

2019년 서해 연안 패류 및 양식 새우(*Litopenaeus vannamei*)에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus* 균주들과 새우 급성간췌장괴사병(AHPND)과의 연관성

장광일 · 박진일 · 오은경* · 김수미¹*

국립수산과학원 서해수산연구소, ¹국립수산과학원 수산방역과

The Relationship Between Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp *Litopenaeus vannamei* and *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Shellfish and Shrimp of the West Coast of Korea in 2019

Gwang Il Jang, Jin Il Park, Eun-Gyoung Oh* and Sumi Kim¹*

West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Incheon 22383, Korea

¹Aquatic Disease Control Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), previously known as early mortality syndrome (EMS), is an emerging disease in shrimp caused by *Vibrio parahaemolyticus*. Some *V. parahaemolyticus* strains are associated with foodborne diseases in humans. To date, studies on the relationship between AHPND and pathogenic *V. parahaemolyticus* are very limited. In this study, we monitored the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene and AHPND-related genes, such as Photorhabdus insect-related (*pir*) genes, in 892 strains of *V. parahaemolyticus* isolated and identified in 24 areas of the West Coast of Korea from May to October 2019. The *trh* gene was detected in 9.6% of the isolates from short neck clam samples. However, the *pirA* and *pirB* genes related to AHPND were not found in any of the isolates despite using both duplex and nested PCR assays, suggesting that AHPND-related genes were nonexistent in the *V. parahaemolyticus* strains isolated. This study contributes to the current understanding of the relationship between AHPND and *V. parahaemolyticus* in Korea, as well as provides data on spatial and seasonal distributions of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), *Vibrio parahaemolyticus*, Shrimp, West Coast, Thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene

서론

*Vibrio*속(genus)은 주로 해안, 강하구 및 수산생물에서 많이 분리되며, 현재까지 140여종의 균주가 보고되었다(Parte, 2018; Urakawa et al., 2000). 보고된 대부분의 균주들은 인체에 질병을 유발하지 않는 비병원성균이지만(Kongrueng et al., 2015) 이 중 12개의 *Vibrio*종, 즉 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholera*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio*

hollisae, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio harveyi*, 와 *Vibrio metschnikovii*가 인체 감염을 유발하는 것으로 보고되었다(Farmer et al., 2015; CDC, 2019). 전 세계적으로 비브리오 콜레라균(*V. cholera*), 장염비브리오균(*V. parahaemolyticus*), 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*)은 주요한 수인성·식품 매개질환의 원인균이다(Thompson et al., 2006). 특히, 우리나라에서 가장 빈번하게 발생하는 장염비브리오균(*V. para-*

*Corresponding author: Tel: +82. 32. 745. 0750 Fax: +82. 32. 745. 0619

E-mail address: ohdagu@korea.kr; sumikim@korea.kr



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0752>

Korean J Fish Aquat Sci 53(5), 752-760, October 2020

Received 9 July 2020; Revised 19 August 2020; Accepted 10 September 2020

저자 직위: 장광일(연구사), 박진일(연구사), 오은경(연구관), 김수미(주무관)

