

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (1) :12 - 21; 4 January 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140203

副溶血性弧菌分子标志基因研究概况

韩海红^{1,2}, 李宁^{2*}, 郭云昌²

¹ 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021

² 国家食品安全风险评估中心, 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021

摘要: 副溶血性弧菌是重要的食源性致病菌, 其中, O3:K6 血清型是 1996 年后导致多个国家多起食物中毒暴发的病原菌。中国 1992 - 2001 年的统计数据表明, 由副溶血性弧菌引起的胃肠炎占由微生物引起的食源性疾病的 31.1%。副溶血性弧菌环境株大部分是非致病性的, 而临床株则能产生耐热直接溶血素、耐热相关溶血素以及其它毒力因子。本文综述了 3 种重要的副溶血性弧菌的分子标志物, 包括种特异性基因、毒力基因以及大流行菌群特异基因, 旨在为研究者们针对性的选取基因开展快速检测副溶血性弧菌和鉴别其致病因子的研究提供参考依据。

关键词: 副溶血性弧菌, 标志基因, 大流行菌群

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 01-0012-10

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是革兰氏阴性杆菌, 它广泛的分布在水生环境——包括河水、海水以及海水沉积物, 是无脊椎动物公认的病原体^[1-2], 可以从多种海产品中分离检出^[3]。副溶血性弧菌可以吸附于滤食性软体甲壳类动物如牡蛎的肠道, 并在其中繁殖。食物如果未作适当处理可能会污染大量的副溶血性弧菌。由副溶血性弧菌引起的感染最典型的症状是胃肠炎, 通常是自限性疾病, 症状比较缓和, 持续时间也较短。食用污染有副溶血性弧菌的食物后, 约 8 - 20h 内发病, 典型症状是腹泻、头痛、呕吐、恶心、腹部绞痛和低热^[4]。副溶血性弧菌也可导致有基础疾病或者免疫低下的人群发生致命的败血症^[5]。中国 1992 - 2001 年的 10 年

数据显示, 副溶血性弧菌暴发病例占总的食源性疾病暴发病例的 31.1%^[6]。王世杰等^[7]在对 1994 - 2003 年我国 766 起细菌性食物中毒的分析报告中发现, 副溶血性弧菌引起的食物中毒起数最多, 占 20.2%, 沿海省份的副溶血性弧菌则占总起数的 24.4%。其它国家的数据显示, 在日本由副溶血性弧菌引起的食物中毒占总食物中毒事件的 20% - 30%^[8]; 副溶血性弧菌也是其它亚洲国家的常见的食源性疾病病因^[9]; 在美国, 副溶血性弧菌是和消费海产品有关的人类胃肠炎的首要致病因子^[10]。

副溶血性弧菌是河口和海洋环境的自然宿主, 大部分环境分离株缺失致病性蛋白的编码基因^[11-12], 在实验动物腹泻试验中结果为阴性, 而临

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAK01B02)

* 通信作者。E-mail: lining_65@163.com

作者简介: 韩海红 (1983 -), 女, 河北张家口人, 在职博士研究生, 助理研究员, 研究方向为卫生毒理学和食品微生物学。E-mail: hanhaihong@cfsa.net.cn

收稿日期: 2014-04-17; 修回日期: 2014-06-16

床分离株则为阳性^[13]。副溶血性弧菌临床株和环境株的区别在于临床株能产生耐热直接溶血素 (Thermostable direct hemolysin, TDH)、TDH 相关溶血素 (TDH-related hemolysin, TRH) 以及其它毒力因子。1996 年前, 由副溶血性弧菌引起胃肠炎表现为由多种不同血清型引起的散发病例。1996 年后其发病率突然增高, 并一直保持高水平态势。结果发现一群属于 O3:K6 血清型并且 *tdh* +, *trh* -, 不产尿素酶的菌株大量出现, 占同期分离菌株数量的 50% - 80%, 后又发现 O4:K68、O1:K25、O1:K26、O1:KUT (O1:K untypeable) 和 O3:K6 血清型用多种分子分型方法都有几乎相同的图谱^[14-15], 它们与新 O3:K6 菌株共同组成“大流行菌群 (pandemic group)”。它们具有以下特点: 1996 年以后分离、致病性较强、TDH 阳性、TRH 阴性和 GS-PCR 阳性。目前, 大流行菌群共有 14 种血清型, 包括 O1:K25、O1:K41、O1:K56、O1:KUT、O3:K6、O3:K58、O3:K68、O3:K75、O4:K8、O4:K12、O4:K68、O4:KUT、O5:KUT 和 O1:K6。其中, O3:K6、O4:K68、O1:K25、O1:K6 和 O1:KUT 是 1996 年后引起多起暴发的主要血清型^[15-22]。

