

# β-Lactamase (VPA0477) 유전자를 표적으로 Polymerase chain reaction에 의한 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)의 검출

박권삼\*

군산대학교 식품생명공학과

## Application of the β-lactamase (VPA0477) Gene for the Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by Polymerase Chain Reaction

Kwon-Sam Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

In this study, the β-lactamase (VPA0477) gene was used as a new target for the PCR-based detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Primers specific for the β-lactamase (VPA0477) gene of *V. parahaemolyticus*, were designed and incorporated into a PCR-based assay. The assay was able to specifically detect all of the 191 *V. parahaemolyticus* strains tested, but did not result in amplification of 39 other *Vibrio* spp. and non-*Vibrio* spp. strains tested. The detection limit of the assay was 10 CFU of *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 from pure culture broth. The β-lactamase (VPA0477) gene-based assay developed in this study was sensitive and specific, and has great potential for the accurate detection and identification of *V. parahaemolyticus* in seawater or seafood samples.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, β-lactamase, Polymerase chain reaction, Detection

### 서 론

장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)는 저도 호염성 해양 세균으로 이 균에 오염된 어패류를 생식하거나 불충분하게 가열 처리된 수산물 섭취하면 주로 설사, 복통, 구토, 오한 및 미열 등을 동반하는 급성위장염 증상을 유발하는 식중독 원인세균이다(Sakazaki et al., 1968; Honda and Iida, 1993; Makino et al., 2003). 해수 및 어패류 등의 자연계에서 분리한 대부분의 장염비브리오는 비병원성 균주인 반면 수산물 기인 식중독 사고의 환자 가검물에서 분리한 대부분의 장염비브리오는 내열성 용혈독(thermostable direct hemolysin, TDH) 또는 내열성 용혈독관련 용혈독(TDH-related hemolysin, TRH)의 유전자를 보유하고 있다. 그렇기 때문에 이들 독소는 장염비브리오의 주요한 병원성 인자로 인식되고 있다(Sakazaki et al., 1968; Shirai et al., 1990; Honda and Iida 1993; Makino et al., 2003).

병원성 미생물을 검출하기 위한 고전적인 방법 즉, 최확수법, 선택배지의 사용, DNA-DNA colony hybridization 등 미생물

학적 또는 생화학적 방법에 기초하는 검출방법들은 분석하는데 시간이 오래 걸리며 많은 노동력과 다수의 시료를 분석해야 하는 단점들을 내포하고 있다(Peeler et al., 1992; Kaysner and DePaola, 2001). 이런 단점들을 보완한 방법에는 conventional PCR, real-time PCR과 LAMP assay 등이 있으며 이들 방법들 또한 일부 보완이 필요한 점도 있지만 현재 일반적으로 사용하고 있는 검출방법이다. 다양한 시료로부터 장염비브리오를 신속 정확하게 검출하기 위한 PCR assay, real-time PCR assay 및 LAMP assay에 관한 보고는 다수 존재한다(Kim et al., 1999; Kim et al., 2008; Chen and Ge, 2010; Yu et al., 2010; Hossain et al., 2011; No et al., 2011; Liu et al., 2012; Wang et al., 2013).

염기서열이 결정된 장염비브리오 RIMD2210633 균주에서 β-lactamase (VPA0477)는 작은 염색체에 존재하는 유전자로 283개의 아미노산으로 이루어져 있으며 분자량은 약 31.7 kDa으로 추정하고 있다(Makino et al., 2003). 장염비브리오 β-lactamase (VPA0477) 유전자는 비브리오속의 다른 종에서 보고된 class A group β-lactamase의 중요한 구조적 특

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0740>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(6) 740-744, December 2014

Received 7 October 2014; Revised 4 November 2014; Accepted 7 November 2014

\*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469.1822 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: parkks@kunsan.ac.kr

징의 아미노산 서열이 동일한 위치에 존재할 뿐만 아니라 높은 상동성 및 분자량도 매우 유사하다는 점에서 class A group β-lactamase에 속한다고 보고되어 있다(Lee et al., 2011). 최근, β-lactamase (VPA0477) 유전자의 존재유무를 PCR assay로 확인한 결과 전북 곰소만의 표층해수 유래 108개 균주 및 완도해역 표층 해수분리 67 균주 즉 실험에 제공된 모든 장염비브리오에는 β-lactamase (VPA0477) 유전자가 존재하는 것으로 보고하고 있으며(Lee et al., 2011; Kim et al., 2014), Pazhani et al. (2014)은 인도의 급성위장염 환자로부터 분리한 178 균주 장염비브리오 모든 균주에서도 β-lactamase (VPA0477) 유전자가 존재한다고 보고하고 있다.

