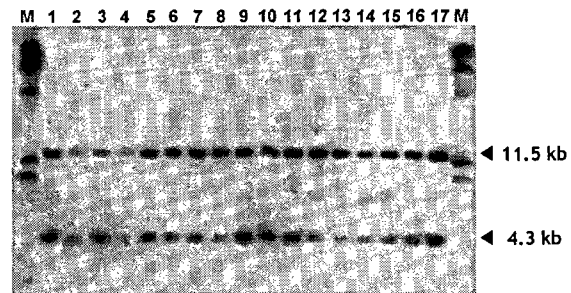


Fig. 2. Results of Southern blot hybridization analysis of the *Hind*III-digested cellular DNAs for *V. parahaemolyticus* serotype O3:K6 strains carrying *tdh* gene. The blots were examined by Southern blot hybridization analysis with the polynucleotide probe for the *tdh* gene under high-stringency condition. Lane M, DNA Molecular Weight Marker VII (Roche); lanes 1-17, *V. parahaemolyticus* serotype O3:K6 strains.

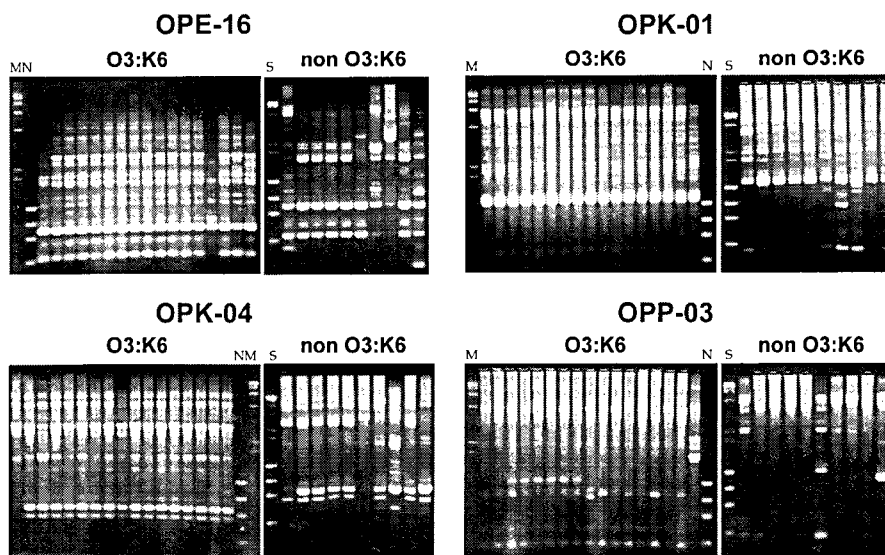


Fig. 3. Results of Arbitrarily-primed polymerase chain reaction assay for *V. parahaemolyticus* strains isolated in South Korea and Japan. Lane M, Lambda DNA digested with *Hind* III (Molecular size markers); lane N, phage  $\Phi$ X174 DNA digested with *Hae* III (Molecular size markers); lane S, mixture of lambda DNA digested with *Hind* III and phage  $\Phi$ X174 DNA digested with *Hae* III (Molecular weight markers); lanes 1-17, *V. parahaemolyticus* O3:K6 strains; lanes 18-27, *V. parahaemolyticus* non O3:K6 strains.

ORF 8은 음성이었으며, 특히 혈청형 O6:46 4균주 모두에서 ORF 8 양성을 나타내어 새롭게 나타난 유행균주일 가능성을 시사하였다.