鉴于副溶血性弧菌对人群的流行病学意义, 快速地检测副溶血性弧菌、鉴别其致病因子将显得尤为重要。本文将主要针对几种重要的副溶血性弧菌的分子标志物, 如种特异性基因、毒力基因以及大流行菌群检测等的研究进展进行综述, 旨在为研究者针对研究目的选用基因开展相关研究提供一定的参考依据。

1 种特异性基因

鉴于副溶血性弧菌的流行病学意义, 科学家们相继开展针对副溶血性弧菌种特异性的快速检测技术研究, 以使其与其它相似弧菌快速鉴别。针对副溶血性弧菌的种特异性基因, 包括 *tlh* (不耐热溶血素, thermolabile haemolysin)、*toxR*、*gyrB*、pR72H 等 10 个种特异性基因的研究进展本文进行了概述。

tlh 是和人类的疾病无关的溶血素基因, 前期的研究显示该溶血素基因存在于所有的副溶血性弧菌菌株中^[23-24], 于是 Bej 等^[25] 利用该基因特异性地检测副溶血性弧菌, 结果显示 111 株副溶血性弧菌都有阳性扩增, 而其它 19 株 (包括 4 株霍利斯弧菌,

6 株霍乱弧菌, 8 株其它弧菌属以及 1 株邻单胞菌属) 都没有扩增。然而, 有研究显示, 尽管副溶血性弧菌 100% 都有 *tl* 基因, 但是此基因缺乏特异性, 其它弧菌属也会产生假阳性结果^[26]。

toxR 基因先是作为霍乱毒素操纵子的调节基因被发现的, 后又发现它参与霍乱弧菌其它许多基因的调节。在副溶血性弧菌中也发现了 *toxR* 基因的调节功能。*toxR* 基因在弧菌属间比较保守, 副溶血性弧菌和霍乱弧菌的 *toxR* 基因相似度 (52% 相似度) 要远比 rRNA 基因 (91% - 92% 相似度) 的相似程度低。KIM 等^[27] 利用 14 株副溶血性弧菌和 14 株非副溶菌株建立了基于 *toxR* 基因的 PCR 方法来特异性地检测副溶血性弧菌, 作者利用 494 株菌株 (包括副溶血性弧菌和非副溶血性弧菌) 验证了其建立的 PCR 方法, 结果显示所有 373 株副溶血性弧菌都有唯一的特异性扩增条带, 而非副溶血性弧菌没有特异扩增, 仅在 5 株创伤弧菌 (共 11 株) 中有非特异扩增, 非特异扩增子要比特异扩增子大且不明显, 因此可以辨别。目前 *toxR* 基因是比较公认的副溶血性弧菌特异性基因。

gyrB 基因编码 DNA 促旋酶 (拓扑异构酶 II 型) 的 B 亚单位蛋白。它是单个克隆基因, 在 DNA 复制过程中起关键作用。KASTHURI 等^[28] 测序了副溶血性弧菌 ATCC 17802 和溶藻弧菌 ATCC 17749 的 *gyrB* 全基因序列。副溶血性弧菌和溶藻弧菌的 *gyrB* 基因全长 1258bp, 共有 166 个碱基置换, 而 16S rRNA 全长 1451 bp, 只有 5 个碱基置换, 可见 *gyrB* 基因的碱基置换率要比 16S rRNA 序列高。副溶血性弧菌和溶藻弧菌的 *gyrB* 基因同源性是 86.8%, 而 16S rRNA 基因同源性是 99.7%, 说明 *gyrB* 基因较 16S rRNA 更适合做种特异性基因。KASTHURI 等^[28] 设计了针对该基因的引物, 并且用 72 种细菌共 267 个菌株验证了引物的特异性, 结果显示 117 株副溶血性弧菌能特异性的扩增, 而其它种属的细菌没有扩增, 说明了这对引物对副溶血性弧菌是特异的, 能用于该菌的分子诊断。

pR72H 是从染色体 DNA 的 *Hind*III 克隆的大小为 0.76kb 的 DNA 片段, 其中包含了磷脂酰丝氨酸合成酶基因和非编码区。CHIA-YIN LEE 等^[29] 设计了引物, 结果显示所有的 124 株副溶血性弧菌都能产生特异性的扩增产物, 而 50 株其它弧菌属或相关菌属不能扩增, 说明该扩增产物对副溶血性弧菌是

