pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 39, No. 3, pp. 231~238 (2024)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2024.39.3.231

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

유통 수산물에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus*의 항생제 내성 및 전장 유전체 분석을 통한 유전적 특성 분석

송경규[1] · 조현우[2] · 김연아[3] · 장범순[2] · 이미루[2] · 박건택[1,2]*

[1]인제대학교 BNIT융합대학 의생명공학과
[2]인제대학교 일반대학원 생명과학과
[3]인제대학교 일반대학원 디지털항노화헬스케어학과

Whole-Genome Sequencing-based Antimicrobial Resistance and Genetic Profile Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Seafood in Korea

Gyeong Gyu Song[1], Hyeonwoo Cho[2], Yeona Kim[3], Beomsoon Jang[2], Miru Lee[2], Kun Taek Park[1,2]*

[1]*Department of Biotechnology, Inje University, Gimhae, Korea*
[2]*Department of Biological Sciences, Inje University, Gimhae, Korea*
[3]*Digital Anti-aging and Healthcare, Inje University, Gimhae, Korea*

(Received May 12, 2024/Accepted May 28, 2024)

ABSTRACT - *Vibrio parahaemolyticus* is a major seafood-borne pathogen commonly detected in marine environments. In Korea, *V. parahaemolyticus*-induced foodborne illnesses account for 7.5% of bacterial pathogen-related food poisonings. Moreover, the amount of antimicrobial agents used in aquatic cultures is continuously increasing. In this study, we isolated *V. parahaemolyticus* from seafood samples and performed antimicrobial susceptibility tests using the microbroth dilution method. Furthermore, using whole-genome sequencing, we identified antimicrobial resistance genes, virulence genes, and sequence types (STs). We could isolate *V. parahaemolyticus* from 47 (59.5%) of the 79 seafood samples we purchased from retail markets in Seoul and Chungcheong provinces. Antimicrobial susceptibility tests revealed that 2 and all of the 47 isolates were ampicillin-resistant (4.3%) and susceptible to all tested antimicrobial agents (100%), respectively. The genotype analysis revealed that all isolates carried beta-lactam-, tetracycline-, and chloramphenicol-associated antimicrobial resistance genes. However, we could detect fosfomycin resistance only in one isolate. Concerning the virulence genes, we detected T3SS1 and T3SS2-associated genes in all and one isolate, respectively. However, we could not detect the *tdh* and *trh* genes. Of the 47 isolates, 17 belonged to 15 different STs, including ST 658 with 3 isolates. The rest 30 isolates were identified as 25 new STs. The results of this study support the need for operating a continuous monitoring system to prevent foodborne illnesses and the spread of antimicrobial resistance genes in *V. parahaemolyticus*.

Key words: *V. parahaemolyticus*, Antimicrobial resistance, Whole genome sequencing, Virulence gene, Multi-locus sequence typing

*Vibrio parahaemolyticus*는 하구 및 해수 등의 해양 환경에 주로 서식하며, 운동성이 있는 그람 음성, 호염성 간균이다. 주로 오염된 수산물의 생식 및 불충분한 가열 등의 조리 방식으로 섭취할 시 감염되며, 드물게는 상처 접촉 및 귀를 통해 감염되는 식중독 원인균이다[1]. 해수 온도가 15°C 이상일 때, 활발히 활동하며, 이러한 특성에 따라 여름철에는 해양 생태계 내에 높은 균밀도를 차지한다[2]. 식품의약품안전처 식품안전정보포털에 기재된 식중독 사고 통계에 따르면, 최근 10년간 전체 세균성 식중독 사고 중 *V. parahaemolyticus* 감염에 의한 보고는 7.5%를 차지하였으며, 여름철에 집중적으로 발생하였다[3].

최근 10년간(2013-2022년) 국내 수산 양식 분야 항생제 판매 비율은 국내 농축수산물 분야 전체 판매량의 17-27%

*Correspondence to: Kun Taek Park, Department of Biological Sciences, Inje University, Gimhae 50834, Korea
Tel: +82-55-320-3213, Fax: +82-55-336-7706
E-mail: ktpark@inje.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

해당되며, 이러한 많은 판매량은 수산 양식 분야 높은 항생제 사용량을 의미한다. 최근 3년간(2020-2022년) 전체 축·수산물 항생제 판매량에 기준한 수산 양식의 항생제 판매량 비율은 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 tetracycline계, β-lactam계 및 fluoroquinolone계 등의 항생제가 주로 판매된다[4]. 이에 따라, 해마다 세 종류의 항생제에 대해 내성을 보이는 다제내성균의 비율 또한 증가하고 있는 추세이다[5].

