

## Приложение на молекулярно-биологичен метод за идентифициране на *Vibrio parahaemolyticus*

Гергана Крумова-Вълчева\*, Ева Гюрова, Йордан Гогов

Национален Диагностичен Научноизследователски Ветеринарномедицински Институт  
(НДНИВМИ) – София

\*E-mail: dr.krumova\_vulcheva@abv.bg

### Резюме

*Vibrio parahaemolyticus* се изолира често от морски храни и има важна роля в етиологията на хранителните заболявания, протичащи с гастроентерит при хората. Значителна част от патогенните щамове продуцират термостабилен директен хемолизин (TDH) и TDH-свързан хемолизин (TRH), които са кодирани съответно от *tdh*- и *trh*-гени. В това проучване са изследвани 130 съмнителни за *Vibrio parahaemolyticus* изолати, получени от проби живи двучерупчести мекотели (*M. galloprovincialis*). Потвърждаването им е извършено с културални методи и полимеразно-верижна реакция (PCR). Културалните методи включват ISO 21872-1:2007 и биохимично потвърждаване с API 20E. PCR методът е приложен с амплифициране на видово-специфичният *ToxR*-ген и на *tdh*- и *trh*-гените за патогенност. От 130 изследвани изолати в 34 (33 %) и 12 (28 %) са регистрирани положителни резултати за *V. parahaemolyticus*, съответно чрез биохимични и молекулярно-биологични методи. От 12-те проби, положителни за *ToxR*-ген, нито една не е положителна по отношение на патогенните гени (*tdh* и *trh*). При сравнение с техниката на биохимичните тестове използваният PCR протокол е по-бърз и подходящ за рутинна лабораторна диагностика на *V. parahaemolyticus* в двучерупчестите мекотели.

**Ключови думи:** *Vibrio parahaemolyticus*, живи двучерупчести мекотели, PCR

## Application of Molecular-Biological Methods for Identification of *Vibrio parahaemolyticus*

Gergana Krumova-Valcheva\*, Eva Gyurova, Yordan Gogov

National Diagnostic and Research Veterinary Medicine Institute (NDRVMI) – Sofia

\*E-mail: dr.krumova\_vulcheva@abv.bg

**Citation:** Krumova-Valcheva, G., Gyurova, E., Gogov, Y. (2019). Application of molecular-biological methods for identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Zhivotnovadni Nauki*, 56(2), 51-58 (Bg).

### Abstract

*Vibrio parahaemolyticus* was isolated from sea foods and it is responsible for the appearance of gastroenteritis in humans. Most of the pathogenic strains produce thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) which are encoded by *trh* and *tdh* genes respectively. In this study were tested 130 suspected *Vibrio parahaemolyticus* strains, previously isolated from live bivalve mollusks (*M. galloprovincialis*). Their confirmation was done by culture method and Polymerase-Chain Reaction (PCR). The culture methods included ISO 21872-1:2007 and the biochemical

confirmation was carried out with API 20E. The PCR-method was performed by amplification of the *V. parahaemolyticus* specific *ToxR*-gene and the genes *tdh* and *trh*, responsible for pathogenicity. Out of 130 tested isolates only 34 (33%) gave a positive results for *Vibrio parahaemolyticus* by biochemical approach. The molecular-biological methods confirmed that 12 (28%) of the 34 biochemical-positive strains were positive for the presence of the *ToxR* gene. None of them were positive for the presence of pathogenic genes (*tdh* and *trh*).

Compared to the biochemical methods, PCR approach is more rapid and reliable for routine laboratory diagnosis of *V. parahaemolyticus* in shellfish.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*, live bivalve mollusks, PCR

### Увод

*Vibrio parahaemolyticus* е част от естествената микрофлора на устийните и крайбрежни морски води и е честа находка в морски храни. За първи път е описан като причинител на стомашно-чревно заболяване в Япония през 1951 г. (Fujino et al., 1951), а по-късно е изолиран в САЩ от Baross и Liston (1968 г.) при изследване на води от устията на реки (Baross, J. and J. Liston, 1968). Въпреки че *V. parahaemolyticus* е широко разпространен в морската среда, заболявания се наблюдават само след приемане на инфекциозна доза от  $10^4$  CFU (FDA, 2004). Хранителните инфекции, причинени от тези микроорганизми, протичат със симптоми на гастроентерит и са свързани предимно с консумация на сурови или недостатъчно термично обработени риби и двучерупчести мекотели.