特异的;PCR 的敏感性实验表明,该 PCR 体系能最低检测到 2.6fg 纯化的 DNA 模版,也就是相当于 1 个细菌;而当副溶血性弧菌数量增加到 2×10^{10} CFU/mL 时不能产生扩增产物,或者当副溶血性弧菌在 50 μ L 反应体系中的数量超过 10^6 CFU 时,PCR 反应会产生假阴性结果。一项针对 30 个菌株的两个实验室比对结果,*toxR*、*tlh* 和 pR72H 的 PCR 方法 3 者中,*toxR* 显示了最高的灵敏度(96%)、特异性(100%,即无假阳性)和一致性(97%),pR72H 的 3 项指标分别为灵敏度(71%)、特异性(94%)和一致性(73%)^[26]。

irgB 基因(也即 *vp2603*),编码了铁调控的毒力调节蛋白 IrgB。针对 *irgB* 的 PCR 检测的敏感性结果显示:293 株副溶血性弧菌都能有特异性的扩增,而其它 11 株弧菌属和 35 株非弧菌属细菌没有扩增,最低检测限是 0.17 pg 纯基因组 DNA^[30]。*groEL* 基因,编码 60 kDa 亚单位(也称 HSP60,是大小为 60 kDa 的伴侣蛋白和热休克蛋白),是自然界中的最保守的基因之一。针对 *groEL* 基因的 PCR 结果显示,70 株副溶血性弧菌都显示了特异性的扩增,而其它 40 株弧菌属和 10 株非弧菌肠道菌没有特异性扩增^[31]。

CDS(VP1332)基因,编码了 ABC 转运子可能的结合蛋白^[32]。Liu 等^[33]于 2012 年发展了针对该基因的实时定量荧光 PCR(real time PCR),PCR 反应的特异性用了 309 株副溶血性弧菌和 81 株非副溶血性弧菌来测试,结果显示该 PCR 方法能特异地检测 309 株副溶血性弧菌,检测的灵敏度是:纯化的基因组 DNA 是 4.8 fg,或菌落 1 CFU/每个 PCR 反应。

dnaJ,是一种编码热休克蛋白 40 的管家基因,Nhung 等^[34]建立了基于 *dnaJ* 基因检测 5 种弧菌(分别是霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和拟态弧菌)的多重 PCR 方法,采样该 PCR 方法对 355 株细菌进行特异性检验,包括 13 种弧菌属细菌(其中包括从腹泻病人粪便中分离的 202 株霍乱弧菌、74 株副溶血性弧菌、33 株创伤弧菌、14 株拟态弧菌和 7 株溶藻弧菌,还有其它 8 种弧菌属)和 17 种非弧菌细菌。结果发现,特异性的 PCR 扩增条带各自只出现在 5 种目标菌中,而其它菌(5 种菌之外的弧菌属和非弧菌属),表明每个引物对于相应的各个目标菌属来说都是特异的^[34]。然而,后来研究发现该方法仅对致病性弧菌是特异的,而不能鉴

别非致病弧菌。

金属蛋白酶(metalloprotease)在细菌的毒性过程中发挥了重要作用。研究发现致病性弧菌的金属蛋白酶具有不同的底物特异性,这与它们作为毒性因子在引起宿主感染过程(如增强血管通透性、引起组织损伤、细胞毒性和促进败血症)中扮演的不同角色相一致^[35]。Luan 等针对副溶血性弧菌的金属蛋白酶(*vpm*)基因建立了 PCR 方法^[36],作者用 16 个不同种类的 101 株菌来验证反应的特异性,85 株不同来源的副溶血性弧菌都有特异性扩增,而其它非副溶血性弧菌则没有扩增,说明基于 *vpm* 基因的 PCR 方法可以用来特异、灵敏和快速的检验副溶血性弧菌。然而,Han 等^[37]研究发现 174 株副溶血性弧菌中有 25 株 *vpm* 阴性,说明该基因不是该菌特异性基因。位于大环染色体上的类组蛋白类核结构 H-NS 基因(VP1133),是肠道细菌的类核相关的 DNA 结合蛋白,参与了细菌对环境因子的适应性反应^[38]。H-NS 基因的 PCR 扩增结果显示,82 株副溶血性弧菌菌株均有特异性扩增条带,而 47 株其它弧菌属和非弧菌细菌都没有扩增^[39]。

2 毒力基因

从食品中分离的副溶血性弧菌大多是非致病性的,所以毒力因子的检测在判定菌株是否致病中尤为重要。*tdh* 基因编码耐热直接溶血素(TDH),它能溶解红细胞,也即神奈川现象(Kanagawa phenomenon, KP),KP 现象被认为是区分致病性副溶血性弧菌和非致病菌的重要标志。到目前为止,已经发现了 5 种 *tdh* 基因,其中 *tdh1*、*tdh2*、*tdh4* 和 *tdh5* 是位于染色体上的,*tdh3* 则位于质粒上的,5 个基因之间有 96% 的 DNA 序列相似性,TDH 主要是由 *tdh2* 基因表达产生,而其它基因则表达水平非常低^[40-41]。遗传分析的结果显示 *trh* 基因和 *tdh* 基因密切相关,大约有 68% 核苷酸序列的同源性^[42]。然而,不同菌株的 *trh* 基因序列,可以分为两个群,分别是 *trh1* 和 *trh2* 基因,两者之间有 84% 的序列相似性^[43]。