세균의 항생제 내성 기작은 세포막의 투과성 변화, 유전자의 항생 목표 물질의 변화, efflux pump를 통한 세포 외에 항생제 분출 및 세포 내에 제한효소를 비롯한 효소 또는 일정 화학적 반응을 통한 항생제 불활성화 등이며, 단독 혹은 복합적으로 사용되어 세균의 내성 획득에 기여한다[6]. 이는 chromosome DNA 및 plasmid DNA 등에 존재하는 세균의 항생제 내성 유전자의 여부로 인해 발현될 수 있으며, 이러한 내성은 항생제 내성 유전자를 지니는 plasmid, integron 및 transposon의 수평적 유전자 이동으로 동종 및 이종 간의 전파될 수 있다[7].

*V. parahaemolyticus*의 주요 병원성 유전자로는 thermostable direct hemolysin (*tdh*), TDH-related hemolysin (*trh*) 및 각각 세포독성, 장내독성을 유발하는 type III secretion system I, II (T3SS1, 2)를 통해 분비되는 여러 effector 등이 존재한다[8]. *tdh*와 *trh*의 경우, 해수와 어패류 등의 환경 분리주에서는 대부분 확인되지 않는 것으로 보고되어 있으나, 임상 분리주로부터는 대부분 확인되는 것으로 보고되어 있다[9]. T3SS1의 경우, 환경 및 임상으로부터 분리한 대부분의 *V. parahaemolyticus*로부터 확인되나, T3SS2의 경우, 임상 분리주에서 대부분 확인된다[8,10].

우리나라의 경우, 최근 3년간 *V. parahaemolyticus*로 인한 식중독 보고율이 점차 줄어드는 추세를 보이며, 식품 관련 위생수준이 향상되고 있는 상황이나, 패류를 포함한 수산물에 대한 접근성 및 식습관과 수산물 판매량이 증가하고 있는 현재 추세를 고려하였을 때, *V. parahaemolyticus*에 대한 위험성은 상당히 높다. 따라서 유전학적 계통 및 유전적 특성을 포함한 수산물 내에 *V. parahaemolyticus*의 유전적 정보 파악 또한 식품위생안전에 중요한 부분이라 사료된다.

따라서, 본 연구는 서울-경기도 및 충청도에서 유통되고 있는 수산물에서 분리한 *V. parahaemolyticus*의 분포, 항생제 내성 양상 파악, 전장 유전체 분석을 통한 유전적 특성 파악 및 유전학적 계통 조사를 진행하였다.

Materials and Methods

시료 수집

*V. parahaemolyticus*를 수집하기 위해 서울-경기도 및 충청도에 위치한 대형마트로부터 2023년도 4-7월 중 시료를 구입하였으며, 바지락(*Venerupis philippinarum*) 28건, 홍합(*Mytilus coruscus*) 21건, 모시조개(*Cyclina sinensis*) 8건, 동죽(*Mactra veneriformis*) 6건, 백합(*Arctica islandica*) 6건, 전복(*Haliotis*) 6건, 피조개(*Anadara broughtonii*) 4건, 총 79건의 패류 시료를 수집하였다. 구입한 시료는 아이스박스에 담아 냉장 상태를 유지하여, 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

*Vibrio parahaemolyticus*의 분리 및 동정

*V. parahaemolyticus*를 분리하기 위해 시료 25 g을 buffered peptone water (BPW, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 225 mL와 혼합한 후, 연육과 조가비를 함께 파쇄하여 균질화 시켰다. 그 후 shaking incubator에서 37°C, 100 rpm의 조건으로 18-24시간 배양하였다. 증균시킨 시료는 CHROMagar™ Vibrio (CHROMagar Microbiology, Paris, France)에 획선 도말하여, 37°C에 18-24시간 배양 후, *V. parahaemolyticus*로 추정되는 집락을 선택하였다. 선택한 집락은 blood agar plate (BAP, Asan Pharm Co., Whasung, Korea)에 획선 도말하여 37°C에 18-24시간 배양 후, 순수 분리균을 얻었다. 분리균 혼탁액을 10분간 100°C에 가열 후, 원심분리한 상층액을 채집하여 DNA 시료를 획득하였다[11], 분리균을 동정하기 위해 식중독 원인조사 시험법(2022)에 기재되어 있는 primer 및 조건을 사용하여 PCR을 진행하였다[12]. PCR 산물은 2% agarose gel을 사용하여 110 V에 15분간 전기 영동을 진행하여 확인하였다.