Хранителни отравяния, свързани с *V. parahaemolyticus*, са докладвани най-често в страни с висока температура на морската вода и традиционно консумиране на сурови морски дарове (Martinez-Urtaza et al., 2004, Ottaviani et al., 2005). Съществуват все повече данни за появата на гастроентерити, причинени от *V. parahaemolyticus* от стриди и миди и от по-хладните морета на Северна Европа и Америка (Martinez-Urtaza et al., 2008). Поради тази тенденция Научният комитет по ветеринарни мерки, отнасящи се до здравето на хората (SCVPH) прие становище относно *Vibrio vulnificus* и *Vibrio parahaemolyticus*. Наличните в момента научни данни не изискват

специфични критерии за патогенни вибриони в морски храни. Препоръчва се съставяне на практически кодекси, за да се гарантира прилагането на добра хигиенна практика.

Значителна част от изследванията върху *V. parahaemolyticus* са посветени на методите за изолиране и диференциране, които се основават на специфичните им културални свойства върху селективни хранителни среди. (ISO/TS 21872-1:2007), последвани от биохимична идентификация на изолираните щамове. Основните тестове, препоръчвани от различни автори, включват аргинин-дихидролаза, лизин-декарбоксилаза и орнитин-декарбоксилаза (Crocì et al., 2001, Ottaviani et al., 2003), които са представени в готовите търговски тестове API 20 и API 20NE (O'Naga et al., 2003).

Тези методи се използват за рутинно изолиране на *V. parahaemolyticus* от клинични материали и храни, но често са с ниска дискриминативност, бавни и в кръстосано-положителни реакции с други оксидазо-положителни бактерии. В преобладаващите лабораторни техники са включени етапи на предобогатяване, което допълнително удължава времето за изпитване. Поради това O'Naga et al. (2003) предлагат идентификацията на изолатите да се извършва и с допълнителни потвърждаващи методи, какъвто е полимерно-верижната реакция (PCR). При тях освен намаляване на времето за изпитване се създава и възможност за разграничаване на патогенните от непатогенни щамове (Zulkifli et al., 2009).

Редица научни колективи съобщават за прилагане на молекулярно-биологичните техники в диагностиката на *Vibrio parahaemolyticus*, базирайки се на наличие на видово специфичния *ToxR*-ген (Crosi et al., 2007; Kim et al., 1999). В изследванията си Kim et al. (1999) потвърждават 373 щاما *Vibrio parahaemolyticus*, от които 47 са с нетипични биохимични свойства.

При диференцирането на *V. parahaemolyticus* е много важно да се установи неговата патогенност, за да се оцени реалният риск за човешкото здраве при наличието им в храните. Vej et al. (1999) препоръчват след биохимичната и *ToxR* идентификация на изолатите да се извърши детекция за наличие на патогенните гени: *tdh* (термостабилен директен хемолизин) и *trh* (термостабилен свързан хемолизин).

Целта на това проучване е да се направи оценка на молекулярно-биологичните методи за установяване на *V. parahaemolyticus* в двучерупчестите мекотели (*Mytillus galloprovincialis*), като се използват стандартните културални методи и биохимично потвърждаване с API 20E. Получените PCR резултати за наличие на *ToxR* гена са сравнени с биохимично потвърдените изолати от *V. parahaemolyticus* в миди. Приложено е и допълнително проучване върху патогенността им чрез доказване на присъствието на *tdh*- и *trh*-гени в тях.