이러한 결과들을 종합해 보면 β-lactamase (VPA0477) 유전자는 β-lactam 계열의 항생제인 암피실린을 분해하는 유전자임에도 불구하고 장염비브리오의 염색체 DNA에 삽입되어 현재는 하나의 보편적인 유전자로 존재하고 있다는 점에서 이 균의 검출 및 동정을 위한 새로운 표적유전자로서 가능성이 시사된다. 따라서 본 논문에서는 장염비브리오의 검출 및 동정을 위한 새로운 표적유전자로서 β-lactamase (VPA0477)의 가능성 및 유효성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

실험에 사용한 균주는 Table 1에 나타내었다. 비브리오속의 표준 균주 및 임상분리 장염비브리오는 일본 오사카대학교 미생물병연구소에서 분양 받았으며, 기타 표준 균주 및 환경분리 장염비브리오는 실험실에서 보관하고 있는 균주를 사용하였다. 균 배양을 위한 배지에는 Luria-Bertani broth (Becton Dickinson, Sparks, USA), brain heart infusion (Becton Dickinson, Sparks, USA), heart infusion (Becton Dickinson, Sparks, USA) 및 marine broth (Difco, Detroit, USA) 등을 사용하여 실온 또는 35°C에서 배양하였다.

### Oligonucleotide primers 및 PCR assay 조건

VPA0477 유전자 증폭을 위한 primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며, 염기서열은 다음과 같다 [VPA0477-F(5'-CCTCATCGAGAAACAAACAT-3', 20mer, Tm = 56) 및 VPA0477-R (5'-AGTGCTCTAAAATCAGT TGG-3', 20mer, Tm = 56)]. 유전자 증폭에는 EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara, Japan) 및 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. PCR assay 조건은 95°C에서 1회 3분간 열 변성 후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분을 한 단위로 하여 이를 30회 반복하여 DNA를 증폭하였으며, 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4, France)사의 Gel-Doc system으로 관찰하였다.

Table 1. Bacteria strains used in this study

Strain	Source
<i>Vibrio</i> spp.	
<i>V. aerogenes</i>	ATCC700797
<i>V. aestuarianus</i>	ATCC35048
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC17749
<i>V. anguillarum</i>	RIMD2202001
<i>V. campbellii</i>	ATCC25920
<i>V. carchariae</i>	ATCC35084
<i>V. cholerae</i>	KCCM41626
<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC33466
<i>V. fischeri</i>	NCIMB1281
<i>V. fluvialis</i>	ATCC33809
<i>V. furnissii</i>	ATCC35016
<i>V. gazogenes</i>	ATCC29988
<i>V. haliotocoli</i>	IAM14598
<i>V. harveyi</i>	ATCC14126
<i>V. hollisae</i>	JCM1284
<i>V. mimicus</i>	ATCC33653
<i>V. natriegens</i>	ATCC14048
<i>V. nigrapulchritudo</i>	ATCC27043
<i>V. ordalii</i>	CIP103205
<i>V. orientalis</i>	ATCC33934
<i>V. parahaemolyticus</i>	RIMD2210633
<i>V. parahaemolyticus</i> (191)	Isolates*
<i>V. pectenicida</i>	CIP105190
<i>V. pelagius</i>	NBRC15639
<i>V. proteolyticus</i>	ATCC15338
<i>V. rumoiensis</i>	ATCC35023
<i>V. splendidus</i>	ATCC33125
<i>V. tubiashii</i>	ATCC19109
<i>V. vulnificus</i>	KCCM 41665
Other bacteria	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	KCTC2358
<i>Bacillus cereus</i>	KCCM40138
<i>Citrobacter freundii</i>	KCCM11931
<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCCM12177
<i>Escherichia coli</i>	KCCM11234
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCCM 40307
<i>Photobacterium damsela</i>	ATCC33539
<i>Salmonella choleraesuis</i>	KCCM11806
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC14028
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC1927
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM41657