항생제 감수성 검사

분리 균주는 Sensititre™ KRNV6F Kit (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA)를 이용하여 microbroth dilution method로 항생제 내성 검사를 진행하였다. Gentamicin (GEN), streptomycin (STR), chloramphenicol (CHL), meropenem (MEM), cefoxitin (FOX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), amoxicillin/clavulanic acid (AUG2), ampicillin (AMP), colistin (COL), nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), sulfisoxazole (FIS), tetracycline (TET)을 포함한 16종의 항생제에 대한 감수성을 조사하였으며, 표준 균주로는 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다. 분리 균주의 최소억제농도에 따른 감수성 판별은 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2018)에 조건을 참고하였다[13]. 내성 판별 기준이 기재되어 있지 않은 항생제인 colistin (COL), nalidixic acid (NAL), sulfisoxazole (FIS) 및 streptomycin (STR)은 MIC_{50}, MIC_{90} 값을 확인하였다.

전장 유전체 서열 제작 및 분석

분리 균주는 ConnectaGen Inc (Seoul, Korea)사에 의뢰하여 전장 유전체 서열 분석을 진행하였다. Raw data는

Trimmomatic 및 SPAdes를 이용하여 분리 균주 별 draft genome sequence를 얻었다[14,15]. DNA 추출은 iDetect® gDNA Prep Kit for Microbes (ConnectaGen Inc)을 이용하였으며, DNA의 integrity는 Agilent 4200 Tapestation로 확인하였다. DNA fragmentation은 Qsonica 800 R2 instrument를 사용하여 진행하였으며, 350bp의 fragments는 Illumina를 이용하여 ligation을 진행 후, PCR를 이용하여 증폭하였다. Library는 TapeStation 4200 instrument (Agilent Technologies, CA, USA) 및 KAPA Library Quantification Kit (KK4824, Kapa Biosystems, MA, USA)를 이용하여 정량화 하였으며, 최종적으로 생성된 library는 cluster 생성을 위해 Illumina flow cell에 적용 후, Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) sequencer로 150bp 양방향 reading을 사용해 sequencing하여 raw data를 얻었다[16].

유전적 특성 분석으로 항생제 내성 유전자, 병원성 유전자 및 *in silico* MLST를 분석하였으며, 분석에는 AMRFinderPlus, Virulence Factor Database (VFDB) 및 PubMLST (https://pubmlst.org/organisms/vibrio-parahaemolyticus)를 사용하였다[17-19]. Sequence 비교 분석 시에는 80% 초과의 일치율(Identity %>80%)을 충족하는 유전자를 대상으로 분석을 진행하였다.

Results and Discussion

*Vibrio parahaemolyticus*의 분리 양상

대형마트에서 유통되고 있는 패류 시료 79건으로부터 47건(59.5%)에서 *V. parahaemolyticus*가 분리되었으며, 서울 지역에서는 피조개 2건, 충청 지역에서는 전복을 제외한 패류 45건에서 확인되었다(Table 1). 최근 보고된 국내 연구를 보면, Park 등[20]은 2013년 – 2016년 수집한 패류 시료 366건 중 80건(21.9%)에서 *V. parahaemolyticus*를 분리하였고, Jeong 등[21]에 따르면 2020년 수집한 패류 시료 163건 중 73건(44.8%)에서 *V. parahaemolyticus*가 검출되었다고 보고하였다. 따라서 최근 연구와 본 연구 결과를 고려했을 때, 국내 패류에서 *V. parahaemolyticus*의 오염도가 10년 새 증가하고 있음을 알 수 있다. 외국의 경우, Hu 등[22]에 따르면 중국에서 판매되는 패류 시료 112건 중 28건(25.0%), Tran 등[23]에 따르면 베트남에서 판매되는 패류 시료 298건 중 260건(87.2%)에서 *V. parahaemolyticus*가 검출되었다고 보고하였다. 비록 시료의 신선도, 균질화 과정 및 분리법의 차이에 따라 분리율의 차이가 있을 수는 있으나, 국내외 연구 결과를 고려했을 때, 패류에서 *V. parahaemolyticus* 오염도가 매우 높음을 알 수 있다. 따라서, 패류의 유통량이 증가하고 있는 최근 추세를 고려했을 때 지속적인 *V. parahaemolyticus*에 대한 모니터링과 섭취시의 주의가 필요할 것으로 사료된다[4,24].