한국 및 일본에서 분리된 환자유래의 혈청형 O3:K6 17균주와 혈청형 non O3:K6의 10균주에 대한 유전자형별을 AP-PCR을 이용한 RAPD법과 PFGE법으로 실시한 결과는 다음과 같았다. RAPD법에서 혈청형 O3:K6 17균주에서는 OPE-16 primer에 의해 A, B, C, D, E의 5종류로 OPP-16, OPK-01, OPK-04 및 OPP-03 primer에 의해 각각 A, B, C의 3종류로 각각 분류할 수 있었다. 따라서 4종류의 primers의 분류를 조합하여 8형 (A, B, C, D, E, F, G 및 H형)으로 분류할 수 있었으며, 한국유래균주는 C형이 주류를 이루었으나 일본 유래균주는 4가지 primers의 조합에서는 B, E, F, G, H형으로 세분할 수 있었다. 한국유래균주와 일본유래균주의 RAPD법에서 4종류의 primers의 조합에서 완전하게 일치하는 것은 B형으로 한국유래 3균주와 일본유래 1균주가 완전하게 일치하였다. 또한 혈청형 non O3:K6 균주에서는 혈청형에 따라 각각 a, b, c, d, e, f로 세분할 수 있었고 혈청형 O3:K6와 non O3:K6와 전혀 다른 RAPD 양상을 나타내어 AP-PCR법으로 혈청형 O3:K6 유행균주와 non O3:K6를 감별할 수 있었다 (Table 4, Fig. 3).

제한효소 *Not* I 를 사용한 PFGE 양상은 혈청형 O3:K6 17균주는 1형에서 8형으로 형별되었으며 한국 유래균주는 1형, 2형, 3형, 4형의 4종류로 형별되었으며 3형이 6주에 가장 많았으며, 일본 유래균주는 2형, 5형, 6형, 7형 8형의 5종류로 형별되었다. 혈청형 non O3:K6는 i형에서 vi형의 6종류로 형별되

었으나, 혈청형 O3:K6와는 전혀 다른 양상을 나타냈다 (Table 4, Fig. 4). 또한 혈청형 O3:K6 균주들은 RAPD법과 PFGE법으로 유전자형별을 비교 검토한 결과 RAPD와 거의 동일한 유전자형별의 결과를 나타내었다. 그리고 antibiogram의 양상은 RAPD법과 PFGE법과는 무관하였다 (Table 4).

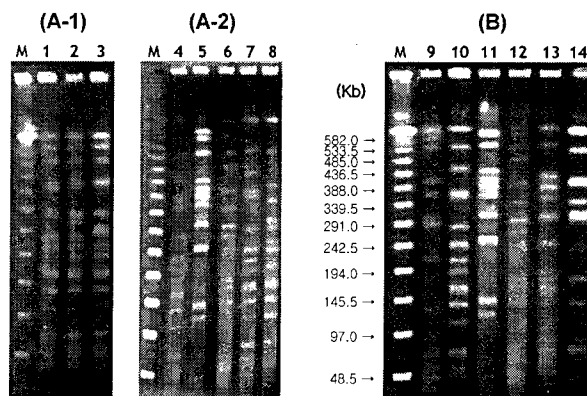


Fig. 4. PFGE patterns of *Not* I-digested genomic DNAs from *V. parahaemolyticus* strains isolated in South Korea and Japan. (A-1) *V. parahaemolyticus* O3:K6 strains, (A-2) *V. parahaemolyticus* O3:K6 strains, (B) *V. parahaemolyticus* non O3:K6 strains. Lane M, bacteriophage lambda DNA ladder as a PFGE marker (Bio-Rad); lane 1, KVP-01; lane 2, KVP-02; lane 3, KVP-03; lane 4, KVP-09; lane 5, JVP-03; lane 6, JVP-04; lane 7, JVP-05; lane 8, JVP-06; lane 9, KVP-12; lane 10, KVP-13; lane 11, KVP-17; lane 12, KVP-18; lane 13, JVP-07; lane 14, JVP-09.