Sources for the strains are as follows: American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md.; Collection de Bacteries de l'Institut Pasteur (CIP), Paris, France; IAM Culture Collection (IAM), Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN, Saitama, Japan; Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), Seoul, Korea; Korean Collection for Type Cultures (KCTC), Daejeon, Korea; NITE Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan; National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Ltd. (NCIMB), Aberdeen, United Kingdom; Research Institute for Microbial Diseases (RIMD), Osaka University, Osaka, Japan. \* *V. parahaemolyticus* isolates from 16 clinical and 175 environmental samples.

균수 조정

VPA0477 유전자를 표적으로 하는 PCR assay에 의한 장염비브리오의 최소 검출농도를 측정하기 위하여 3% NaCl이 첨가된 Luria-Bertani (tryptone 1%, yeast-extract 0.5%, NaCl 3%) broth 에서 하룻밤 배양한 장염비브리오 RIMD2210633 균주를 원심 분리(12,000 rpm, 2 min)하여 집균 후 여기에 1.0 mL의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)를 가하여 현탁 후 원심 분리하여 집균 후 PBS로 재차 현탁 하였다. 균수 측정은 현탁액 10 µL를 counting chamber (Paul Marienfeld GmbH&Co, Germany)에 넣고 광학현미경(Olympus CX31RBSF, Olympus Optical Co., LTD. Tokyo, Japan)하에서 균수를 직접 계측하여 계산하였으며 적절한 농도까지 10진법으로 희석한 균액을 PCR assay에 주형으로 사용하였다.

결과 및 고찰

장염비브리오 β-lactamase (VPA0477) 유전자의 특성

장염비브리오의 작은 염색체에 존재하는 VPA0477유전자는 283개의 아미노산으로 구성되어 있는 단백질로 분자량은 약 31.7 kDa으로 추정된다(Makino et al., 2003). VPA0477유전자 해석을 위하여 암피실린에 내성(minimum inhibitory concentration, MIC, 2,048 µg/mL)을 갖는 환경유래 장염비브리오에 VPA0477유전자 결손균주를 작성하여 검토한 결과 결손균주는 암피실린에 대해 감수성 균주(MIC, ±1.0 µg/mL)로 표현형이 변화하였는데 이 결과는 VPA0477유전자는 장염비브리오의 암피실린 내성에 관여하는 유전자임을 증명하는 결과로 판단된다(Lee and Park, 2010). 장염비브리오 VPA0477유전자

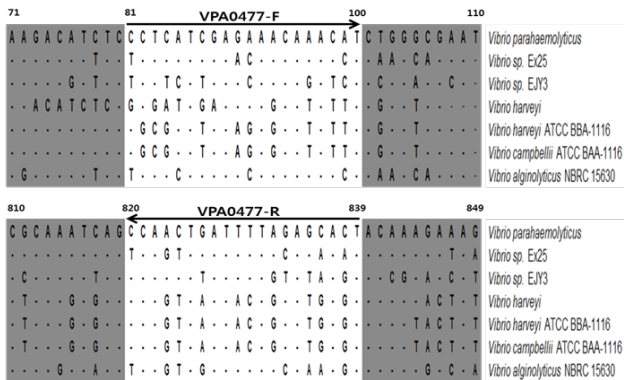


Fig. 1. Nucleotide sequence alignment of the VPA0477 gene of *V. parahaemolyticus*, *Vibrio* sp. EX25, *Vibrio* sp. EJY3, *V. harveyi*, *V. harveyi* ATCC BBA-1116, *V. campbellii* ATCC BAA-1116, and *V. alginolyticus* NBRC15630. Nucleotides identical to those of *V. parahaemolyticus* are indicated with dots. Primer sets (VPA0477-F and VPA0477-R) are indicated by the arrows.