분리 균주의 항생제 내성 양상

항생제 감수성 결과, 분리 균주 47주 중 ampicillin에 2주(4.3%)가 내성을 보였으며, 이외 나머지 항생제에 대해서는 모두 감수성을 보였다(Table 2). 이전 국내 *V. parahaemolyticus*에 대한 항생제 내성 연구를 보면, Yu 등[25]의 연구에서 바지락 시료에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 307균주 중 ampicillin 내성 188균주(61.0%), trimethoprim 내성 16균주(5.2%), streptomycin 내성 9균주(2.9%)가 보고되었고, Kim 등[26]은 해산물 시료에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 65균주 중 ampicillin 내성 63균주(96.9%), amikacin 내성 19균주(29.2%), tetracycline 내성 18균주(27.7%)를 보고하였다. 이러한 이전 보고들에 비해 본 연구에서 나타나는 항생제 내성률은 상당히 큰 차이를 보인다. 이러한 차이점은 아마도 각각의 연구에서 사용한 항생제 감수성 검사법과 적용된 기준의 차이로 설명될 수 있을 것이다. Yu 등[25]과 Kim 등[26]의 연구에서는 Disk Diffusion Susceptibility Test법을 National Committee for Clinical Laboratory Standards 1991년 발간편을 기준으로 판단하였으나, 본 연구에서는 상업적 키트를 이용하여 Broth Microdilution 방법에 의한 MIC를 측정하였고 최신 버전의 CLSI 2018년 발간편을 기준으로 판단하였다. 실제로 최근 수행된 Mok 등[27]의 연구에서는 본 연구에서 사용한 동일한 상업적 키트를 사용하여 국내 해안가 수산 양식장 어패류에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 89균주에 대해 MIC 값을 측정한 결과 ampicillin에 대해

Table 1. Isolation of *V. parahaemolyticus* from various shellfish samples

Sample source	No. of samples	No. of isolates	Isolation rate (%)
V. philippinarum	28	22	78.6
M. coruscus	21	8	38.1
C. sinensis	8	8	100
M. veneriformis	6	6	100
A. islandica	6	1	16.7
Haliotis	6	0	0
A. broughtonii	4	2	50
Total	79	47	59.5

Table 2. Antimicrobial susceptibility test of *V. parahaemolyticus* isolates

Agents	No. of isolates (%)			MIC range		
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Test range	MIC50	MIC90
Gentamicin	47(100)	0	0	1-64	<1	<1
Streptomycin	-	-	-	16-128	<16	<16
Chloramphenicol	47(100)	0	0	2-64	<2	<2
Meropenem	47(100)	0	0	0.25-4	<0.25	<0.25
Cefoxitin	47(100)	0	0	1-32	8	8
Cefotaxime	47(100)	0	0	0.5-8	<0.5	<0.5
Ceftazidime	47(100)	0	0	1-16	<1	<1
Cefepime	47(100)	0	0	0.5-16	<0.5	<0.5
Ampicillin	17(36.2)	28(59.6)	2(4.3)	2-64	8	16
Amoxicillin/clavulanic acid	47(100)	0	0	2/1-32/16	<2/1	<2/1
Colistin	-	-	-	2-16	4	>16
Nalidixic acid	-	-	-	2-128	<2	<2
Ciprofloxacin	47(100)	0	0	0.12-16	<0.12	<0.12
Trimethoprim/sulfamethoxazole	47(100)	0	0	0.12/2.38-4/76	<0.12/2.38	<0.12/2.38
Sulfisoxazole	-	-	-	16-256	128	256
Tetracycline	47(100)	0	0	2-128	<2	<2

11.2%, streptomycin 3.4%, amoxicillin/clavulanic acid에 대해 2.3%의 내성률을 나타내었으나 그 외 항생제에는 모두 감수성을 나타내었다. 이와 같이 MIC 측정에 따른 항생제 내성 판별법은 Disk Diffusion Test에 비해 낮은 내성률을 나타내는 경향이 있다. 이와 유사하게 최근 해외 연구에서도 임상분리 73균주에 대해 Broth Microdilution 방법에 의해 수행한 MIC 검사에서 모든 균주들이 colistin을 제외한 모든 항생제에 감수성을 보였다[28].

균주 내 항생제 내성 유전자 양상

AMRFinderPlus를 이용한 전장유전체 분석 결과, 분리 균주로부터 β-lactam계 내성에 관여하는 bla_{CARB} $bla_{CARB-18}$, $bla_{CARB-19}$, $bla_{CARB-20}$, $bla_{CARB-24}$이 확인되었으며, tetracycline계 내성에 관여하는 *tet*(35) 유전자와 chloramphenicol 내성 유전자인 *cat*C 및 fosfomycin 내성 유전자인 *fos*가 확인되었다. 내성유전자의 분포율은, β-lactam계, tetracycline계 및 chloramphenicol계 내성 유전자는 모든 균주(100%)로부터 확인되었으며, *fos*는 1균주(2.1%)로부터 확인되었다(Table 3). 이러한 내성 유전자의 분포는 표현형과 큰 차이를 보이는데, 기본적으로 항생제 내성에 있어 유전형과 표현형의 차이는 유전자 내 돌연변이 발생, 유전자 조절 체계의 부작용 등이 원인이 된다고 보고되어 있다[29]. 특히 *V. parahaemolyticus*의 경우 유전형과 표현형의 차이가 자주 보고되는데, 본 연구 결과와 유사한 연구들을 살펴보