## 고 찰

장염비브리오의 감염증은 다양한 혈청형에 의하여 진단용 항혈청은 13 O 균체항원과 75 K 협막항원의 조합에 의해 84 종류의 혈청형으로 분류되고 있으며 역학적 지표로서 널리 이용되고 있다. 일반적으로 1996년 이후 장염비브리오의 감염증에서 혈청형 O3:K6가 단연 우위를 차지하고 있다[1,2,19]. 1996년 이전에는 장염비브리오는 콜레라 O1 및 O139와는 다르게 범세계적인 유행은 없었으며 산발적인 식중독 발생이 보고되었으나, 1996년 이후 새로운 O3:K6 균주의 출현으로 본 균의 역학적인 문제가 크게 변화하였다. 혈청형 O3:K6은 현재에도 지속적으로 유행하고 있으며, 특히 미국에서 장염비브리오 식중독의 증가는 현저하게 증가하고 있고, 1997년과 1998년에 두 차례의 폭발적인 발생으로 400명 이상의 환자가 발생하였으며 텍사스와 뉴욕에서도 O3:K6 균주가 분리되었다[8,10]. 1992년부터 1995년에 걸쳐서 대만에서 자주 분리된 혈청형은 O1:K56, O3:K29, O4:K8 및 O5:K15였으나, 1996년에 51%의 O3:K6 균주가 분리된 이후 매년 증가하고 있는 추세이다[2]. 일본에서도 1996년 1월부터 9월에 걸쳐서 발생한 장염비브리오의 식중독은 20%, 97년에 같은 기간에 33%, 98년 같은 기간에 34%가 O3:K6 혈청형으로 보고되었으며[29], 한국에 Kim[10]의 보고에서도 혈청형 O3:K6이 보고되었다. 그러나 1997년 이후부터는 범세계적인 유행균주가 혈청형 O3:K6 이외에 O4:K68, O1:KUT, O1:K25, O1:K41 및 O4:K12 등도 보고되고 있다[1,19]. 본 연구에서 1999년도부터 2001년도까지 3년간에 걸쳐서 분리한 국내유래균주와 2002년 일본 후쿠오카 지역 유래균주의 혈청형 분포를 살펴본 결과 O4:K9 (3.7%), O6:K46 (14.8%), O1:K38 (3.7%), O4:K12 (3.7%), O4:K68 (3.7%), O3:K57 (3.7%) 및 O3:K6 (63.0%)으로 나타났으며, O3:K6 혈청형이 단연 우위를 차지하고 있었다. 특히 일본 균주 중에서 O4:K68과 O4:K12가 각각 1균주 그리고 국내에서 새로운 혈청형 O6:K46 4균주가 검출된 것은 처음 나타난 혈청형으로 흥미로운 일이다.

장염비브리오와 다른 비브리오 균종의 감별 및 분리 동정에 있어서 생화학적 성상만으로는 많은 문제점이 지적되어 왔다[17]. 최근에 유전학적 기법을 이용한 장염비브리오의 검출에 Kim 등[11]은 *toxR* 유전자의 검출로 장염비브리오의 동정에 특이적인 PCR법을 개발하였다. *toxR* 유전자는 콜레라 독소 오페론의 조절유전자로 처음으로 발견된 이후 대부분의 비브리오 균종에 분포하는 광범위한 조절유전자로서 잘 보존되어 있으며, 장염비브리오에서도 *toxR* 유전자가 조절유전자로 밝혀졌다[6,13,15]. 장염비브리오와 콜레라균에서는 16S rRNA 유전자의 상동성은 91%이지만 *toxR* 유전자의 경우에는 55%이므로 Kim 등[11]은 *toxR* 유전자를 표적으로 하여 본 균의 정확하고 신속한 검출을 위한 PCR법은 최근에 새로이 개발된 방법이다. 본 연구에서는 실험균주를 생화학

적 성상 및 혈청형 시험 이후에 본 균의 최종 확정 동정법으로 *toxR* 유전자 검출을 이용하였으며, 그 결과 실험균주 27 균주 전부가 *toxR* 유전자를 보유하고 있었다.