haemolyticus)은 인간에게 장염 및 식중독(Kang et al., 2016; Yang et al., 2017; Park et al., 2018)을 유발하는 내열성 용혈 독소(thermostable direct hemolysin, TDH) 또는 내열성 용혈 독소 유사독소(TDH-related hemolysin, TRH)를 생성한다. 또한, *V. parahaemolyticus*는 어류, 패류, 갑각류 등의 양식생물에 질병을 유발할 뿐만 아니라 해수 유래의 기회감염균으로서 역할도 한다(Sudheeshand and Xu, 2001; Marudhupandi et al., 2017). 최근 양식 새우류에 급성간췌장괴사병(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)을 유발하는 원인균이 *V. parahaemolyticus*라는 것이 밝혀지면서(Lightner et al., 2012; Zhang et al., 2012) 전 세계적으로 AHPND에 대한 관심이 높아지고 있다. 세균학적 분류 측면에서는 *V. parahaemolyticus*가 AHPND의 원인병원체이지만, 모든 균주가 AHPND를 유발하는 것은 아니다. 그중 곤충관련(*Photobacterium* insect-related, Pir)독소를 생성하는 plasmid를 가진 일부 균주만이 AHPND를 유발하는 것으로 밝혀졌다(Joshi et al., 2014; Han et al., 2015; Kim and Kim, 2015). 그러므로 해수 및 수산생물에서 분리되는 *V. parahaemolyticus*균주들이 병원성 또는 비병원성인지에 대한 판단이 과학적인 근거를 통해 이루어져야 할 필요가 있다. 양식새우에 대량폐사를 유발하는 AHPND는 2009년 중국에서 처음 발병을 시작으로 베트남(2010년), 말레이시아(2011년), 태국(2012년), 멕시코(2013년)까지 전파되었고, 최근 2017년에는 미국 텍사스까지 전파되어 새우 양식산업에 막대한 경제적 피해를 입혔다(Zorriehzahra and Banaederakhshan, 2015; Dhar et al., 2019). 2013년에 Tran et al. (2013)은 AHPND의 원인균인 그람음성의 해양 세균 *V. parahaemolyticus*를 분리하였고, *V. parahaemolyticus*가 분비하는 독소로 인해 새우의 간췌장 부분 손상 및 수축된 증상을 관찰하였다. 2014년에는 태국 및 중국의 새우양식장에서 분리된 AHPND 원인균인 *V. parahaemolyticus* 균주들의 유전체 서열 분석을 통해 콜레라 독소와 type IV pilus/type IV 분비시스템뿐만 아니라 plasmid에 곤충관련독소(pir toxin) 생성 유전자와 상동성 부분이 있다는 것을 밝혔다(Kondo et al., 2014; Yang et al., 2014). 이후, Han et al. (2015)는 베트남의 새우 양식장에서 AHPND에 감염된 새우의 위장에서 *V. parahaemolyticus*를 분리하여 plasmid에 곤충관련독소를 생성하는 유전자(*pirA/pirB*)가 있음을 확인하였다. 우리나라에서는 2016년도에 서해안의 흰다리새우 양식장에서 처음으로 AHPND가 발생하여 역학조사를 실시하였으나 원인균의 유래에 대해서는 보고되지 않았다(Hwang et al., 2018). 새우 양식장 및 해수 환경에서 분리된 모든 *V. parahaemolyticus* 균주가 AHPND를 유발하지 않는다는 보고는 여러 차례 있었지만(Tran et al., 2013; Kondo et al., 2014; Han et al., 2015; Lee et al., 2015), AHPND를 유발하는 *V. parahaemolyticus*의 유래에 대한 역학적 연구는 현재까지 미흡하다.

본 연구에서는 식품위생학적 관점에서의 인체감염성 세균과 어병학적 관점에서의 양식생물 감염성 세균의 구분과 역학적

접근을 위하여 2019년 5월부터 10월까지 서해안 연안 패류 및 새우 양식장에서 일반적으로 분리되는 저도 호염성 해양세균 *V. parahaemolyticus* 및 내열성용혈독소(thermostable direct hemolysin, TDH)와 내열성 용혈독소유사독소(TDH-related hemolysin, TRH)를 생산하는 유전자(*tdh, trh*)를 가진 장염비브리오(*V. parahaemolyticus*) 균주들과 새우 급성간췌장괴사병(AHPND)과의 병인학적 연관성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료채취

2019년 5월부터 10월까지 *V. parahaemolyticus* 균주를 분리하기 위해 서해안의 주요 패류 양식장이 위치한 18개 지역, 인천광역시 무의도(Muuido), 영흥도(Yeongheungdo), 소이작도(Soijakdo), 승봉도(Seungbongdo), 충청남도의 천수만(Cheonsu Bay), 원산도(Wonsando), 이원면(Iwon-myeon), 가로림만(Garorim Bay), 소월면(Sowon-myeon), 전라북도의 변산(Byeonsan), 고창(Gochang-gun), 전라남도의 도리포(Dolipo), 압해도(Aphaedo), 장산도(Jangsando), 함평만(Hampyeong Bay), 탄도만(Tando Bay), 매화도(Maehwado), 칠산도(Chilsando)와 새우 양식장 4개 지역, 인천광역시 강화군(Ganghwa-gun), 경기도 평택시(Pyeongtaek-si), 충청남도

