

Molecular Epidemiological Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Diarrheal Patients in Jeonnam, Korea

Doo Young Jeon¹, Jeong Chi Lee² and Hyeon Je Song^{2*}

¹Health and Environment Institute of Jeollanamdo, Gwangju, Korea

²Department of Clinical Pathology, Gwangju Health College University, Gwangju, Korea

To investigate the occurrence and distribution of serotype, specific virulence genes, and pulse field gel electrophoresis (PFGE) patterns in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from Jeonnam, Korea, we tested 87 strains which were identified with *V. parahaemolyticus* from diarrheal episode patients in 2005. In this study, 16 different O:K serotype combinations of *V. parahaemolyticus* were determined. The distributions of O and K serotypes were O4:K68 (51.72%), O1:K70 (18.39%), O3:K6 (5.74%), O1:K68 (4.60%) and O3:K57 (4.60%) respectively. Serotype O4:K68 was the regional dominant specific serotype of *V. parahaemolyticus* in Sinan of Jeonnam, Korea. For the detection of thermostable direct hemolysin (*tdh*) and TDH-related hemolysin (*trh*) gene of *V. parahaemolyticus*, PCR was performed. The *tdh* gene was detected in all of the *V. parahaemolyticus* isolates from diarrheal patients, but *trh* gene was not detected. Analysis of PFGE patterns of 30 *V. parahaemolyticus* isolates showed 3 groups and 20 types. Among 14 O4:K68 serotypes which were isolated in Sinan, PFGE patterns of 12 strains were closely related (100%), but 2 strains were related by 58.3% and 45.4%, respectively. Also two strains of O1:K4 serotype in Gurye and two strains of O3:K6 serotype in Yeosu were closely related (100%), respectively. Although serotypes (O1:K4, O1:K70, O3:K6 and O4:K68) were different, PFGE patterns were related for more than 80.9%. Therefore, the epidemiological surveillance of *V. parahaemolyticus* is required by PFGE typing scheme as a further diagnostic tool.

Key Words: *Vibrio parahaemolyticus*, Serotyping, PFGE

서론

장염비브리오균 (*Vibrio parahaemolyticus*)은 그람 음성 균으로 해수, 갯벌, 어류, 해조류와 각종 해산물에 부착하여 서식하는 호염기성 세균으로, 식품재료나 식품에 오염되어 인체에 감염된다. 장염비브리오균은 해산물을 날 것으로 먹는 습관이 있는 우리나라, 일본 등 바다와 인접한 나라에서 여름철 발생빈도가 높은 감염형 식중독 원인균으로 심한 설사, 복통, 구토를 일으킨다 (1).

장염비브리오균의 주요 병원성 인자는 Wagatsuma 혈액한천배지 상에서 Kanagawa 현상을 일으키는 내열성 용혈독 (thermostable direct hemolysin, TDH)이 알려져 있으며 (2~4), 임상 분리주에서는 TDH를 code하는 thermostable direct hemolysin (*tdh*) 유전자를 주로 보유하지만, 자연계에 존재하는 대부분 균은 이러한 유전자가 없다. 그러나 Honda 등 (5), Kishishita 등 (6) 및 Okada와 Mishibuchi (7)은 *tdh* 유전자는 갖지 않으나, TDH와 유사한 내열성 용혈독 유사독소 (TDH-related hemolysin, TRH) *trh* 유전자를 보유한 균주에 대해 보고하였고, 이는 urease 생성과 상관관계가 있으며 (8~10), 최근 PCR (polymerase chain reaction)이나 DNA probe hybridization법을 이용하여 진단이 가능하게 되었다.

또한 일본에서 장염비브리오균의 항원 O항원 11종과 K항원 71종이 개발되어 (11) 일반적으로 혈청형을

Received: July 6, 2009/ Revised: August 28, 2009

Accepted: September 1, 2009

*Corresponding author: Hyeon-Je Song, Department of Clinical Pathology, Gwangju Health College University, 683-3 Sinchang-dong, Gwangsan-gu, Gwangju 506-701, Korea.