처음으로 장염비브리오에서 섬유상 파지 V6의 수평적인 유전자 전달에 대하여 보고된 이후 Chang 등[1]은 Vf12와 Vf33 파지의 유전자 구조 및 비브리오균종에서 분포 및 Kanagawa 현상과의 관련성에 대해 보고하였으며 Nasu 등[19]은 범세계적 유행균주인 장염비브리오 혈청형 O3:K6에서 섬유상 파지 f237을 분리하여 파지 f237이 O3:K6 균주의 감염증과 관련성이 있다고 보고하였다. 파지 f237은 이미 알고 있는 DNA 염기배열과 상동성을 나타내지 않은 독특한 open reading frame인 ORF 8을 갖는 10 open reading frames을 보유하며 O3:K6은 콜레라균의 콜레라 장독소가 갖는 *ctxAB* 대신에 ORF 8를 보유하는 것이 증명됨에 따라 새롭게 출현한 혈청형 O4:K68 및 O1:KUT 균주가 감염률이 높은 원인으로, ORF 8이 병원성의 역할을 하는 것임을 시사하였다[19,25]. 즉, ORF 8의 존재를 알아보기 위하여 PCR법을 실시한 결과, 최근에 분리된 O3:K6 뿐만 아니라 O4:K68, O1:KUT 분리균주에서도 발견되었으며 혈청형 O4:K68, O1:KUT 균주는 새롭게 나타난 O3:K6으로부터 진화되었음이 분자역학적 연구로 규명되었다[2,4]. 본 연구에서 ORF 8의 보유 유무를 확인한 결과, 병원성 장염비브리오 O3:K6 17 균주 전부에서 증폭되었으며 2000년도 분리된 한국 유래 혈청형 O6:K46 4균주와 2002년도 분리된 일본 유래 혈청형 O4:K68 1균주에서도 양성을 나타내는 반면, non O3:K6 (혈청형 O4:K9, O3:K57, O5:K15, O4:K12, O1:K38) 5균주에서는 검출되지 않았다.

본 연구에서 장염비브리오의 병원성 인자를 확인하기 위해 PCR법과 DNA probe법의 두 가지 방법으로 *tdh*, *trh1*과 *trh2* 유전자 검출을 실시한 결과, 공식균주 27균주 중에서 26균주 (96.3%)가 *tdh* 유전자 양성이었으며 1균주 (3.7%)만이 *trh2* 유전자 양성이었고 *trh2* 유전자 양성 균주의 생화학적 성상에서 urease를 생산하는 비전형적인 성상을 나타내었다. 장염비브리오의 urease 생성성에 대하여 1980년 Lam 등[14]의 보고 이후, urease 생성 장염비브리오에 의한 식중독 사례가 보고되어 병원성과의 연관성에 대하여 주목하게 되었고, 이러한 장염비브리오의 비전형적 성상에 대하여 Park 등[27]은 임상 분리균주 TH3996의 염색체로부터 urease 유전자군과 *trh* 유전자를 갖는 15,754 bp DNA 영역을 클론화 함으로써 *ure* 유전자는 *ureD*, A, B, C, E, F, G와 *ureR*으로 구성되어 있고 *trh* 유전자와 근접하고 있으므로 *trh*와 urease 생성성과의 관련성을 규명하였다. Suthienkul 등[30]의 보고에서는 임상분리주 중에서 약 8% 정도가 urease 양성이면서 *trh* 유전자를 보유하고 있다고 보고하였다. 그리고 urease 생성성과 혈청형과의 연관성은 Kim[10]의 보고에서 2001년도 환자유래 균주 중 urease 양성균주의 혈청형은 O4:K8, O4:KUT,