利用 RAPD(随机扩增多态性 DNA,randomly amplified polymorphic DNA)PCR 方法发现大多数副溶血性弧菌临床株会产生一个特殊的 600 bp 扩增子(条带 Y),而很少在环境株中出现,克隆并测序

后发现该条带编码一种外膜蛋白 (outer membrane protein, OMP), 基于此发展了一个 PCR 方法来检测可能的毒力株 (PCR-OMP)^[44]。结果发现测试的 24 株临床株中有 22 株有阳性产物, 而 32 株环境株仅有 1 株阳性, 测试的 22 株其它弧菌属均没有扩增条带。在 22 株 PCR-OMP 阳性菌株中, 18 株 (81%) *tdh* +, 10 株 (40%) *trh* +, 19 株 (86.4%) T3SS2 +。而在 33 株 PCR-OMP 阴性菌株中, 5 株 (15%) *tdh* +, 7 株 (21%) *trh* +, 10 株 (30%) T3SS2 +。作者还研究了菌株的细胞毒性, 发现 PCR-OMP + 的菌株能引起乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放更多, 且与环境株相比有显著性差异, 仅那株 PCR-OMP + 的环境株例外。该研究表明这个新 PCR 方法可以用来检测可能对人类致病的菌株。

在副溶血性弧菌 RIMD2210633 的序列中发现了两套 III 型分泌系统基因 (type III secretion system, T3SS), 分别位于染色体 1 和染色体 2 上 (T3SS1 和 T3SS2)^[32]。T3SS1 几乎在所有的副溶血性弧菌中都存在, 其遗传结构和组织方式和耶尔森菌属的 T3SS 很相似, 参与了细胞毒性作用, 包含的基因簇有: *vopB* (VP1657)、*yopN* (VP1667)、*vscP* (VP1670)、编码分泌效应蛋白的 ORF (VP1680)、*vscJ* (VP1690) 以及 *vscC1* (VP1696)。而 T3SS2 嵌入在一个 80 kb 的致病岛 (该岛上有两个 *tdh* 基因) 上, 仅存在于 KP 阳性的副溶血性弧菌^[32], 它参与了宿主的肠毒性作用, 是弧菌属特有的。

3 大流行菌群特异基因

MATSUMOTO 等^[15] 利用 *toxRS* 操纵子序列建立了 GS-PCR (group-specific PCR) 方法检测新 O3:K6 群。*toxRS* 操纵子内的 *toxR* 和 *toxS* 基因编码了一组跨膜蛋白, 它们参与了毒力相关基因的调控, 在弧菌属内非常保守^[45]。这个 PCR 方法可以将 172 株新 O3:K6 克隆群和先前分离的 O3:K6 菌株明显区分, 其它 28 个血清型 (除外 O3:K6) 的 166 株菌也用该方法检验, 发现 1997 年以后来自 3 个国家的从国际旅行者体内分离的 *tdh* +, *trh*- 的属于 O4:K68 和 O1:KUT 的菌株也有阳性结果。这些菌株的 AP-PCR 图谱和新 O3:K6 群几乎一致, *toxRS* 序列也和新 O3:K6 群 100% 一致, 提示这些菌株可能是由 O3:K6 克隆群通过改变 O:K 抗原进化而来。然而,

后续的研究显示一些 PFGE 不可分型不产 TDH 的 O3:K6 菌株 *toxRS/new* 也显示为阳性^[46]。Han 等^[37] 在研究中也发现有一株 *tdh*- 的 O3:K6 菌株 GS-PCR 阳性, 说明该基因的缺乏特异性。

有研究表明, 丝状噬菌体 f237 是和 1996 年后的 O3:K6 血清型菌株特异的相关^[47]。这个噬菌体有 10 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其中包括一个独特的开放阅读框 ORF8, 它的序列和已知的 DNA 序列无同源性。结果表明, 该 PCR 方法能特异地扩增所有 35 株测试的致病性副溶血性弧菌 O3:K6 大流行株, 而不能扩增 1996 年前爆发分离的 2 株 O3:K6 菌株、122 株非 O3:K6 副溶血性弧菌、198 株非副溶血性弧菌弧菌属、以及 16 株非弧菌属细菌^[48]。然而, Bhuiyan 等^[14] 发现一些 1998-2000 年间分离的 O3:K6 临床株没有检测到 *orf8*。Han 等^[37] 也发现有 3 株大流行菌株 *orf8* 阴性, 说明该基因缺乏灵敏度。

AP-PCR 的结果发现大流行菌群有一个群特异性的 930 bp 的扩增子, 该片段位于基因组的编码假想蛋白区域, 其序列和创伤弧菌的 NRAMP 家族 (自然抗性相关巨噬细胞蛋白, natural resistance associated macrophage protein) 的 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 的转运子有 80% 的相似性^[17]。于是 Okura 等^[49] 发展了一个针对该片段的 PCR 方法, 用 82 株副溶血性弧菌, 结果显示所有 38 株大流行株都有特异性扩增, 而其它 44 株不同血清型的非大流行株则没有扩增。Han 等^[37] 在研究中发现仅在 39 株大流行菌株中 PGS-PCR 阳性, 证实了该基因的特异性。