## Материал и методи

**Проби:** изследвани са 89 проби живи култивирани миди (*M. galloprovincialis*), отглеждани в българските води на Черно море. Всяка проба се състои от пул, съдържащ не по-малко от 10 отделни живи миди.

Пробите са транспортирани в термоизолирани контейнери при 4 °C. Микробиологичните изпитвания са проведени до 24 h след постъпването им в лабораторията.

Общо 130 изолата, получени от изследваните проби миди, са проучени с биохимични и молекулярно-биологични методи

за доказване принадлежността им към *V. parahaemolyticus*.

**Културални и биохимични методи:** за всяка проба, тестова порция от 25 g месо и вътречерупкова течност е анализирана в съответствие с процедурите, описани в ISO/TS 21872-1:2007. При растеж на съмнителни колонии за *Vibrio spp.* същите са препосявани върху солен агар и изпитвани по микроскопски и фенотипни показатели. За биохимично потвърждаване са използвани готови търговски китове API 20E (bioMerieux).

**Молекулярно-биологични методи:** потвърдените като *V. parahaemolyticus* изолати са подложени на изследване с PCR методи.

За изолиране на бактериалната ДНК е приложен Протокол на Европейската референтна лаборатория за бактериални и вирусни контаминанти в двучерупчести мекотели (CEFAS, Weymouth).

След получаване на чисти култури е изолирана ДНК. От биохимично потвърдени изолати на *Vibrio spp.* е приготвяна бактериална суспензия в 500 µl стерилна двойнодестилирана вода, загрята на 95 °C за 5 min. Охладената суспензия е центрофугирана при 10 000 оборота за няколко секунди. В получената супернатанта се съдържа освободената от бактериалните клетки ДНК.

Биохимично потвърдените щамове са подложени на молекулярно-биологичен тест, основаващ се на PCR, за доказване наличието на общия за *V. parahaemolyticus* *ToxR* ген и гените, определящи патогенността – *tdh* и *trh*.

PCR амплификацията е проведена в 50 µl реакционен обем, включващ 47,5 µl мастермикс (реакционен буфер, 5 µl 25 mM магнезиев хлорид, 0,625 µl 20 mM dNTPs, 0,5 µl прав (Forward) праймер, 0,5 µl обратен (Reverse) праймер, 30,625 µl стерилна двойнодестилирана вода, 0,25 µl 5 U/µl TaqPol и 2,5 µl от изолираната ДНК.

За доказване присъствието на посочените гени са използвани три двойки праймери, чиято секвенция е представена в табл. 1.

Полимеразната верижна реакция е проведена в термоциклер Techne TC 412 (Techne).

**Таблица 1.** Нуклеотидна последователност на използваните праймери**Table 1.** Nucleotide sequence of the used primers

Вид микроорганизъм Species	Таргетен ген Target gene	Нуклеотидна последователност (5' – 3') Primer sequence	Размер на ампликона Fragment size	Източник Reference
<i>V. parahaemolyticus</i>	ToxR	GTCTTCTGACGCAATCGTTG ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	368 bp	Kim et al. (1999)
	tdh	GTAAGGTCTCTGACTTTTGGAC TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC	269 bp	Nishibuchi and Kaper (1985)
	trh	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	500 bp	Honda and Iida (1993)

Забележка: Праймерите, използвани в изследването са с работна концентрация 100 µM.

Note: Primer sequences used in the study were in 100 µM work concentration.

Амплификацията на гените *ToxR*, *tdh* и *trh* е проведена съгласно условията, описани в Протокол на Европейската референтна лаборатория за бактериални и вирусни контаминанти в двучерупчести мекотели (CEFAS, Weymouth).

Наличието на амплифицирани ДНК фрагменти е потвърдено чрез провеждане на хоризонтална електрофореза на 2 % агарозен гел (SeaKem Agarose) в 1X TAE-буфер (0,04 M Tris; 0,02 M Acetic Acid; 0,002 M Na<sub>2</sub>EDTA) при 130 V, за 45 min в 8 µl PCR продукт.