Table 3. Comparison with phenotypic and genotypic antimicrobial resistance

Isolate No.[1)]	Phenotype of antimicrobial resistance	Genotype of antimicrobial resistance
SFVS-13, SFVC-23, 27, 52	-	bla_{CARB}, *cat*C, tet(35)
SFVS-14, SFVC-49	Ampicillin	$bla_{CARB-18}$, *cat*C, tet(35)
SFVC-21, 22, 24, 25, 28, 29. 35, 36, 37, 38, 39, 41, 43, 44, 48, 50, 51, 53, 56, 67, 69, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81	-	$bla_{CARB-18}$, *cat*C, tet(35)
SFVC-46	-	$bla_{CARB-18}$, *cat*C, fos, tet(35)
SFVC-40	-	$bla_{CARB-19}$, *cat*C, tet(35)
SFVC-14, 45, 54, 55, 64, 65	-	$bla_{CARB-20}$, *cat*C, tet(35)
SFVC-42, 47	-	$bla_{CARB-24}$, *cat*C, tet(35)

[1)]SFVS and SFVC isolates indicate they were isolated from samples purchased in Seoul-Gyeonggi and Chungcheong provinces, respectively.

면, 중국의 양식 새우에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 102개 균주 중 90개의 균주가 chloramphenicol 내성 유전자인 *cat*를 가졌으나 오직 두 균주에서만 내성을 나타내었다[30]. 또한 태국의 해산물에서 분리된 36주의 *V. parahaemolyticus*에서 *tet*(34)는 30개 균주에서, 그리고 *tet*(35)의 경우 15개 균주에서 확인되었으나, 이러한 균주들의 tetracycline에 대한 표현형은 모두 감수성으로 나타났다[31]. 또한 β-lactam계 내성 유전자인 bla_{CARB}의 경우에도 유사한 보고가 있는데, 중국의 임상 환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 모든 균주가 bla_{CARB} family 유전자 중 하나를 가지고 있었으나, 표현형에서 모두 감수성을 나타내었다[28]. 이러한 연구들에서 보듯이 *V. parahaemolyticus*의 유전형과 표현형의 차이는 흔히 나타나고 있으며, 그 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 그러나 비록 이러한 내성 유전자들이 *V. parahaemolyticus*의 표현형에 영향을 끼치진 못할지라도 언제든지 다른 균종으로 전파되어 표현형으로 발현될 수 있는 위험성이 존재함으로 내성 유전자의 분포에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

분리 균주의 병원성 유전자 분석

총 47균주의 분리 균주에서 *tdh*, *trh* 유전자는 확인되지 않았으나, T3SS1는 모든 균주(100%)에서 T3SS2는 1균주(2.1%)에서 확인되었다(Fig. 1). T3SS1에 관여하는 유전자들의 경우, 모든 균주들을 대상으로 VFDB에 기재되어 있는 37종의 유전자가 공통적으로 확인되었으며, 한 균주를 대상으로 확인된 T3SS2에 관여하는 유전자들은 24종의 유전자가 확인되었다. Jeong 등[32]에 따르면, 국내 식당 수족관물로부터 분리한 *V. parahaemolyticus* 35균주 중 *tdh*, *trh*, T3SS2 관여 유전자는 확인되지 않았으며, T3SS1 관여 유전자는 30균주(85.7%)에서 확인되었다고 보고하였다.

본 연구 결과는 이전에 보고되어 있는 연구들과 유사하나, 최근 병원성 유전자를 보유한 *V. parahaemolyticus*의 검출률이 증가하는 추세임에 따라 *V. parahaemolyticus*의 병원성 유전자 유무 여부의 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 사료된다[5].

분리 균주 내 유전학적 계통 분석

MLST 분석 결과로는 분리 균주 중 17균주로부터 PubMLST에 등록되어 있는 15가지 sequence type (ST)이

Fig. 1. Detection of virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates based on whole genome sequencing analysis. SFVS and SFVC isolates indicate they were isolated from samples purchased in Seoul-Gyeonggi and Chungcheong provinces, respectively.