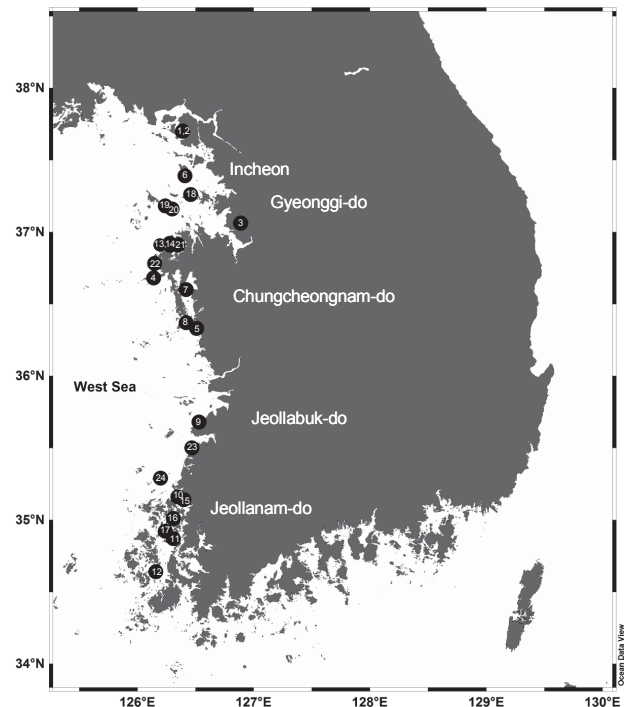


Fig. 1. Sampling sites of shellfish and shrimp *Litopenaeus vannamei* on the West Coast of Korea during the period May to October in 2019. The description of sampling sites is the same as in Table 2.

태안군(Tae-an-gun) 및 보령시(Boryeong-si)를 선정하여 패류 즉, 굴(Oyster *Crassostrea gigas*), 동죽(Surf clam *Macra veniformis*), 바지락(Short neck clam *Venerupis philippinarum*), 백합(Ocean quahog *Arctica islandica*), 소라(Conch *Lobatus gigas*), 전복(Abalone *Haliotis discus hannai*) 및 흰다리 새우(Shrimp *Litopenaeus vannamei*) 시료와 사육수(pond water)를 채취하였다(Fig. 1; Table 1). 패류시료는 채취한 후 멸균된 항동술로 표면에 묻어 있는 이물질을 현장해수로 세척한 후 멸균된 용기에 담았고, 새우시료는 새우 양식장에서 구입 후 10°C 이하로 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

V. parahaemolyticus 균주 분리 및 동정

V. parahaemolyticus 분리 및 동정은 미국식품의약국(food and drug administration, FDA)의 bacteriological analytical manual (BAM)의 방법에 따라 실시하였다(Elliot et al., 1995). 패류 및 새우 전체 시료(간체장 포함)에 phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4)을 첨가하여 균질화 후, alkaline peptone water (APW; peptone 10 g/L, NaCl 20 g/L, pH 8.5 ± 0.2)에 접종하여 35 ± 0.5°C에서 18-24시간 증균 배양하였다(Feng et al., 2017; Yang et al., 2019). 배양 후, CHROMagar (Paris, France)에 희석 도말하여 35°C에서 24시간 배양하였다. CHROMagar 배지상에서 *V. parahaemolyticus* 균주로 추정되는 연보라색 집락(colony)을 분리하여 동정시험을 실시하였다. *V. parahaemolyticus* 추정되는 균주에 대하여 내염성시험, 42°C 발육시험, ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) 시험 등 생화학시험을 하였으며, 최종적으로 VITEK system (BioMérieux Vitek, Marcy-l'Étoile, France)을 이용하여 분리된 *V. parahaemolyticus* 균주들에 대해 확정하였다(Park et al., 2019; Song et al., 2020).