## 요 약

O6:K18로 이들 균주는 모두 *trh* 양성균주임을 보고하였다. Suzuki 등[31]은 O1:K69, O3:K72, O6:K18 및 O6:K46이 100%, O1:KUT가 91.7%의 높은 비율로 urease를 생성하였다고 보고하였으며, 특히 urease 생성성과 K항원의 연관성에 대하여 K1, K18, K46이 urease 생성과 관련이 있다고 보고하였다. 이상 여러 연구자의 보고에 의하면 *trh* 유전자와 urease 생성성과의 상관성은 유전학적으로 확인되었으며[9] *trh* 유전자검출은 urease 생성성을 지표로 *trh* 유전자를 확인하는 것이 임상 검사실에서는 좀더 효율적인 방법으로 사료된다.

RPLA법을 사용하여 TDH 생성의 역가를 비교 검토한 결과는 혈청형 O3:K6 16균주가 256배에서 2,048배 정도로 TDH 생성성의 역가가 높게 나타났다. TDH의 생성성은 배양조건, *tdh*의 promotor 차이 및 발현조절인자 *toxR*의 영향에 의한 것으로 알려져 있으며 본 실험에서는 균주에 따라 TDH생성 역가가 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. *tdh*양성균주에 대한 *Hind*III의 RFLP 실험의 결과는 16 균주가 모두 11.5 kb와 4.3 kb *Hind*III DNA 단편에 *tdh* 유전자를 보유하는 1형뿐이었다. Suthienkul 등[29]은 1996년 이전에 분리한 장염비브리오에 대한 *Hind*III으로 RFLP 시험의 결과에서 두 가지 형으로 보고하였다. 즉, I형은 1.3 kb와 2.5 kb, 또 다른 형은 2.8 kb와 12.7 kb에 *tdh* 유전자가 존재함을 보고하였으나, 본 실험에선 4.5 kb와 11.5 kb에서 *tdh* 유전자가 존재하는 하나의 형으로 완전히 다른 RFLP 양상을 나타내었고 이러한 차이는 Suthienkul 등의 실험 균주가 1996년 이전에 분리된 이른 바 ORF 8 음성 균주이기 때문일 것으로 사료되었다.

최근 유전자 조작기술이 진보함으로써 유전자 해석법이 개발되어 각종 감염증의 역학조사에 응용하고 감염원의 추적이나 유래가 다른 분리균주를 비교 검토함으로써 DNA의 다형성을 검출하는 방법으로 AP-PCR법을 이용한 RAPD법 또는 PFGE법을 이용한 DNA fingerprinting 방법들이 보고되고 있다[9,11,33]. RAPD법과 PFGE법에 의한 유전자형별 실험의 결과를 살펴보면 O3:K6 균주들의 변이는 전체적으로 아주 미약하였으나, 특히 RAPD법의 결과에서는 상당한 다형성 (polymorphism)이 O3:K6와 non O3:K6균주 사이에서 관찰되었다. 따라서 RAPD법으로 O3:K6와 non O3:K6의 감별이 보다 용이한 것으로 보이며 혈청형 O3:K6 균주들은 RAPD법과 PFGE법으로 유전자형별을 비교 검토한 결과 거의 동일한 결과를 나타내었다. 장염비브리오의 역학적 해석에서는 적절하게 몇 개의 primer를 사용한 AP-PCR법이 역학적 분류를 PFGE법과 같이 세분화 할 수 있고 비싼 장비도 필요 없이 재현성이 높아 신속하고 간편하게 실시할 수 있으므로 대단히 유효한 방법이라고 사료되었다. 이처럼 장염비브리오의 역학적 연구에 다양한 분자유전학적인 방법들을 이용되고 있지만 방법에 따라 다양한 분석 능력을 갖고 있으므로 아직은 상호 보완적이어서 계속 새로운 방법들이 시도되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구는 1999년에서 2001년도 걸쳐서 3년간 국내에서 분리된 환자유래 장염비브리오 18균주와 일본 후쿠오카 지역에서 2002년도에 환자에서 분리한 장염비브리오 9균주 등 총 27균주에 대하여 *toxR* 유전자의 검출, 혈청형별 검사, 약제내성의 양상, *tdh*, *trh1* 및 *trh2* 유전자의 보유상태 및 urease 생성성을 살펴보고, 혈청형 O3:K6 균주에 대하여 TDH의 생성성 검사, *tdh* 양성균주의 RFLP 형별, ORF 8의 분포, PFGE법과 RAPD법을 실시하였으며 결과는 다음과 같다.