와 비브리오속 다른 종의 β-lactamase 유전자와의 상동성을 비교해 보면 *Vibrio* sp. EX25, *V. alginolyticus* NBRC15630, *V. campbellii* ATCC BAA-1116, *V. harveyi* ATCC BBA-1116, 및 *Vibrio* sp. EJY3 등의 균주와 78, 78, 75, 75, 및 73%로 상동성은 높은 편이었으며 이들 유전자의 존재위치는 장염비브리오와 마찬가지로 작은 염색체에 존재하였다(자료미제시). 장염비브리오의 검출 및 동정을 위한 표적 유전자로서 VPA0477 유전자의 가능성을 검토하기 위한 프라이머 디자인은 ClustalW2, v2.1 (<http://www.clustal.org>)으로 각 유전자의 상동성을 검토한 결과 상동성이 낮은 81 bp에서 100 bp 및 820 bp에서 839 bp의 염기를 프라이머로 디자인하였다(Fig. 1).

장염비브리오 β-lactamase (VPA0477) 유전자의 분포

분리시기 및 유래가 다른 175주의 환경유래 장염비브리오 및 16주의 임상분리 장염비브리오 합계 191 균주의 균체를 사용하여 β-lactamase (VPA0477) 유전자의 존재유무를 PCR assay로 검토한 결과 실험에 제공된 191 주 모든 균주에서 760 bp의 DNA 증폭산물이 확인되었다. Fig. 2에 나타난 결과는 일부 균주의 결과만을 나타낸 것으로 증폭예상 크기인 760 bp DNA 증폭산물 이외의 다른 비특이적인 증폭산물은 확인되지 않았다. 따라서 β-lactamase (VPA0477) 검출용 프라이머 및 PCR assay 조건은 양호한 것으로 판단된다.

비브리오속 및 비비브리오속 종의 β-lactamase (VPA0477) 유전자의 분포

장염비브리오를 포함한 28종의 비브리오속 및 12종의 비비

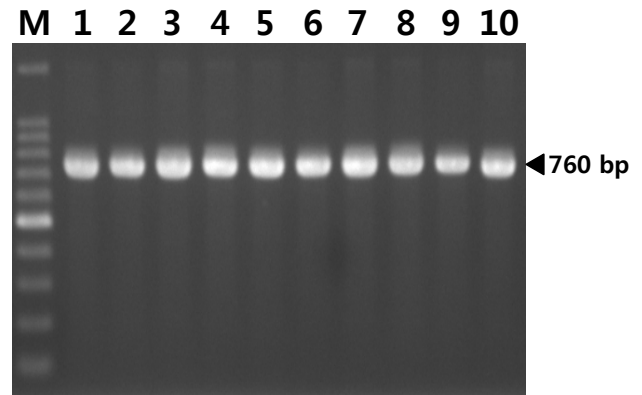


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of *V. parahaemolyticus*-specific DNA products amplified in PCR using primer set VPA0477-F and VPA0477-R.

M, 100 bp DNA ladder; lane 1, RIMD2210633; lane 2, RIMD2210050; lane 3, RIMD2212010; lane 4, RIMD2210875; lane 5, RIMD2210877; lane 6, environmental strain 15; lane 7, environmental strain 33; lane 8, environmental strain 40; lane 9, environmental strain 77; lane 10, environmental strain 113.



브리오속 세균을 대상으로 β-lactamase (VPA0477) 유전자의 존재유무를 확인하였다. 그 결과 장염비브리오를 제외한 27종의 비브리오속 및 12 종의 비비브리오속 세균 모두에서 β-lactamase (VPA0477) 유전자는 증폭되지 않았다(Fig. 3). 다만 일부 세균에서는 β-lactamase (VPA0477) 유전자와는 크기가 다른 DNA 증폭산물이 매우 희미하게 관찰되는 균주도 있는데 이는 β-lactamase (VPA0477) 유전자와는 관계 없는 비특이적인 증폭산물이며 PCR assay 결과를 오판할 정도는 아니라고 판단된다.

### 장염비브리오의 검출 한계의 검토

PCR assay에 의한 장염비브리오의 검출한계에 관한 보고는 다수 존재한다. 염색체 DNA를 주형으로 *groEL* 유전자를 표적으로 한 경우, PCR assay에 의한 검출한계 농도는 100 pg 이라고 보고하고 있으며(Hossain et al., 2011), H-NS 유전자를 표적으로 하는 PCR assay에 의한 검출한계 농도는 0.14 pg 이라



Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of *Vibrio* spp. and non-*Vibrio* spp. DNA products amplified in PCR using primer set VPA0477-F and VPA0477-R. M, 100 bp DNA ladder; lane 1, *V. aerogenes*; lane 2, *V. aestuarianus*; lane 3, *V. alginolyticus*; lane 4, *V. anguillarum*; lane 5, *V. campbellii*; lane 6, *V. carchariae*; lane 7, *V. cholerae*; lane 8, *V. diazotrophicus*; lane 9, *V. fischeri*; lane 10, *V. fluvialis*; lane 11, *V. furnissii*; lane 12, *V. gazogenes*; lane 13, *V. haliotocoli*; lane 14, *V. harveyi*; lane 15, *V. hollisae*; lane 16, *V. mimicus*; lane 17, *V. natrigens*; lane 18, *V. nigrapulchritudo*; lane 19, *V. ordalii*; lane 20, *V. orientalis*; lane 21, *V. parahaemolyticus*; lane 22, *V. pectenicida*; lane 23, *V. pelagius*; lane 24, *V. proteolyticus*; lane 25, *V. rumoiensis*; lane 26, *V. splendidus*; lane 27, *V. tubiashii*; lane 28, *V. vulnificus*; lane 29, *Aeromonas hydrophila*; lane 30, *Bacillus cereus*; lane 31, *Citrobacter freundii*; lane 32, *Enterobacter aerogenes*; lane 33, *Escherichia coli*; lane 34, *Listeria monocytogenes*; lane 35, *Photobacterium damsela*; lane 36, *Salmonella choleraesuis*; lane 37, *Salmonella typhimurium*; lane 38, *Shigella sonnei*; lane 39, *Staphylococcus aureus*; lane 40, *Yersinia enterocolitica*.

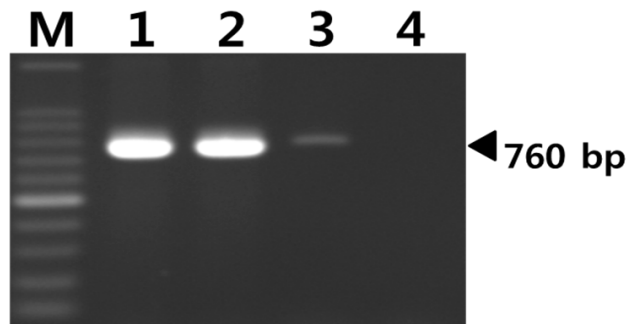


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified from *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 in PCR assay using VPA0477 primers. M, 100 bp ladder marker; lane 1,  $1.0 \times 10^3$  CFU; lane 2,  $1.0 \times 10^2$  CFU; lane 3,  $1.0 \times 10^1$  CFU; lane 4,  $1.0 \times 10^0$  CFU.

고 보고하고 있으며(No et al., 2011), O-serogroup을 표적으로 한 PCR assay에 의한 검출 최소농도는 1.0 ng 이라고 보고하고 있다(Chen et al., 2012). 또한 균체를 주형으로 한 PCR assay의 검출 최소 농도는 10 colony forming unit (CFU) 였다고 보고되어 있다(Wei et al., 2014). *V. anguillarum*의 경우, *ipoS*의 유전자를 표적으로 하는 PCR assay에서 정제된 염색체 DNA 및 균체의 검출한계는 3 pg 및 6 CFU 이었다고 보고되어 있다(Kim et al., 2008).

β-lactamase (VPA0477) 유전자를 표적으로 하는 PCR assay에 의한 장염비브리오 균체의 검출 최소농도를 검토하기 위하여 균체 농도를 반응액에  $1.0 \times 10^3$  CFU에서  $1.0 \times 10^0$  CFU의 농도가 되도록 조정하였다. VPA0477 유전자의 증폭은  $1.0 \times 10^1$  CFU 농도에서는 확인되지 않았지만  $1.0 \times 10^1$  CFU 이상의 농도에서는 예상 증폭 단편인 760 bp의 DNA 증폭산물이 확인되었다. 그러나  $1.0 \times 10^1$  CFU 농도의 반응구에서는 다른 농도에 비해 증폭 DNA 밴드는 미약하게 나타났다(Fig. 4). 결론적으로 PCR assay를 위한 반응액 중의 장염비브리오 농도가 10 CFU 이상이면 검출은 가능하다고 판단되는 결과이며 이는 기존의 결과와 유사한 결과이다(Wei et al., 2014).