Phone: +82-62-958-7622, e-mail: songhal@ghc.ac.kr

Table 1. Synthetic oligonucleotides used in this experiment

Target gene			5'-3' DNA sequence of primer						Amplicon size (bps)
<i>tdh</i>	F	GGT	ACT	AAA	TGG	CTG	ACA	TCC	198
	R	CCA	AAT	ACA	TTT	TAC	TTG	GAA	
<i>trh</i>	F	GGC	TCA	AAA	TGG	TTA	AGC	GCC	250
	R	CAT	TTC	CGC	TCT	CAT	ATG	CTT	

F: forward primer, R: reverse primer

O:K로 표기하며 장염비브리오균 혈청형 분류에 사용하고 있다. 이러한 혈청형 중 O3:K6형이 일본, 대만, 한국, 미국 등지에서 분리되어 세계적으로 유행하고 있는 것으로 보고되었다 (12).

우리나라의 경우 위생수준 향상에도 불구하고 지리적 여건과 어패류를 먹는 습관 등을 고려할 때 장염비브리오균에 의한 식중독의 위험은 항상 존재해 왔다. 특히 전남지역은 많은 섬지역으로 구성되어 있고 해산물도 다량 생산되는 지역이다. 그래서 매년 장염비브리오균에 의한 식중독이 많이 발생되고 있어 발생유형의 역학적 조사가 식품위생학적 측면에서 중요하리라 생각된다.

따라서 본 연구는 전남지역에서 발생한 식중독을 포함한 설사환자에서 분리된 장염비브리오균을 대상으로 혈청형 분포와 병원성과 관계된 *tdh* 및 *trh* 유전자보유 실태를 조사하였다. 또한 장염비브리오균에 의해 유발되는 식중독의 유형을 파악하기 위해 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)로 유전체의 상호 유사성을 분석함으로써 식중독발생에 대한 역학조사 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

균 분리 동정

2005년 전남지역에서 발생한 식중독을 포함한 설사환자의 분변으로부터 전통적인 분리방법을 통해 장염비브리오균을 순수 분리하였고, 분리 균주에 대한 생화학적 시험은 API 20E kit (bioMerieux, MarcyEtoile, France)를 사용하여 동정하였다.

혈청형 조사

장염비브리오균의 혈청형은 균체 항원 (O균) 및 협막 항원 (K형)에 대한 슬라이드 응집시험법으로 하였다. 진

단용 혈청은 *Vibrio parahaemolyticus* Antisera (Denka Seiken Co. Niigata-ken, Japan) 제품을 구입하여 제조사가 권장한 사용방법에 따라 시험하였다. O균은 1% 식염이 들어있는 trypticase soy agar (TSA) 배지에 배양된 집락을 생리 식염수 1 ml에 부유시킨 균액을 100℃에 10분간 가열한 후 생리식염수로 15,000 rpm에서 5분간 원심 세척한 다음, 균액을 각각의 O균 항혈청과 혼합하여 응집법으로 시험하였다. K형은 TSA 배지에 자란 집락을 부유시켜 K형 항혈청과 혼합하여 뚜렷한 응집을 보이면 양성으로 판정하였다.

*tdh*와 *trh* 유전자 검사

PCR 방법을 이용하여 장염비브리오균에서 *tdh* 유전자 및 *trh* 유전자의 보유실태를 조사하였다. *tdh* 유전자 부분은 198 bps, *trh* 유전자 부분은 250 bps의 amplicon을 증폭하도록 고안된 primer를 각각 제작하여 사용하였다 (Table 1).

시험균의 DNA는 TSA에 17시간 배양한 균을 약 10⁸ (595 nm에서 O.D 0.6/ml)되게 증류수에 현탁하여, 95℃에서 10분 가열한 후 추출액을 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 template DNA로 사용하였다.

PCR 반응은 10 × PCR buffer 용액 10 µl, dNTP mixture (2.5 mM each) 8 µl, 2.5 U Taq DNA polymerase 0.5 µl, primer pair 1.0 µl (20 pmol/µl), template DNA 5 µl를 함께 넣어 증류수로 최종용량을 50 µl로 조정하였다. PCR 증폭은 PCR system 2700 (Applied Biosystem Co., Foster, CA, USA)을 사용하여, 반응조건은 95℃에서 5분간 denaturation한 후 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분의 cycle을 35회 실시하였다. PCR을 수행한 후 5 µl의 PCR 증폭산물과 molecular size marker (Bioneer, Daejeon, Korea)를 2% agarose gel에 전기영동하고 etidium bromide 용액으로 염색하여 UV하에서 band를 확인하였다.