Оцветяването на гела е проведено в разтвор на етидиев бромид (1 µg/ml) за 20 min и наблюдаван с UV светлина (>2500 µW/cm<sup>3</sup>).

Като маркер за определяне дължината на амплифицираните ДНК фрагменти е използван маркер 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas).

### Резултати и обсъждане

Резултатите от проучванията върху биохимичната характеристика на 130 изолата *Vibrio spp.* с API 20E са посочени в табл. 2.

Данните от изследванията на 130 изолата *Vibrio spp.* по показателите отнасяне по Грам, подвижност, оксидаза и халотолерантност, както и биохимичната им характеристика

с API 20E показват характерен биохимичен профил за *V. parahaemolyticus* само при 43 от тях, по един съответно за *V. cholerae* и *V. mimicus* и при 3 – за *V. alginolyticus*. Осемдесет и два от изолатите не са определени до вид, отнасящ се към р. *Vibrio*.

Потвърдените щамове *V. parahaemolyticus* чрез системата API 20E демонстрират характерни биохимични профили: 417116, 4347116 и 4147106.

Получените данни са в съгласие с резултатите на Hervio-Heath et al. (2002). Авторите съобщават за по-често изолиране на *V. alginolyticus* (60%), следван от *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* и *V. mimicus* и идентифицирането им със системата API 20E. Част от изолатите не се идентифицират като вид, отнасящ се към групата на вибрионите.

Други изследователи (Pujalte et al., 1999) изтъкват, че всички изолати на вибриони от TCBS-агар, които не разграждат захарозата се отнасят към вида *V. parahaemolyticus*.

Биохимичните показатели, включени в системата API-20E формират специфични биохимични профили, подпомагащи видовата идентификация на вибрионите. Анализирайки получените данни и становища на други автори стигаме до извода, че използването на API система за видово идентифициране е сравнително точна, бърза и подходяща



**Таблица 2.** Характеристика на 130 щама *Vibrio spp.*, изолирани от живи миди със системата API 20E.  
**Table 2.** Characteristic of 130 strains of *Vibrio spp.*, isolated from live bivalve mollusks with API 20E system.

Вид Species	Opt broth total	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOP	RNA	SAC	MEL	AMY	ARA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	43	0	0	43	5	0	0	0	42	43	40	43	43	43	0	0	43	0	0	0	34
<i>Vibrio mimicus</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3	0	0	3	3	3	0	0	0	3	0	3	3	3	0	0	0	3	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	121	121
Неопределени щамове Unidentified strains	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Забележка: В числител е показан броя на положително реагиращите щамове, а в знаменател – на отрицателните.  
 Note: The numerator shows a number of the positive strains, and in the denominator – of the negative strains

ща за изпълнение в лабораторната практика (Popovic et al., 2007).

Всички 43 изолата, показващи биохимичен профил на *V. parahaemolyticus* със системата API 20E, са изследвани за наличие на *ToxR* ген и гените, определящи патогенността – *trh* и *tdh*. Резултатите са отразени в табл. 3.