결론적으로 β-lactamase (VPA0477) 유전자를 표적으로 PCR assay에 의한 임상 및 환경분리 191주 장염비브리오의 검출에는 유효성이 검증되었으며, 장염비브리오를 제외한 27종의 비브리오속 및 12종의 비비브리오속의 세균에서는 유전자 증폭이 확인되지 않는 특이성이 확인되었기 때문에 해수 또는 수산물 중의 장염비브리오의 신속 검출 및 동정에 β-lactamase (VPA0477) 유전자는 유용하게 이용되리라 사료된다.

### References

Chen M, Guo D, Wong HC, Zhang X, Liu F, Chen H, Chen M, Liu B, Wang L, Wu F and Feng L. 2012. Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification

- of *Vibrio parahaemolyticus*. Int J Food Microbiol 159, 122-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.012>.
- Chen S and Ge B. 2010. Development of a *toxR*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. BMC Microbiol 10, 41. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-41>.
- Honda T and Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. Rev Med Microbiol 4, 106-113.
- Hossain MT, Kim EY, Kim YR, Kim DG and Kong IS. 2011. Application of *groEL* gene for the species-specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. Lett Appl Microbiol 54, 67-72. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03174.x>.
- Kaysner CA and DePaola Jr A. 2001. *Vibrio*. In: FP Downes and K Ito, eds., Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. American Public Health Association, Washington, DC. U.S.A., 405-420.
- Kim DG, Bae JY, Hong GE, Min MK, Kim JK and Kong IS. 2008. Application of the *rpoS* gene for the detection of *Vibrio anguillarum* in flounder and prawn by polymerase chain reaction. J Fish Dis 31, 639-647. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00943.x>.
- Kim TO, Eum IS, Jo SM, Kim HD and Park KS. 2014. Antimicrobial-resistance profiles and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater in the Wando area. Kor J Fish Aquat Sci 47, 220-226. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0220>.
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S and Nishibuchi M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J Clin Microbiol 37, 1173-1177.
- Lee KW and Park KS. 2010. Antibiotic-resistance profiles and the identification of the ampicillin-resistance gene of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater. Kor J Fish Aquat Sci 43, 637-641.
- Lee NH, Song HJ, Park CS, Kim HD and Park KS. 2011. Genetic characterization of  $\beta$ -lactamase (VPA0477) in *Vibrio parahaemolyticus*. Kor J Fish Aquat Sci 44, 597-604. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2011.0597>.
- Liu B, He X, Chen W, Yu S, Shi C, Zhou X, Chen J, Wang D and Shi X. 2012. Development of a real PCR assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. Protein Cell 3, 204-212. <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-012-2017-6>.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M and Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. Lancet 361, 743-749.
- No AR, Okada K, Kogure K and Park KS. 2011. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR targeted to the histone-like nucleoid structure (H-NS) gene and its genetic characterization. Lett Appl Microbiol 53, 127-133. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03072.x>.
- Pazhani GP, Bhowmik SK, Ghosh S, Guin S, Dutta S, Rajendran K, Saha DR, Nandy RK, Bhattacharya MK, Mukhopadhyay AK and Ramamurthy T. 2014. Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Kolkata, India. PLoS Negl Trop Dis 8, e2815. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002815>.
- Peeler JT, Houghtby GA and Rainosek AP. 1992. The most probable number technique. In: FP Downes and K Ito, eds., Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. American Public Health Association, Washington, DC. U.S.A., 105-120.
- Sakazaki R, Tamura K, Kato T, Obara Y and Yamai S. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. Jpn J Med Sci Biol 21, 325-331.
- Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y and Nishibuchi M. 1990. Molecular epidemiological evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. Infect Immun 58, 3568-3573.
- Wang L, Shi L, Su J, Ye Y and Zhong Q. 2013. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food samples using in situ loop-mediated isothermal amplification method. Gene 515, 421-425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.039>.
- Wei S, Zhao H, Xian Y, Hussain MA and Wu X. 2014. Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. Diagn Microbiol Infect Dis 79, 115-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.012>.
- Yu S, Chen W, Wang D, He X, Zhu X and Shi X. 2010. Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis. FEMS Microbiol Lett 307, 65-71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01952.x>.