TDH 생성 시험

장염비브리오균의 TDH 생성 시험은 RPLA (reversed passive latex agglutination)법으로 KAT-RPLA kit (Denka Seiken Co.)를 사용하여 제조회사의 시험방법에 따라 실시하였다. 분리된 균주를 1% NaCl를 첨가한 brain heart infusion broth에 접종하고 37℃에서 18~24시간 동안 정치 배양한 후, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 2배 계단 희석하여 RPLA법을 실시하였다. 결과는 제조회사의 지침에 따라 판정하였다.

PFGE

순수 분리된 균주를 1% NaCl 첨가한 TSA에 접종하여 18~24시간 배양한 후 TE Buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 탁도 12~15%로 현탁시켰으며, 멸균증류수 200 µl와 동량 희석하여 plug mold를 만들었다. 이 plug mold를 1.5 ml ES buffer (0.5 M EDTA, pH 9.0; 1% sodium-lauroyl-sarcosine)와 proteinase K 40 µl (20 mg/ml)를 2 ml microcentrifuge tube에 넣고 55℃ 진탕탕온수조에서 1시간 동안 enzyme 처리한 후, plug wash TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)에 55℃ 진탕탕온수조에서 20분 동안 4회 세척하였다. 세척이 끝난 plug를 꺼내 slide glass 위에 면도날을 이용 1 mm 두께로 절단 후 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 100 µl의 반응혼합액 (10 × restriction enzyme buffer 10 µl, 100 × BSA 1 µl, Not I 50 U, 멸균증류수로 최종부피를 맞춤)을 첨가하여 37℃ 탕온수조에서 2시간 동안 반응시켰다. 또한 standard marker는 Salmonella BAA-664 균주를 1 mm 두께로 절단 후 같은 방법으로 처리하였다. 1% Seakem Glod Agarose (FMC Bio products, Rockland, ME, USA)용액을 만들어 효소 처리된 plug를 comb의 끝 부위에 맞춰 올려놓은 후 agarose를 부어 gel을 굳혔다. 이렇게 만들어진 gel을 CHEF Mapper PFGE system (BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 0.5 × TBE buffer, 6 V/cm, 14℃, 2~40 sec switch time의 조건으로 18시간 동안 전기영동을 하였다.

PFGE 결과는 Tenover 등 (13)의 방법에 준하여 각 균주의 DNA 위치가 다른 절편의 수에 따라 group을 결정하였고, 가장 많이 관찰되는 PFGE 양상을 기준으로 분류하였다. 유전적 상관성의 dice coefficient는 PFGE 양상을 " $\text{공통된 절편수} \times 2 \times 100 / \text{절편전체수}$ "의 공식을 이용하여 구하였으며, unweighted pair group method of

Table 2. Occurrence and regional distribution of O and K serotype of *V. parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Jeonnam, Korea

Serotype	No. of strains		
	Total (%)	Sinan	Other regions ^a
O1:K4	1 (1.15)	0	1
O1:K9	3 (3.45)	0	3
O1:K42	1 (1.15)	1	0
O1:K46	1 (1.15)	0	1
O1:K56	1 (1.15)	0	1
O1:K60	1 (1.15)	0	1
O1:K61	1 (1.15)	0	1
O1:K68	4 (4.60)	4	0
O1:K70	16 (18.39)	16	0
O2:K15	1 (1.15)	0	1
O2:K19	1 (1.15)	0	1
O3:K6	5 (5.74)	0	5
O3:K8	1 (1.15)	0	1
O3:K57	4 (4.60)	3	1
O4:K29	1 (1.15)	1	0
O4:K68	45 (51.72)	44	1
Total	87	69	18

^a Yeosu, Hampyeong, Gurye, Boseong, Jangheung

average linkage (UPGMA)법에 의하여 Molecular Analyst Fingerprinting Software Ver. 3.2 (BioRad)로 dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 비교 분석하였다.