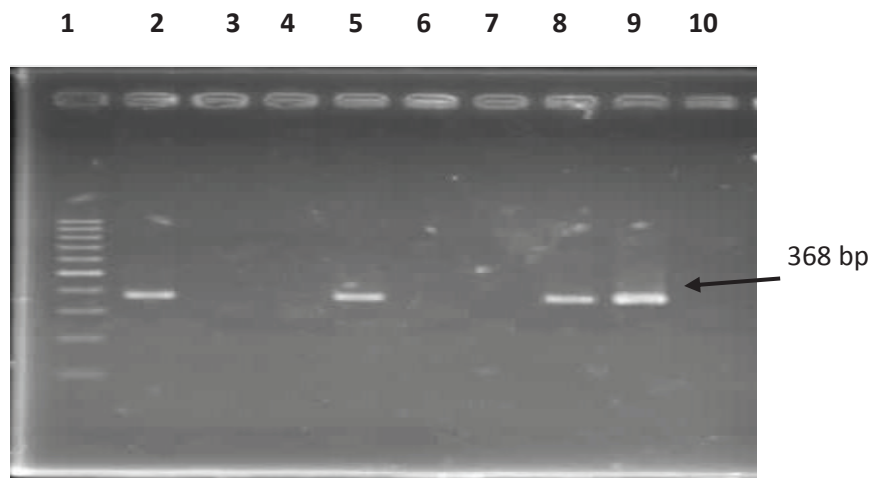
Използването на ДНК от контролен щам *V. parahaemolyticus* EURL V05/14 показва, че PCR реакциите за доказване присъствието на *tdh* и *trh* гените са оптимизирани и достатъчно надеждни за идентификацията им в изолираните в това изследване *V. parahaemolyticus* щамове от морски двучерупчести мекотели. Положителната контрола генерира продукти с очакваните дължини – 269 и 500 bp.

От проучените 43 изолата 12 продуцират ампликони с дължина 368 bp при използване на специфичните праймери за *ToxR*-гена, които са идентични с този на положителната контрола (*V. parahaemolyticus* EURL V05/14) (фиг. 1). Rojas et al., 2011 доказват наличие на *ToxR*-ген чрез праймери с еднаква нуклеотидна последователност при всички 90 изследвани щамове. Пет от тях са потвърдени като *ToxR*-положителни, но с атипични биохимични свойства. Подобни резултати са получени от Dileep et al. (2003) и Fabro et al. (2010), които идентифицират *V. parahaemolyticus* на база на *ToxR*-ген. Dileep et al. (2003) определят *V. parahaemolyticus* чрез *ToxR*-ген в 28 от 32 изолата с атипични биохимични отнасяния. Fabro et al. (2010) доказват наличие на *ToxR*-ген в 21 от изследваните щамове. Само 19 от тях са потвърдени като *V. parahaemolyticus* и по двата метода – биохимично и молекулярно-биологично. Подобни са и данните, докладвани от Nelapati и Krishnaiah, които доказват положителни за *V. parahaemolyticus* проби в 28,6% при използване на културални методи и при 37,1% при използване на PCR базирани методи за откриване на *ToxR*-генът.

Термостабилният директен хемолизин (TDH) и термостабилният свързан хемолизин (TRH) се определят като основни фактори за патогенността на *V. parahaemolyticus*. В повечето теренни щамове обаче те не се от-

**Таблица 3.** Наличие на специфични за *V. parahaemolyticus* гени.**Table 3.** Presence of specific *V. parahaemolyticus* genes.

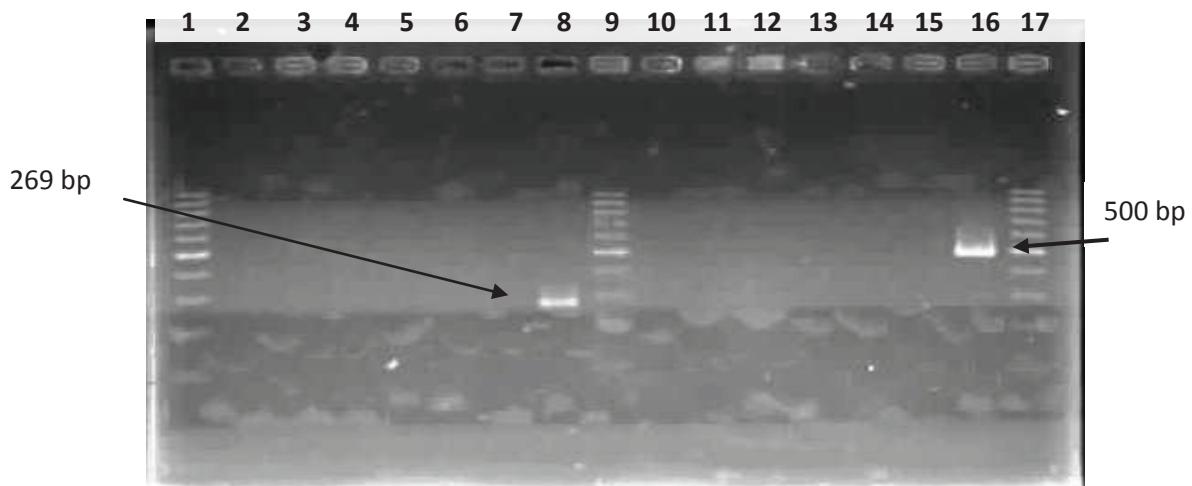
Вид Species	Брой изолати, изолирани от живи миди Number of isolates from live mussels	Положителни за toxR-ген Positive for toxR-gene	Положителни за tdh-ген Positive for tdh-gene	Положителни за trh-ген Positive for trh-gene
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	43	12	0	0