Khan 等^[50] 发现 O3:K6 血清型菌株有一段特异性的 850 bp 的肠道细菌基因间重复序列 (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC) 的 DNA 片段, 结果显示, 18 株 O3:K6 血清型菌株都有特异扩增, 而其它 25 株非 O3:K6 血清型、30 株其它弧菌属、和 3 株嗜水气单胞菌均没有显示扩增。然而, 另一项研究显示, 该基因缺乏特异性^[51]。

Williams 等^[52] 利用蛋白组学的方法, 发现了 O3:K6 副溶血性弧菌的类-组蛋白 DNA 结合蛋白 Hu- α 的 ORF 的 3' 末端有一个大小为 16000 bp 的插入序列, 结果导致它有一个和其它副溶血性弧菌不同的 C-末端氨基酸序列。经验证, Hu- α /插入序列是对大流行菌群 (包括 O3:K6、O1:K25、O4:K68、O1:Kut) 特异性的。然而, 另一项研究显示, 该基因

缺乏特异性^[51]。Han等^[37]发现有1株大流行菌株Hu- α 基因阴性,说明该基因缺乏灵敏度。

Okura等^[53]利用基因组减法的方法鉴定了一个大流行菌群特异性的DNA序列,该序列和Vp2905基因的部分序列有同源性。作者设计了引物来扩增该基因,用153株不同血清型的菌株,其中有55株大流行菌株和98株非大流行菌株(用*tdh*和*toxRS/new*多重PCR、以及PGS-PCR方法鉴定是否为大流行菌株)进行特异性检验。结果显示所有大流行菌

株(除1株O4:K68临床株外)该基因阳性,所有非大流行菌株没有阳性扩增。这个基因位于HU- α 的3'末端大小为16000 bp的插入序列内,这和Williams^[52]的结果相互印证。

VPaI-5 (VP2900-2910)是一组编码未知功能假想蛋白的基因簇^[54]。Han等^[37]研究显示该基因簇是副溶血性弧菌大流行菌群所特有的。表1为10个基因的引物序列等信息。

表1. 本文基因引物信息表

Table 1. The primers information of genes mentioned

Target gene	Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp	Reference
<i>tlh</i>	L-tl	AAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	[25]
	R-tl	GCTACTTTCTAGCATTCTCTCTGC		
<i>toxR</i>	-	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368	[27]
	-	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG		
<i>gyrB</i>	VP-1	CGCGCTGGGTGTTTCGGTAGT	285	[28]
	VP-2r	TCCGCTTCGCGCTCATCAATA		
pR72H	VP33	TGCGAATTCGATAGGGTGTAAACC	387	[29]
	VP32	CGAATCCTTGAACATACGCAGC		
<i>irgB</i>	<i>irgB</i> (F)	CGATACACACCACGATCCAG		[30]
	<i>irgB</i> (R)	ATACGGCCGGGTGATGTTTCT		
<i>groEL</i>	<i>gro-vp1</i>	AGGTCAGGCTAAGCCGTAAGC	510	[31]
	<i>gro-vp2</i>	GTCACCGTATTCACCCGTCGCT		
CDS	vp1332PF	TTAAGATGGATGGTTCACTGCTG		[33]
	vp1332PR	GGGTTTATGTATGTCTGTTTCTG		
<i>hly</i>	Vp-tlh1	GATTTGGCGAACGAGAAC	695	[55]
	Vp-tlh2	CGTCTCGAACAAGGCC		
<i>dnaJ</i>	VM-F	CAGGTTTGYTGCACGGCGAAGA	96	[34]
	VP-MmR	TGCGAAGAAAGGCTCATCAGAG		
<i>vpm</i>	VPM1	CAGCTACCGAAAACAGACGCTA	675	[36]
	VPM2	TCCTATCGAGGACTCTCTCAAC		
H-NS	HNS1	AAACACGTTAACCTATTAATAGG	465	[39]
	HNS2	AACGGGAGCCTTTTTAAACAAGA		
<i>tdh</i>	L- <i>tdh</i>	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	269	[56]
	R- <i>tdh</i>	TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC		
<i>trh</i>	L- <i>trh</i>	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	500	[57]
	R- <i>trh</i>	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG		
OMP	VPOMP1	GTCACGCGGCCAAACAAAGAGA	200	[44]
	VPOMP2	ACCGCATATCACTGTTGGCTGGG		
<i>toxRS/old</i>	<i>toxRS/old</i> (forward)	TAATGAGGTAGAAAACG	651	[17]
	<i>toxRS/old</i> (reverse)	ACGTAACGGGCTTACC		
T3SS	VPA1321F	GGTTAGTGAATCCAACCAAACCGC	-	[44]
	VPA1321R	TTGCCGTGCATGTCATACAACCAG		
	VPA1339F	GACACTCGCTGTTGTTCTCAGGTA		
	VPA1339R	GTAAGCGCGTGATGTTAGCTCTTC		
	VPA1355F	GGCATGTGGTGTCTATTTGACACG		
	VPA1355R	TACGACAACCTGCAGGTAGTCCAAG		
<i>toxRS/new</i>	GS-VP. 1	TAATGAGGTAGAAAACA	651	[45]
	GS-VP. 2	ACGTAACGGGCTTACA		