결 과

혈청형 분포

장염비브리오균으로 최종 동정된 87균주 중 69균주가 전남 신안군에서 분리되었으며 18주는 여수, 함평, 구례, 보성, 장흥지역에서 분리되었다.

혈청형 분포는 Table 2에서 보는 바와 같다. 혈청형은 16종류로 다양하였고 그 중 O4:K68혈청형이 45균주 (51.72%)로 가장 많았으며, O1:K70혈청형 16균주 (18.39%), O3:K6혈청형 5균주 (5.74%) 그리고 O1:K68혈청형 및 O3:K57혈청형이 각각 4균주 (4.60%)로 나타났다.

지역별 혈청형 분류 결과는 신안지역에서 분리된 69균

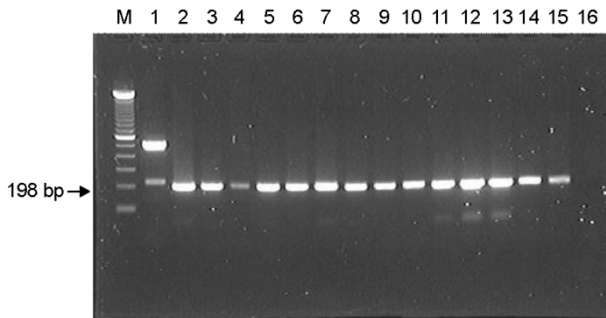


Figure 1. PCR analysis of the *tdh* gene (198 bp) of the *V. paraheamolyticus*. M: molecular weight ladder (100 bp), lane 1: positive control (*V. paraheamolyticus* ATCC33816), lane 2: O1:K9, lane 3: O1:K13, lane 4: O1:K68, lane 5: O1:K70, lane 6: O2:K15, lane 7: O2:K19, lane 8: O3:K6, lane 9: O3:K57, lane 10: O4:K68, lane 11: O4:K68, lane 16: negative control.

주 중 O4:K68혈청형이 44균주, O1:K70혈청형이 16균주로 이들 혈청형이 절대적인 분포를 나타냈으며, 여수, 함평, 구례, 보성, 장흥에서 분리된 18균주 중 O3:K6혈청형이 5균주, O1:K9혈청형이 3균주 순으로 혈청형이 분포하였다. 신안지역에서 분리된 혈청형은 다른 지역에서 분리된 혈청형과 2건 (O3:K57, O4:K68)만 각각 1건씩 중복이 되고 나머지는 신안에서 분리된 혈청형이 다른 지역에서는 분리되지 않았다.

tdh 및 *trh* 유전자 검색

장염비브리오균의 *tdh* 유전자 및 *trh* 유전자의 보유실태를 PCR 방법을 이용하여 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 설사환자에서 분리된 87균주 모두에서 *tdh* 유전자는 검출되었지만 *trh* 유전자는 검출되지 않았다.

THD 생성 시험

RPLA법으로 장염비브리오균의 주요 병원성 인자인 TDH의 생성여부를 알아본 결과 검사한 87균주 모두 내열성 용혈독 양성이었다.

PFGE 시험

87균주 중 혈청형을 선별하여 그 중 30균주에 대해 PFGE법으로 유전자 분석을 실시하였다. 먼저 신안지역에서 가장 많았던 혈청형인 O4:K68형 44균주 중 14균주의 유전자를 분석한 결과 12균주는 100% 같은 유전체형이었으나, 2균주는 각각 58.3%, 45.4%의 낮은 연관도를 나타냈다. O3:K6혈청형은 여수지역 2균주가 100% 일치