**Фиг. 1.** PCR. Наличие на *ToxR*-ген във *V. parahaemolyticus* от живи миди.

Легенда: 1 – маркер (100 bp ДНК стълбица); 2, 5 и 8 – *V. parahaemolyticus* потвърден изолат; 10 – PCR-отрицателна контрола (стерилна двойно дестилирана вода); 9 – PCR-положителна контрола (ДНК, съдържаща *ToxR*-ген).

**Fig. 1.** PCR. Presence of *ToxR*-gene in *V. parahaemolyticus* from live mussels.

Legend: 1 – marker (100 bp DNA Ladder); 2, 5 and 8 – *V. parahaemolyticus* confirmed isolate; 10 – PCR-negative control (sterile double distilled water); 9 – PCR-positive control (DNA containing *ToxR*-gene).

**Фиг. 2.** PCR. Наличие на гени, отговорни за патогенността в щамове *V. parahaemolyticus* от живи миди.

Легенда: 1, 9 и 17 – маркер (100 bp ДНК стълбица); 8 – PCR-положителна контрола (ДНК, съдържаща *tdh* ген); 16 – PCR-положителна контрола (ДНК, съдържаща *trh* ген), 7 и 15 – PCR-отрицателна контрола (стерилна двойно дестилирана вода);

**Fig. 2.** PCR. Presence of pathogenic genes in *V. parahaemolyticus* strains from live mussels.

Legend: 1, 9 and 17 – marker (100 bp Ladder); 8 – PCR-positive control (DNA, containing *tdh*-gene); 16 – PCR-positive control (DNA, containing *trh* gene); 7 and 15 – PCR-negative controls (sterile double distilled water).

криват или се срещат много ограничено сред щамове, изолирани от храни.

Присъствие на *tdh* и *trh* гени не е доказано в изследваните от нас щамове (табл. 3). Наличие на двата гена (с дължини на ампликоните съответно 269 и 500 bp) не се установява след проведената агарозна електрофореза с изключение на положителната контрола (*V. parahaemolyticus* EURL V05/14) (фиг. 2). Тези резултати са в съответствие с предишни проучвания, свързани с липса или много слабо присъствие на *tdh*- и *trh*- гени в двучерупчести мекотели (Hervio-Heath et al., 2002; Dileep et al., 2003). Fabbro et al. (2010) докладват наличие само на *trh*-гена в 3 от 21 *ToxR*-положителни проби.

За разлика от цитираните автори Nelapati and Krishnaiah (2010) доказват наличие на *tdh*-положителни *V. parahaemolyticus* в 9 от 39 изследвани проби, *trh*-положителни в 28 проби и на двата гена за патогенност в 3 от изследваните проби.

Представените данни от нашето проучване подчертават вариабилността и несигурността на получените с културални и биохимични методи резултати за наличие на *V. parahaemolyticus* в двучерупчестите мекотели. Приложените молекулярни методи за откриване на видово-специфичния *ToxR*-ген и доказване на патогенните гени в изолираните щамове могат да бъдат приложими при мониторинга на този микроорганизъм. Поради това се препоръчва необходимостта от конкретен план за наблюдение в областта на производството на двучерупчести мекотели, за да се оценят по-добре реалните опасности за общественото здраве.