1. 한국 및 일본의 환자유래 균주 대부분에서 urease 음성이었으며, *toxR* 유전자로 확인 동정하였고 혈청형의 분포는 국내 분리주의 O3:K6, O4:K9, O6:K46, O3:K57, O5:K15와 일본 분리주의 O3:K6, O1:K38, O4:K68, O4:K12의 혈청형으로 나타났다.

2. 항생제 감수성 시험에서는 vancomycin과 oxacillin은 27균주 (100%), penicillin은 26균주 (96.3%)로 높은 내성을 나타내었고, 14균주 (51.9%)가 4가지 이상의 항생제에 다제내성을 나타내었다. 항생제의 내성양상은 6종류로 혈청형에 관계없이 vancomycin, oxacillin, penicillin에 내성을 나타내는 V형이 15균주 (55.6%)로 가장 많이 나타났다.

3. *tdh* 유전자는 26균주가 PCR법과 DNA probe hybridization법의 결과에서 양성으로 나타났으며, urease양성이었던 일본 환자유래 혈청형 O3:K6 1균주만이 *tdh* 유전자 음성, *trh2* 유전자 양성을 나타냈다. 혈청형 O3:K6의 TDH 생성성 역가는 전 균주가 256배에서 2,048배 정도로 나타났으며, RFLP 양상은 모든 균주가 11.5 kb와 4.3 kb에 *tdh* 유전자를 보유하고 있었다. 또한 혈청형 O3:K6 균주들은 RAPD법과 PFGE법으로 유전자형별을 비교 검토한 결과 8형으로 거의 동일한 유전자형별의 결과를 나타내었다.

4. ORF 8의 분포는 혈청형 O3:K6 전 균주에서 양성이고, 특히 혈청형 O6:K46 4균주 모두에서 ORF 8 양성을 나타내어 새롭게 나타난 유행균주일 가능성을 시사 하였다. 따라서 ORF 8 유전자의 검출은 범세계적으로 유행하는 균주들을 동정하는데 있어 genetic marker로서 매우 유용한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