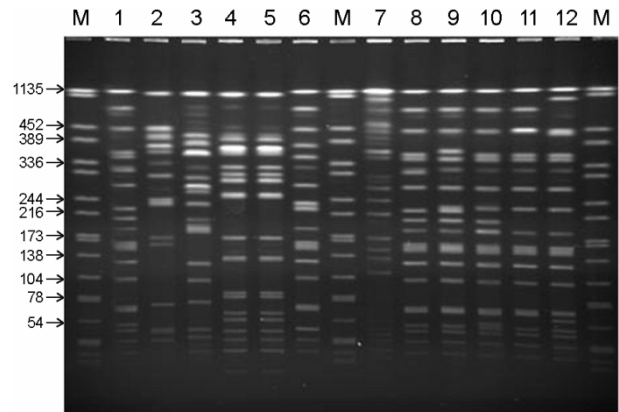


Figure 2. PFGE patterns of enzyme (Not I) digested genomic DNA from *V. paraheamolyticus* isolates. M: Salmonella BAA-664, lane 1: O1:K4, lane 2: O1:K9, lane 3: O1:K13, lane 4: O1:K46, lane 5: O1:K56, lane 6: O1:K60, lane 7: O1:K61, lane 8: O1:K68, lane 9: O1:K70, lane 10: O2:K15, lane 11: O2:K19, lane 12: O3:K6.

했으며, 구례지역에서 분리된 1균주와는 92.9%의 연관도를 보였다. 또한 구례에서 분리된 2건의 O1:K4혈청형은 100% 일치하였다. 여러 가지 혈청형 중에서 O1:K4형, O1:K46형, O1:K60형, O1:K68형, O1:K70형, O3:K6형, O4:K68형은 혈청형이 다름에도 불구하고 80.9% 이상의 연관도를 나타냈다 (Fig. 2, Fig. 3).

고 찰

2005년 전남지역에서 발생한 설사환자 및 집단식중독의 세균성 원인균 가운데 장염비브리오균을 분리하여 혈청형, 병원성 관련 유전자 그리고 PFGE를 통한 역학적 특성을 관찰하였다.

장염비브리오균에 대한 혈청형 분류는 O 항원에 대한 혈청으로 O1에서 O11까지 11균을 사용하였으며, K항원에 대한 항혈청은 71가지의 형 (K1~K71)으로 분류하였다. 장염비브리오균에 의한 식중독의 혈청형 보고 중 Obata 등 (14)은 1990년과 1991년도 일본에서 발생한 장염비브리오균에 의한 식중독의 주된 혈청형은 O4:K68형이라고 하였다. 본 연구에서는 2005년 전라남도 신안지역에서 발생한 식중독 검체에서 분리된 장염비브리오균 69균주에 대한 혈청형을 검사한 결과 O4:K68형이 44균주로 가장 많았고, 그 다음으로 O1:K70형 16균주 그리고 O1:K68형 4균주 순이었다. 이는 일본지역에서 발생한 식중독의 역학 조사 결과 (14) 주된 혈청형인 O4:K68형이