Table 4. Muti-locus sequence type of *V. parahaemolyticus* isolates

Isolate No.[1)]	Source	Allelic profiles							ST
		dnaE	gyrB	recA	dtdS	pntA	pyrC	tnaA	
SFVS-13	*A. broughtonii*	152	106	17	13	99	171	26	2057
SFVS-14		60	264	377	217	134	131	141	NT1[2)]
SFVC-21	*V. philippinarum*	6	106	3	17	11	11	23	380
SFVC-22		44	131	436	110	74	479	140	2657
SFVC-23		123	100	127	222	66	7	31	NT2
SFVC-24		9	213	165	185	2	46	1	396
SFVC-25, 74		51	4	77	84	60	8	33	658
SFVC-26		31	334	75	55	4	259	23	NT3
SFVC-27		10	661	25	29	2	171	86	3015
SFVC-28		209	13	97	69	26	190	33	NT4
SFVC-49		455	566	25	117	46	296	57	NT5
SFVC-50		12	610	286	19	143	47	51	2876
SFVC-51		36	285	292	13	49	227	24	2230
SFVC-52		42	104	25	46	142	216	37	NT6
SFVC-53		31	100	127	29	66	11	31	NT7
SFVC-54		382	136	61	180	31	212	54	2708
SFVC-64		3	282	42	44	38	44	24	NT8
SFVC-65		170	224	75	139	117	18	124	424
SFVC-67		26	414	425	13	26	141	23	NT9
SFVC-69		33	84	307	378	276	5	157	NT10
SFVC-71		51	4	77	84	60	8	33	NT11
SFVC-72		112	84	218	69	26	90	26	NT12
SFVC-75		475	104	57	380	61	342	51	NT13
SFVC-29	*A. islandica*	19	133	103	21	37	103	74	204
SFVC-35	*M. veneriformis*	304	84	312	76	35	210	26	NT14
SFVC-36		42	159	3	185	37	438	17	NT15
SFVC-37		51	4	77	84	60	8	33	658
SFVC-38		33	543	24	5	10	5	1	3042
SFVC-39		5	370	31	530	163	18	57	NT16
SFVC-40		103	3	465	3	72	82	2	NT17
SFVC-41	*C. sinensis*	71	320	192	132	48	296	24	NT18
SFVC-42, 47		19	74	61	68	151	11	26	NT19
SFVC-43		449	202	4	445	235	413	2	NT20
SFVC-44		274	106	270	280	46	78	94	980
SFVC-45		93	217	19	166	34	7	169	NT21
SFVC-46		4	13	11	74	60	9	23	1276
SFVC-48		81	88	31	355	28	45	217	NT22
SFVC-55	*M. coruscus*	42	251	72	76	45	46	26	NT23
SFVC-56		31	29	61	35	66	3	26	NT24
SFVC-76, 78, 79, 80, 81		80	25	160	179	26	10	117	NT25
SFVC-77		35	343	89	29	61	188	13	805

[1)]SFVS and SFVC isolates indicate they were isolated from samples purchased in Seoul-Gyeonggi and Chungcheong provinces, respectively.
[2)]Non-typable.

확인되었다. ST 658이 3균주, 이외 ST은 1균주씩 확인되었으며, 나머지 30균주는 25가지의 등록되지 않은 새로운 ST로 확인되었다(Table 4).

ST 658의 경우, 2균주는 피조개, 1균주는 바지락으로부터 분리되었다. 3균주 모두 보유하고 있는 항생제 내성 유전자는 동일하나, 모든 항생제에 대해 감수성을 보였다. PubMLST에 등록되어 있지 않은 ST 중에는 홍합으로부터 분리한 1균주에서 T3SS2가 확인되었다. 이외에 동일한 allelic profile을 보유한 균주는 모시조개로부터 분리한 2균주 및 홍합으로부터 분리한 5균주로 확인되었으며, 이들은 각각 동일한 항생제 내성을 보였다. PubMLST에 기재된 정보에 따르면, 국내에 보고된 allelic profile은 확인되지 않았으며, ST 396, ST 3042는 중국 임상 및 환경 분리주로부터 보고되었으며, 이외 ST는 환경 분리주로부터 보고되었으며, ST 204는 분리 시료가 보고되지 않았다. ST 396과 ST 3042의 경우, T3SS1 이외의 병원성 유전자는 확인되지 않았으며, 더불어 ST 396은 스리랑카, 스페인, 이탈리아, 중국의 환경 분리주로부터 보고되었다.