续表 1

Target gene	Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp	Reference
orf8	F-03MM823	AGGACGCAGTTACGCTTGATG	369	[48]
	R-03MM1192	CTAACGCATTTGCCCTTTGTAG		
PGS-PCR	PGS-1	TTCGTTTTCGCGCCACAAC	235	[49]
	PGS-2	TGCGGTGATTATTGCGCTCT		
ERIC-PCR	VPF2	CGCTTAGATTTGGGGGTGTG	327	[50]
	VPR2	GTTGGTTGAGGCATAGGTAGC		
Hu-α : : insertion	-	CGATAACCTATGAGAAGGGAAACC	474	[52]
	-	CTAGTAAGGAAGAATTGATTGTCAAATAATG		
Vp2905	F2-1-F	GGCTGCTATAACATFGAGCAC	385	[53]
	F2-1-R	GAGGACTTGTGAAATCCCATG		
VP2900	PVP2900F	GGCAAAGACTCGGAAGGTGAG	300	[37]
	PVP2900R	AGCAGGCAGGTGTTCTTCTAG		
VP2901	VP2901F	AGTCTCCCGTCGAAAGC	923	[37]
	VP2901R	ACCCACGACAGGAATCCC		
VP2902	VP2902F	AGTCGCAGGAATAAGAGACG	907	[37]
	VP2902R	GTTCAAGAGCATCGCAATCC		
VP2903	VP2903F	GGGGCTAGGCAAGACCG	1,135	[37]
	VP2903R	GGCTTACCCCTCCACC		
VP2905	VP2905F	TACTGGCTGTGAACTCC	2,000	[37]
	VP2905R	TGTTGCAGGCTGGTCTG		
VP2907	VP2907F	AGCATTTTAAGCCAGTTCG	360	[37]
	VP2907R	AGCTCTCAAAGAGGAGAC		
VP2908	PVP2908F	AGTAAAGGTATTGGCAAGGC	300	[37]
	PVP2908R	TCTCGTTCAGCAGTAACTCGC		
VP2909	VP2909F	TGGGGCCATTACTCGTG	980	[37]
	VP2909R	CGATGTAGGCGAGCTTGC		
VP2910	PVP2910F	TTGGGACGGAAATTGAACTC	300	[37]
	PVP2910R	CTTCAACTCCGGCTCAATGG		

4 结语和展望

针对副溶血性弧菌的分子标志基因, 科学家们开展了多方面研究, 推陈出新, 相互验证。由于缺乏有效的评价基因特异性标准体系, 很多研究者在有限资源(尤其是菌株资源)的基础上得出基因特异性的结论被后续研究者否定。在种特异性基因研究方面, *toxR* 和 *tlh* 是应用较广、使用时间较长的标志基因; 而 PGS-PCR 是目前经验证为大流行菌群特异性较高的标志基因。在副溶血性弧菌的毒力基因方面, 尽管已经取得了巨大进步, 然而其致病机理尚不明了, 最新的研究发现 T4SS 在细胞的黏附和致病性方面发挥了一定的作用。随着更多的副溶血性弧菌全基因组序列的完成^[32, 58-65], 分子生物信息学和比较基因组学必将会发现更多有价值的基因用于快速检测, 虽然利用标志基因来进行物种鉴定、毒力检验、或者分子分型, 有时其灵敏度和/或特异性尚不

能完全达到 100%, 但无论如何, 分子生物学方法以其自动化程度高、通量大、速度快、易于标准化操作的优点, 还是备受研究者的喜爱。

参考文献

- [1] Cai J, Li J, Thompson KD, Li C, Han H. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology*, 2007, 47 (1) : 84-86.
- [2] Martin GG, Rubin N, Swanson E. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyoniaingentis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60 (1) : 21-29.
- [3] Mccarter L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*, 1999, 1 (1) : 51-57.
- [4] Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct

- haemolysin and related haemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*, 1993 (4) : 106-113.
- [5] Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 2007, 24 (6) : 549-558.
- [6] Liu X, Chen Y, Wang X, Ji R. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system. *Journal of Hygiene Research*, 2004, (6) : 725-727. (in Chinese)
刘秀梅, 陈艳, 王晓英, 计融. 1992 ~ 2001 年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测网. 卫生研究, 2004, (6) : 725-727.
- [7] Wang S, Yang J, Shen Z, Zhang W, Li J. Analysis on 766 Events of Bacterial Food Poisoning in China from 1994 to 2003. *China Preventive Medicine*, 2006, (3) : 180-184. (in Chinese)
王世杰, 杨杰, 湛志强, 张伟, 李君文. 1994-2003 年我国 766 起细菌性食物中毒分析. 中国预防医学杂志, 2006, (3) : 180-184.
- [8] Alam MJ, Tomochika KI, Miyoshi SI, Shinoda S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 208 (1) : 83-87.
- [9] Korallage MS, Alter T, Pichpol D, Strauch E, Zessin KH, Huehn S. Prevalence and molecular characteristics of *Vibrio spp.* isolated from preharvest shrimp of the North Western Province of Sri Lanka. *Journal of Food Protection*, 2012, 75 (10) : 1846-1850.
- [10] Newton A, Kendall M, Vugia DJ, Henao OL, Mahon BE. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54 (Suppl 5) : S391-S395.
- [11] Gutierrez WC, Klein SL, Lovell CR. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (7) : 2247-2252.
- [12] Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I, Karunasagar I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (7) : 3575-3580.
- [13] Shinoda S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections. *Biocontrol Science*, 2011, 16 (4) : 129-137.
- [14] 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (1) : 284-286.
- [15] Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, Wong HC, Depaola A, Kim YB, Albert MJ, Nishibuchi M. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (2) : 578-585.
- [16] Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya SK, Nair GB, Nishibuchi M. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35 (12) : 3150-3155.
- [17] Okura M, Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41 (10) : 4676-4682.
- [18] Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen JL, Bhuiyan NA, Wang XY, Safa A, Sultana M, Chowdhury A, Nair GB, Sack DA, von Seidlein L, Puri MK, Ali M, Chaignat CL, Clemens JD, Barreto A. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43 (6) : 2559-2562.
- [19] Chowdhury A, Ishibashi M, Thiem VD, Tuyet DT, Tung TV, Chien BT, Seidlein LL, Canh DG, Clemens J, Trach DD, Nishibuchi M. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48 (4) : 319-327.
- [20] Mahmud ZH, Neogi SB, Kassa A, Wada T, Islam MS, Nair GB, Ota F. Seaweeds as a reservoir for diverse *Vibrio parahaemolyticus* populations in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 118 (1) : 92-96.
- [21] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B,

- Takeda Y, Sack DA. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20 (1) : 39-48.
- [22] Velazquez-Roman J, Leon-Sicairens N, Flores-Villasenor H, Villafana-Rauda S, Canizalez-Roman A. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (6) : 1794-1803.
- [23] Taniguchi H, Ohta H, Ogawa M, Mizuguchi Y. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162 (2) : 510-515.
- [24] Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, Higashi K, Mizuguchi Y. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*, 1986, 1 (5) : 425-432.
- [25] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of t1, tdh and trh. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36 (3) : 215-225.
- [26] Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L, Ottaviani D, Pruzzo C, Serratore P, Fischetti R, Goffredo E, Loffredo G, Mioni R. Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102 (1) : 229-237.
- [27] Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37 (4) : 1173-1177.
- [28] Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (2) : 681-687.
- [29] Lee CY, Pan SF, Chen CH. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (4) : 1311-1317.
- [30] Yu S, Chen W, Wang D, He X, Zhu X, Shi X. Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the irgB gene identified by comparative genomic analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 307 (1) : 65-71.
- [31] Hossain MT, Kim EY, Kim YR, Kim DG, Kong IS. Application of groEL gene for the species-specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54 (1) : 67-72.
- [32] 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, Iida T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 2003, 361 (9359) : 743-749.
- [33] Liu B, He X, Chen W, Yu S, Shi C, Zhou X, Chen J, Wang D, Shi X. Development of a real time PCR assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. *Protein & Cell*, 2012, 3 (3) : 204-212.
- [34] Nhung PH, Ohkusu K, Miyasaka J, Sun XS, Ezaki T. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to dnaJ gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007, 59 (3) : 271-275.
- [35] Kim SK, Yang JY, Cha J. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene*, 2002, 283 (1-2) : 277-286.
- [36] Luan XY, Chen JX, Zhang XH, Jia JT, Sun FR, Li Y. Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44 (3) : 242-247.
- [37] Han H, Wong HC, Kan B, Guo Z, Zeng X, Yin S, Liu X, Yang R, Zhou D. Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group'. *BMC Genomics*, 2008, 9: 570.
- [38] Atlung T, Ingmer H. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Molecular Microbiology*, 1997, 24 (1) : 7-17.
- [39] No AR, Okada K, Kogure K, Park KS. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR targeted to the histone-like nucleoid structure (H-NS) gene and its genetic characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53 (2) : 127-133.
- [40] Nishibuchi M, Kaper JB. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (tdh) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 1990, 4 (1) :