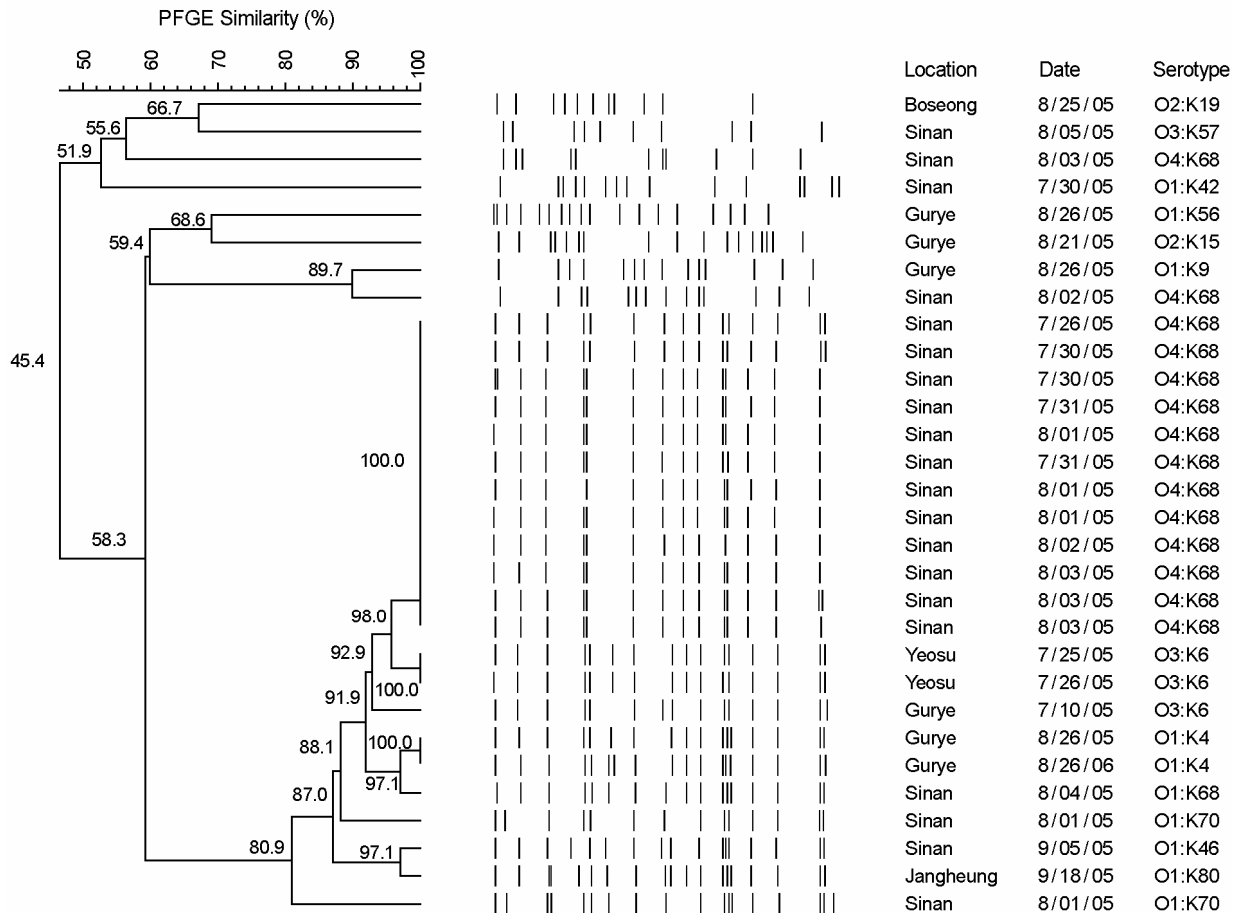


Figure 3. Dendrogram of 30 strains of *V. parahaemolyticus* isolates as generated by UPGMA method from genetic distances.

신안지역에서도 유행한 주요 혈청형임을 확인할 수 있었다.

그러나 여러 연구자들에 의해 보고된 주된 혈청형의 종류는 보고시기 및 지역에 따라 상이하였는데, Bhuiyan 등 (15)은 1998년부터 2000년까지 Dhaka, Bangladesh의 ICDDR 병원의 설사환자에서 분리된 66균주에 대한 조사 결과 혈청형은 총 17가지의 분포를 보였으며, 그 중 O3:K6 (42.4%)이 가장 많았고 O4:K68 (18.2%), O1:K56 (6.1%) 순이었다고 하였다. 국내의 연구 결과, Ju (16)는 남해안 일대의 해수, 해산물에서 분리한 100균주 중에서 가장 높은 분리율을 보인 혈청형은 O2:K28형 (28.8%), 다음이 O5:K17형 (15.5%), O3:K37형 (13.3%) 순이었다고 하였으며, 또한 Ryu (17)는 1969년부터 1983년까지 어패류와 환자에서 분리된 균주에서 O2:K3형이 52%로 가장 많았고, O10:K52형이 10%, O4:K9형이 9%, O3:K5형이 5%이었다고 하였다. 최근 Lee 등 (18)은 2001년부터 2002년

까지 경북지역 설사환자에서 분리한 25균주의 혈청형 분포 조사에서 O3:K29형이 24.0%, O3:K6형 16.0%로 보고하였다.