본 연구에서는 환경 분리주로 보고되어 있는 ST와 임상 분리주로 보고되어 있는 ST 모두 확인되었으며, 등록되어 있지 않은 ST 중에는 T3SS2를 지닌 균주가 확인되었다. 이처럼 등록되어 있지 않은 다수의 ST와 병원성 유전자의 여부를 연관함에 따른 기초적 자료가 될 균주 확보와 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전처 연구용역개발사업(과제번호: 22192식품위021)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

국내에서 *V. parahaemolyticus*로 인한 식중독 사고가 지속적으로 보고되고 있으며, 최근 국내 수산물 판매량 및 수산물 양식에 사용되는 항생제 판매량은 증가하는 추세이다. 따라서 본 연구는 국내에 유통되는 수산물에서 분리한 *V. parahaemolyticus*의 분포, 항생제 감수성, 유전적 특성 및 유전학적 통계를 조사하였다. 79건의 유통 수산물로부터 47건(59.5%)에서 *V. parahaemolyticus*가 분리되었다. 항생제 내성 양상의 경우, 총 47균주의 분리 균주에서는 ampicillin에 2균주(4.3%)가 내성을 보였으며, 이외 균주는 모든 항생제에 대해 감수성을 보였다. 항생제 내성 유전자의 경우, 모든 균주(100%)로부터 bla_{CARB} family gene, *tet*(35), *cat*C가 확인되었으며, 1균주(2.1%)에서는 *fos*가 확인되었다. 병원성 유전자 여부의 경우, 모든 분리 균주에서 *tdh*, *trh* 유전자는 확인되지 않았으나, T3SS1은 모든 균주(100%), T3SS2는 1균주(2.1%)에서 확인되었다. MLST의 경우, 17균주로부터 15가지의 ST가 확인되었으며, ST 658가 3균주, 이외 14가지 ST는 1균주씩 확인되었다. 확인된 ST는 대부분 중국, 태국 등의 환경 분리주로 확인되었으며, ST 396, ST 3042는 중국 임상 분리주로부터 확인되었다. 이로써, 최근 국내에 수산물과 관련한 식중독, 유통량, 항생제 판매량 등의 추세에 따른 위험성에 *V. parahaemolyticus*에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료되며, 본 연구는 그에 대한 도움이 될 것이라 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Gyeong Gyu Song https://orcid.org/0009-0007-5212-7846
Hyeonwoo Cho https://orcid.org/0000-0002-5007-5612
Yeona Kim https://orcid.org/0000-0002-3231-6232
Beomsoon Jang https://orcid.org/0000-0003-1657-3105
Miru Lee https://orcid.org/0009-0005-9396-913X
Kun Taek Park https://orcid.org/0000-0001-6177-0373

References

1. Letchumanan, V., Chan, K.G., Lee, L.H., Vibrio parahaemolyticus: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front. Microbiol.*, **5**, 705 (2014).
2. Drake, S.L., DePaola, A., Jaykus, L.A., An overview of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus. *J. Compr. Rev. Food Sci.*, **6**, 120-144 (2007).
3. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2022, October 14). Food poisoning statistics. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=4425&meun_grp=MENU_NEW02.
4. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2023. Food and Rural Affairs investigated the antimicrobial resistance of bacteria recovered from food animals, their meat and fishery products, and companion animals in the Republic of Korea in 2022, Cheongju, Korea, pp. 8-17.
5. Park, K., Mok, J.S., Kwon, J.Y., Ryu, A.R., Kim, S.H., Lee, H.J., Food-borne outbreaks, distributions, virulence, and antibiotic resistance profiles of Vibrio parahaemolyticus in Korea from 2003 to 2016: a review. *Fish. Aquat. Sci.*, **21**, 3 (2018).
6. Reygaert, W.C., An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiol.*, **4**, 482-501 (2018).
7. Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., Dou, T., Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *J. basic microbiol.*, **61**,