- 87-99.
- [41] Baba K, Shirai H, Terai A, Takeda Y, Nishibuchi M. Analysis of the tdh gene cloned from a tdh gene- and trh gene-positive strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*, 1991, 35 (3) : 253-258.
- [42] 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. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6 (6) : 477-487.
- [43] 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (8) : 2449-2457.
- [44] Kadhim HM, Miah A, Munn CB, Gilpin ML. Development of a polymerase chain reaction (PCR) test for the detection of virulent forms of *Vibrio parahaemolyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012, 31 (4) : 431-439.
- [45] Lin Z, Kumagai K, Baba K, Mekalanos JJ, Nishibuchi M. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175 (12) : 3844-3855.
- [46] Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Watanabe H. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (7) : 2708-2709.
- [47] 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (6) : 2156-2161.
- [48] Myers ML, Panicker G, Bej AK. PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (4) : 2194-2200.
- [49] Okura M, Osawa R, Iguchi A, Takagi M, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. PCR-based identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* with a novel group-specific primer pair. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48 (10) : 787-790.
- [50] Khan AA, McCarthy S, Wang RF, Cerniglia CE. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6 isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 206 (2) : 209-214.
- [51] Meador CE, Parsons MM, Bopp CA, Gerner-Smith P, Painter JA, Vora GJ. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45 (4) : 1133-1139.
- [52] Williams TL, Musser SM, Nordstrom JL, Depaula A, Monday SR. Identification of a protein biomarker unique to the pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (4) : 1657-1665.
- [53] Okura M, Osawa R, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43 (7) : 3533-3536.
- [54] Hurley CC, Quirke A, Reen FJ, Boyd EF. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics*, 2006, 7: 104.
- [55] Haldar S, Neogi SB, Kogure K, Chatterjee S, Chowdhury N, Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S. Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50 (2) : 146-152.
- [56] Nishibuchi M, Kaper JB. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162 (2) : 558-564.
- [57] 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*. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137 (2) : 253-259.
- [58] Boyd EF, Cohen AL, Naughton LM, Ussery DW, Binnewies TT, Stine OC, Parent MA. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 110.
- [59] Chen Y, Stine OC, Badger JH, Gil AI, Nair GB,

- Nishibuchi M, Fouts DE. Comparative genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*: serotype conversion and virulence. *BMC Genomics*, 2011, 12: 294.
- [60] Gonzalez-Escalona N, Strain EA, De Jesus AJ, Jones JL, Depaola A. Genome sequence of the clinical O4:K12 serotype *Vibrio parahaemolyticus* strain 10329. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (13) : 3405-3406.
- [61] Jensen RV, Depasquale SM, Harbolick EA, Hong T, Kernell AL, Kruchko DH, Modise T, Smith CE, McCarter LL, Stevens AM. Complete genome sequence of pre-pandemic *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP. *Genome Announcements*, 2013, 1 (1) : 00002-12.
- [62] Jun JW, Kim JH, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Park SC. Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* SNUVpS-1 isolated from Korean seafood. *Genome Announcements*, 2013, 1 (1) : 00132-12.
- [63] Liu M, Chen S. Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* V110, isolated from shrimp in Hong Kong. *Genome Announcements*, 2013, 1 (3) : 00300-13.
- [64] Kondo H, Tinwongger S, Proespraiwong P, Mavichak R, Unajak S, Nozaki R, Hirono I. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announcements*, 2014, 2 (2) : 00221-14.
- [65] Gomez-Gil B, Soto-Rodriguez S, Lozano R, Betancourt-Lozano M. Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announcements*, 2014, 2 (2) : 00055-14.

Molecular genetic makers for *Vibrio parahaemolyticus* – A review

Haihong Han^{1,2}, Ning Li^{2*}, Yunchang Guo²

¹Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China

²Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China

Abstract: *Vibrioparahaemolyticus* is an important foodborne pathogen, of which the O3:K6 serotype caused many outbreaks in different countries since 1996. Based on the 10 years data (1992–2001) from China, gastroenteritis caused by *Vibrio parahaemolyticus* accounted for 31.1% of foodborne disease outbreaks that were resulted from microorganisms. Most environmental strains of *Vibrioparahaemolyticus* are non-pathogenic strains. However, clinical strains can produce thermostable direct hemolysin (TDH), TDH-related hemolysin, and other virulence factors. Here we reviewed three commonly used molecular markers for *Vibrioparahaemolyticus*, including species-specific genes, the virulence genes and pandemic group-specific genes, so that to provide references for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* and the identification of its pathogenic factor.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, genetic marker, pandemic group

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant (2012BAK01B02)

* Corresponding author. E-mail: lining_65@163.com

Received: 17 April 2014 / Revised: 16 June 2014