본 연구에서 분리된 균주의 주된 혈청형은 O4:K68형 이었고, 특히 O3:K6혈청형은 주된 조사지역인 신안지역에서는 발생이 없었고 다른 지역에서 5균주가 분리되었다. 일본에서도 1996년 이후에 집단식중독에서 검출된 혈청형이 예전에 우세했던 O4:K8형에서 O3:K6형으로 변화하였고 1997년부터 1998년에도 O3:K6혈청형이 가장 많이 분리된 것으로 보고한 바 있다 (15, 19). 이러한 결과는 일본, 동남 아시아지역에 널리 유행했던 O3:K6형이 우리나라의 경북지역 (18)에서 주된 혈청형으로 보고되었고 본 연구 결과 전남에서도 검출된 것으로 보아 앞으로 국내 주요 혈청형이 될 가능성이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 주목할 점은 다른 지역에서는 보고가 없던 O1:K70혈청형 16균주가 환자에서 분리되었는데, 이

는 O1:K70혈청형이 신안지역에 특별히 많이 존재한 혈청형이었거나 아니면 O4:K68혈청형으로 변해가는 과정으로 생각되며, 이것에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 요구된다. 또한 중복되는 혈청형 2건 (O3:K57, O4:K68)만 제외하고 나머지는 신안에서 분리된 혈청형이 다른 지역에서는 분리되지 않았고 다른 지역에서 분리된 혈청형이 신안에서는 분리되지 않았다. 이는 신안이 섬으로만 구성되어 있는 지리적 특성을 고려해야 할 것으로 생각되며, 이에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

장염비브리오균의 설사 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, *tdh* 또는 *trh* 유전자와 밀접한 관계가 있는 것으로 확인되었고 (20), 또한 이 유전자들의 검출방법도 보고되고 있다 (21). Shirai 등 (22)은 설사환자에서 분리된 장염비브리오균 중 52.3%가 *tdh* 유전자를, 24.3%가 *trh* 유전자를, 11.2%가 *tdh* 및 *trh* 유전자를 동시에 가지고 있는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 분리된 87균주 모두에서 TDH 독소가 발현되었으며, 또한 *tdh* 유전자가 모두 검출되었지만, *trh* 유전자는 검출되지 않았다. 이는 사용한 균주가 모두 임상증상을 나타낸 환자에서 분리된 것이었기 때문으로 생각된다.

Hara-Kudo 등 (23)은 일본의 자연환경에서 장염비브리오균의 독소 유전자인 *tdh*와 *trh*를 조사한 결과, 검출률은 10%이었고 독소 TDH 발현은 3.3%로 아주 낮았다고 하였다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 자연환경에서는 독소가 없는 장염비브리오균이 90% 이상 상존해 있고 환자에서는 대부분 독소가 있는 장염비브리오균이 분리되었다. 이는 식품공전에 나와 있는 수산물에 대한 잠정 규격 (24) 중 장염비브리오균을 독소 생산 유무와 상관없이 규제하고 있으나 앞으로는 균 분리가 되었을 경우 독소 시험을 추가하여 독소를 생성한 장염비브리오균만을 규제하는 것으로 고려되어야 할 것이다.

전남지역에서 분리한 장염비브리오균의 PFGE 분석은 30균주를 분석하였다. 먼저 2005년에 장염비브리오균에 의한 식중독 환자가 특히 많았던 신안지역을 중심으로 조사하였고 더불어 다른 지역에서 분리한 몇몇 균과의 연관도를 비교해 보았다. PFGE의 유전체형은 크게 3가지 대그룹과 9가지 소그룹으로 분석되었다. 2005년 7월과 8월에 신안지역에서 유행했던 O4:K68혈청형 14균주에서 12균주가 100% 같은 균으로 나타나 신안지역의 장염비브리오균에 의한 식중독의 대부분을 차지한 것으로 해석된다. 그러나 같은 신안에서 분리된 같은 혈청형이지만

나머지 2균주의 연관도는 각각 58.3%와 45.4%로 낮게 나타났다. 이러한 같은 혈청형내에서도 낮은 연관도를 보인 것은 외부 유입 혹은 유전체 변이를 의심할 수 있지만 이에 대해서는 좀 더 많은 역학적 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구에서 신안지역을 포함한 다른 지역 (구례, 여수)에서 분리한 O3:K6혈청형과 O1:K4 혈청형은 각각의 혈청형내에서 밀접한 연관도를 보였으며, O1:K4형, O1:K46형, O1:K60형, O1:K68형, O1:K70형, O3:K6형, O4:K68형은 혈청형이 다름에도 불구하고 80.9% 이상의 연관도를 나타냈다. 본 연구에서 분리한 균은 설사환자에서 분리한 것으로만 하였는데, 추후 연구에서는 해수 및 해산물 등을 포함한 다양한 샘플 조사를 통해 식중독의 원인균을 추적하는데 있어 PFGE법이 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