1049-1070 (2021).
8. Ghenem, L., Elhadi, N., Alzahrani, F., Nishibuchi, M., Vibrio Parahaemolyticus: A Review on Distribution, Pathogenesis, Virulence Determinants and Epidemiology. *Saudi J. Med. Med. Sci*., **5**, 93-103 (2017).
9. Raghunath, P., Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in Vibrio parahaemolyticus. *Front. Microbiol*., **5**, 805 (2014).
10. Miller, K.A., Tomberlin, K.F., Dziejman, M., Vibrio variations on a type three theme. *Curr. Opin. Microbiol*., **47**, 66-73 (2019).
11. Dashti, A.A., Jadaon, M.M., Abdulsamad, A.M., Dashti, H.M., Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med. J.*, **41**, 117-122 (2009).
12. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2022. Detection method for foodborne pathogens investigation. Cheongju, Korea, pp. 67-72.
13. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2018. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Wayne, PA, USA, pp. 56-58.
14. Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120 (2014).
15. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., Pevzner, P. A., SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol*., **19**, 455-477 (2012).
16. Modi, A., Vai, S., Caramelli, D., Lari, M., The Illumina sequencing protocol and the NovaSeq 6000 System. *Methods Mol. Biol*., **2242**, 15-42 (2021).
17. Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., Klimke, W., AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci. Rep.*, **11**, 12728 (2021).
18. Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., Jin, Q., VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*., **33**, D325-328 (2005).
19. Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M. C.J., Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*., **3**, 124 (2018).
20. Park, K., Mok, J.S., Kwon, J.Y., Ryu, A.R., Shim, K.B., Seasonal and spatial variation of pathogenic Vibrio species isolated from seawater and shellfish off the Gyeongnam coast of Korea in 2013-2016. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **52**, 27-34 (2019).
21. Jeong, H.J., Lee, M.G., Lee, H.H., Seo, S.E., Jeong, S.H., Cho, B.S., Seo, J.M., Distribution of toxin genes and antimicrobial resistance of Vibrio parahaemolyticus isolated from seafood in Gwangju. *J. Food Hyg. Saf*., **37**, 63-68 (2022).
22. Hu, Y., Li, F., Zheng, Y., Jiao, X., Guo, L., Isolation, molecular characterization and antibiotic susceptibility pattern of Vibrio parahaemolyticus from aquatic products in the Southern Fujian coast, China. *J. microbiol. biotechnol*., **30**, 856-867 (2020).
23. Tran, T.H.T., Yanagawa, H., Nguyen, K.T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H., Prevalence of Vibrio parahaemolyticus in seafood and water environment in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Vet. Med. Sci*., **80**, 1737-1742 (2018).
24. Ryu, A., Park, K., Kim, S.H., Ham, I.T., Kwon, J.Y., Kim, J.H., Yu, H.S., Lee, H.J., Mok, J.S., Antimicrobial resistance patterns of Escherichia coli and Vibrio parahaemolyticus isolated from shellfish from the West coast of Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci*., **50**, 662-668 (2017).
25. Yu, H., Oh, E.G., Shin, S.B., Park, Y.S., Lee, H.J., Kim, J.H., Song, K.C., Distribution and antimicrobial resistance of Vibrio parahaemolyticus isolated from Korean shellfish. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**, 508-515 (2014)
26. Kim,S.H., Sin, Y.M., Lee, M.J. Shin, P.K., Kim, M.G., Cho, J.S., Lee, C.H., Lee, Y.J., Chae, K.R., Isolation of major foodborne pathogenic bacteria from ready-to-eat seafoods and its reduction strategy. *J. Life Sci.*, **15**, 941-947 (2005).
27. Mok, J.S., Cho, S.R., Park, Y.J., Jo, M.R., Ha, K.S., Kim, P.H., Kim, M.J., Distribution and antimicrobial resistance of Vibrio parahaemolyticus isolated from fish and shrimp aquaculture farms along the Korean coast. *Mar. Pollut. Bull*., **171**, 112785 (2021).
28. Huang, Y., Lyu, B., Zhang, X., Tian, Y., Lin, C., Shen, L., Yan, H., Zhang, D., Jia, L., Qu, M., Wang, Q., Vibrio parahaemolyticus O10:K4: an emergent serotype with pandemic virulence traits as predominant clone detected by whole genome sequence analysis - Beijing Municipality. China, 2021. *China CDC Wkly.*, **4**, 471-477 (2022).
29. Stasiak, M., Maćkiw, E., Kowalska, J., Kucharek, K., Postupolski, J., Silent genes: antimicrobial resistance and antibiotic production. *Pol. J. Microbiol.*, **70**, 421-429 (2021).
30. Zhang, F., Zhang, J., Lin, G., Chen, X., Huang, H., Xu, C., Chi, H., Antibiotic resistance and genetic profiles of Vibrio parahaemolyticus isolated from farmed pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) in Ningde regions. *Microorganisms*, **12** (2024).
31. Changsen, C., Likhitrattanapisal, S., Lunha, K., Chumpol, W., Jiemsup, S., Prachumwat, A., Kongkasuriyachai, D., Ingsriswang, S., Chaturongakul, S., Lamalee, A., Yongkiettrakul, S., Buates, S., Incidence, genetic diversity, and antimicrobial resistance profiles of Vibrio parahaemolyticus in seafood in Bangkok and eastern Thailand. *PeerJ*, **11**, e15283 (2023).
32. Jeong, H.W., Kim, J.A., Jeon, S.J., Choi, S.S., Kim, M.K., Yi, H.J., Cho, S.J., Kim, I.Y., Chon, J.W., Kim, D.H., Bae, D., Kim, H., Seo, K.H., Prevalence, antibiotic-resistance, and virulence characteristics Vibrio parahaemolyticus in restaurant fish tanks in Seoul, South Korea. *Foodborne pathog. dis.*, **17**, 209-214 (2020).