### Изводи

Прилагането на рутинните културални и биохимични методи за доказване на *V. parahaemolyticus* изисква повече време и разход на голям набор хранителни среди, като често се получават фалшиво-положителни или фалшиво-отрицателни резултати.

Доказано е наличие на *ToxR*-ген в 12 от изследваните 43 щамове *V. parahaemolyticus* на основата на полимеразно-верижна реакция (PCR).

В нито един от доказаните *V. parahaemolyticus* не се откриват *tdh*- и *trh*- патогенните гени.

PCR методът е подходящ, бърз и лесно приложим в рутинната диагностична практика за идентифициране на *V. parahaemolyticus*.

### Литература

- Baross, J., & Liston, J. (1968). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature*, 217(5135), 1263.
- Baross, J., & Liston, J. (1968). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature*, 217(5135), 1263.
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C., Jones, D. D., & Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of microbiological methods*, 36(3), 215-225.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredini, E., & Toti, L. (2001). Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Letters in Applied Microbiology*, 32(1), 57-61.
- Dileep, V., Kumar, H. S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2003). Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology*, 36(6), 423-427.
- Fabbro, C., Cataletto, B., & Del Negro, P. (2010). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* through biochemical and molecular-based methodologies in coastal waters of the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *FEMS microbiology letters*, 307(2), 158-164.
- Fujino, T., D. Okuno, A. Nakada, K. Aoyama, M. Fukai, T. Ueho. (1951). On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *J. Jpn. Assoc. Infect. Disease*, 35, 11-12.
- Hervio-Heath, D., Colwell, R. R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J. M., & Pommepuy, M. (2002). Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of applied microbiology*, 92(6), 1123-1135.
- Kim, Y. B., Okuda, J. U. N., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., & Nishibuchi, M. (1999).

Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1173-1177.

**Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., DePaola, A., Ishibashi, M., Shimada, K., Nishibuchi, M., & Liebana, E.** (2004). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4672-4678.

**Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y., & Garcia-Martin, O.** (2008). Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(1), 265-274.

**Nelapati, S., & Krishnaiah, N.** (2010). Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by Polymerase chain reaction using *toxR*, *tdh* and *trh* genes. *Veterinary World*, 3(6), 268-271.

**O'Hara, C. M., Sowers, E. G., Bopp, C. A., Duda, S. B., & Strockbine, N. A.** (2003). Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae. *Journal of clinical microbiology*, 41(12), 5654-5659.

**Ottaviani, D., Masini, L., & Bacchiocchi, S.** (2003). A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of *Vibrio* in seafood. *Journal of applied microbiology*, 95(6), 1277-1284.

**Ottaviani, D., Santarelli, S., Bacchiocchi, S., Masini, L., Ghittino, C., & Bacchiocchi, I.** (2005). Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels

from the Adriatic Sea, Italy. *Food Microbiology*, 22(6), 585-590.

**Topić Popović, N., Čož-Rakovac, R., & Strunjak-Perović, I.** (2007). Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria. *Veterinarni Medicina*. 52 (2), 49-53.

**Pujalte, M. J., Ortigosa, M., Macián, M. C., & Garay, E.** (1999). Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *International Microbiology*, 2(4), 259-266.

**Rojas, M. V. R., Matté, M. H., Dropa, M., Silva, M. L. D., & Matté, G. R.** (2011). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 53(4), 201-205.

**Zulkifli, Y., Alitheen, N. B., Son, R., Yeap, S. K., Lesley, M. B., & Raha, A. R.** (2009). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes. *International Food Research Journal*, 16, 289-296.

**Food and Drug Administration (FDA)** (2005). Centre for Food safety and Applied Nutrition. Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/acrobat/vpra.pdf>. Accessed 15<sup>th</sup> July 2010.

**International Organization for Standardization.** (2007). ISO/TS 21872-1: 2007: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*.