앞으로 전남지역 뿐만 아니라 다른 지역에서 발생한 장염비브리오균에 대해서도 유전체형에 대한 더 많은 연구가 필요하며, 이 연구를 통해 축적된 결과는 장염비브리오균 환자 발생의 역학조사에 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. Food Microbiol 2007;24:549-58.
- 2) Honda T, Chearskul S, Takeda Y, Miwatani T. Immunological methods for detection of Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. J Clin Microbiol 1980;11:600-3.
- 3) Takeda Y. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Pharmacol Ther 1982;19:123-46.
- 4) Kaysner CA, Tamplin ML, Twedt RM. *Vibrio*. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF(Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, DC 1992;451-73.
- 5) Hondo S, Goto I, Minematsu I, Ikeda N, Asano N, Ishibashi M, Kinoshita Y, Nishibuchi N, Honda T, Miwatani T. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. Lancet 1987;1:331-2.
- 6) Kishishita M, Matsuoka N, Kumagai K, Yamasaki S, Takeda Y, Nishibuchi M. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl Environ Microbiol 1992;58:2449-57.

- 7) Okuda J, Nishibuchi M. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. *Mol Microbiol* 1998;30:499-511.
- 8) Nishibuchi M, Taniguchi T, Misawa T, Khaomaneelam V, Honda T, Miwatani T. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 1989;57:2691-7.
- 9) Honda T, Abad-Lapuebla MA, Ni YX, Yamamoto K, Miwatani T. Characterization of a new thermostable direct haemolysin produced by a Kanagawa-phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Gen Microbiol* 1991;137:253-9.
- 10) Tada J, Ohashi T, Nishimura N, Shirasaki Y, Ozaki H, Fukushima S, Takano J, Nishibuchi M, Takeda Y. 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* 1992;6:477-87.
- 11) Wong HC, Lu KT, Pan TM, Lee CL, Shih DY. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996;34:1535-9.
- 12) Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T, Nishibuchi M, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg Infect Dis* 2000;6:631-6.
- 13) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
- 14) Obata H, Kai A, Morozumi S. The trends of *Vibrio parahaemolyticus* foodborne outbreaks in Tokyo: 1989~2000. *Kansenshogaku Zasshi* 2001;75:485-9.
- 15) Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, Alam K, Chowdhury NR, Nishibuchi M, Faruque SM, Sack DA, Takeda Y, Nair GB. 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.
- 16) Ju JW. Studies on *Vibrio parahaemolyticus* on the southern seas of Korea-on the isolation of *V. parahaemolyticus* from sea water, sea mud and marine products in Jeju, Keoje, Namhae, Yockji, Busan and Masan. *J Korean Soc Microbiol* 1983;18:1-9.
- 17) Ryu JK. Studies on biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Korea. Ph.D Thesis, Graduate School, Konkuk Univ, 1984.
- 18) Lee SJ, Chung JK, Lee DY, Lee BK, Lee KJ, Lee HM. A study of virulence factors and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients and environmental sources in Gyeongbuk province. *Infect Chemother* 2003;35:407-15.
- 19) Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park KS, Yokoyama K, Makino K, Shinagawa H, Honda T. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J Clin Microbiol* 2000;38:2156-61.
- 20) Kishishita M, Matsuoka N, Kumagai K, Yamasaki S, Takeda Y, Nishibuchi M. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2449-57.
- 21) Kim YB. Virulence factors and genotyping of *Vibrio parahaemolyticus* in sea water and clinical isolates. *J Bacteriol Virol* 2001;31:229-38.
- 22) Sakurai J, Matsuzaki A, Miwatani T. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 1973;8:775-80.
- 23) Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibuchi M, Chowdhury A, Yatsuyanagi J, Ohtomo Y, Saito A, Nagano H, Nishina T, Nakagawa H, Konuma H, Miyahara M, Kumagai S. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:3883-91.
- 24) Food code. Korea Food and Drug Administration 2005;518.