## 참고 문헌

1. Chang, B., H. Miyamoto, H. Taniguchi and S. I. Yoshida. 2002. Isolation and genetic characterization of a novel fila-



- mentous bacteriophage, a deleted form of phage f237, from a Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O4:K68 strain. *Microbiol. Immunol.* **46**, 565-569.
2. Chiou, C. S., S. Y. Hsu, S. I. Chiu, T. K. Wang and C. S. Chao. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4621-4625.
  3. Chowdhury, N. R., S. Chakraborty, T. Rammamurthy, M. Nishibuchi, S. Yamasaki, Y. Takeda and G. B. Nair. 2000. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 631-636.
  4. Daniels, N. A., A. B. Ray, A. Easton, N. Marano, E. Kahn, A. L. McShan, L. D. Rosario, T. Baldwin, MA Kingsley, ND Puhr, JG Wells and FJ Angulo. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. *JAMA* **284**, 1541-1545.
  5. DiRita V. J. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by *toxR* in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 451-458.
  6. Ewing W. H. 1986. Edward and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. pp93-134. 4th eds., Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, N.Y.
  7. Honda T., Y. Ni, T. Miwatani, T. Adachi and J. Kim. 1993. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1175-1180.
  8. Iida T., A. Hattori, K. Tagomori, H. Nasu, R. Naim and T. Honda. 2001. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 477-478.
  9. Iida T., O. Suthienkul and K. S. Park. 1997. Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Med. Microbiol.* **46**, 639-645.
  10. Kim YB. 2001. Virulence factors and genotyping of *Vibrio parahaemolyticus* in sea water and clinical isolates. *J. Bacteriol. Virol.* **31**, 229-238.
  11. Kim Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1173-1177.
  12. Kishishita M., N. Matsuoka, K. Kumagai, S. Yamasaki, Y. Takeda and M. Nishibuchi. 1992. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2449-2457.
  13. Kita-Tsukamoto K., H. Oyaizu, K. Nanba and U. Shimidu. 1993. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Int. Syst. Bacteriol.* **43**, 8-19.
  14. Lam S. and M. Yeo. 1980. Urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain. *J. Clin. Microbiol.* **12**, 57-59.
  15. Lin Z., K. Kumagai, K. Baba, J. J. Mekalanos and M. Nishibuchi. 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J. Bacteriol.* **175**, 3844-3855.
  16. Matsumoto C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, O. Garg, T. Rammamurthy, H. C. Wong, A. DePaola, Y. B. Kim, M. J. Albert and M. Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 578-585.
  17. Miyamoto T., H. Miwa and S. Hatano. 1990. Improved fluorogenic assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1480-1484.
  18. Myers M. L., G. Panicker and A. K. Bej. 2003. PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2194-2200.
  19. Nasu H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamaichi, K. S. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa and T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2156-2161.
  20. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement. M100-S16., CLSI, Wayne, Pa.
  21. Nishibuchi M. and J. B. Kaper. 1990. Duplication and variation of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* **4**, 87-99.
  22. Nishibuchi M. and J. B. Kaper. 1985. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **162**, 558-564.
  23. Nishibuchi M., V. Khaeomaneem, T. Honda, J. B. Kaper and T. Miwatani. 1990. Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-O1, *V. mimicus* and *V. hollisae* that are similar to the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **67**, 251-256.
  24. Nishibuchi M., T. Taniguchi, T. Misawa, V. Khaeomaneem, T. Honda and T. Miwatani. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **57**, 2691-2697.
  25. Okuda J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3150-3155.
  26. Okuda J., M. Ishibashi, S. L. Abbott, J. M. Janda and M. Nishibuchi. 1997. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in the urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1965-1971.

27. Park K. W., T. Iida, Y. Yamaichi, T. Oyagi, K. Yamamoto and T. Honda. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **68**, 5742-5748.
28. Shirai H., H. Ito and T. Hirayama. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of the thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of the *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **58**, 3568-3573.
29. Suthienkul O., T. Iida, K. S. Park, M. Ishibashi, S. Supave, K. Yamamoto and T. Honda. 1996. Restriction fragment length polymorphism of the *tdh* and *trh* genes in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1293-1295.
30. Suthienkul O., M. Ishibashi, T. Iida, N. Nettip, S. Supavej, B. Eampokalap, M. Maikino and T. Honda. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated Thailand. *J. Infect. Dis.* **172**, 1405-1408.
31. Suzuki N., Y. Ueda, H. Mori, K. Miyagi, K. Noda, H. Hirose and Y. Oosumi. 1994. Serotypes of urease producing *Vibrio parahaemolyticus* and their relation to possession of *tdh* and *trh* genes. *Kansenshogaku Zasshi* **68**, 1068-1074.
32. Tada J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi and Y. Takeda. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* **6**, 477-487.
33. Wong H. C., S. H. Liu, T. K. Wang, C. L. Lee, C. S. Chio, D. P. Liu, M. Nishibuchi and B. K. Lee. 2000. Characteristic of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3981-3986.
34. Yeung P. S. M., M. C. Hayes, A. DePaola, C. A. Kaysner, L. Kornstein and K. J. Boor. 2002. Comparative phenotypic, molecular and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2901-2909.