DNA 추출 및 병원성 관련 유전자 탐색

분리된 장염비브리오균을 대상으로 식중독을 유발시키는 병원성 인자로 알려진 *tdh* 및 *trh* 유전자의 존재 유무 확인은 PCR (polymerase chain reaction) 기법을 이용하였다. *tdh* 및 *trh* 유

전자 검출을 위해 VPD-1/VPD-2 및 VPR-1/VPR-2 primer sets (Takara, Bio Inc., Otsu, Japan)를 사용하였다. 시험 균주는 Tryptic Soy Broth (Difco, Detroit, MU, USA) 10 mL에 접종하여 37°C에서 18-24시간 배양 후, DNA Isolation kit (MO-BIO, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. *tdh* 및 *trh* 유전자 증폭은 PCR Master mix (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) 12.5 μL, 각 primer (10 pmol/μL) 0.2 μL씩, 추출한 DNA 2 μL로 반응액을 조성한 후, 멸균증류수를 첨가하여 총 25 μL가 되도록 하였다. 그리고 thermal cycle (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)를 이용하여 98°C에서 10초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초의 반응을 35회 반복하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 gel documentation system G BOX (Syngene, Cambridge, UK)를 이용하여 amplicon 크기(*tdh* 유전자, 251 bp; *trh* 유전자, 250 bp)를 확인하였다.

급성간체장괴사병(AHPND) 관련 유전자 탐색은 세계동물보건기구(world organization for animal health, OIE)에서 권장하는 방법들 중 아래의 두 가지(duplex PCR과 AP4 nested PCR) 방법을 사용하였다(Dangtip et al., 2015; Han et al., 2015). *V. parahaemolyticus*의 plasmid에 위치한 Pir toxin 생성 유전자를 탐색하기 위해 AccuPower HotStart PCR premix kit (Bioneer, Korea)와 VpPirA-284F/R와 VpPirB-392F/R primer sets을 이용하여 duplex PCR을 실시하였다(Table 1; Han et al., 2015). 동시에 Dangtip et al. (2015) 방법에 따라 AP4-F1/AP4-R1 primers를 이용하여 첫 번째 PCR을 수행 후, 그 PCR 산물을 이용하여 AP4-F2/AP4-R2 primers로 AP4 nested PCR을 수행하였다(Table 1). PCR 증폭산물은 QIAxcel Advanced 자동전기 영동장치(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

패류 및 새우 양식장의 *V. parahaemolyticus* 분포

2019년 5월부터 10월까지 서해안 패류 및 새우 양식장에서 양식 중인 패류 및 새우로부터 *V. parahaemolyticus*를 분리하였으며, 시료 채취 지역, 시료 및 조사 시기별 분리한 *V. parahaemolyticus*의 분포는 Table 2에 나타내었다.

Table 1. PCR primers and sequences of *Photothabdus* insect-related (*pir*) genes used in this study

Genes	Primers	Product (bp)	References	
<i>Photothabdus</i> insect-related (<i>pir</i>) gene	VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3'	284	Han et al., 2015	
	VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'			
	VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3'	392		
	VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'			
	AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3'	1269		Dangtip et al., 2015
	AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'			
AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3'	230			
AP4-F2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3'				

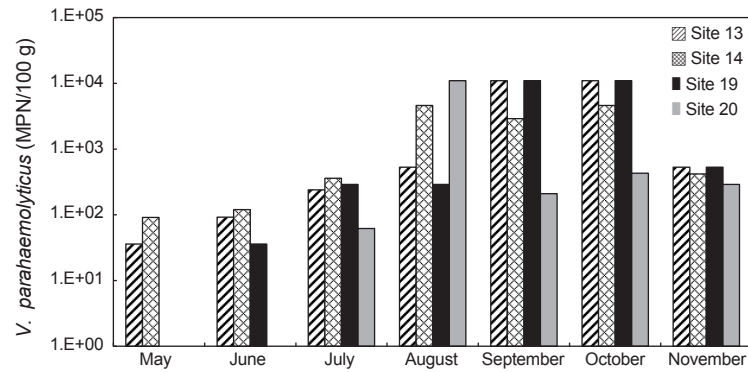


Fig. 2. Monthly variation of *V. parahaemolyticus* isolated from Oyster *Crassostrea gigas* farm on the West Coast of Korea. The description of sampling sites is the same as in Table 2.

서해안 패류 양식장 18개소 및 새우양식장 4개소에서 채취한 총 76개 시료로부터 892개 균주를 분리동정하였다. 시료별로는 굴에서 382개 균주, 동죽에서 20개 균주, 바지락에서 204개 균주, 백합 4개 균주, 새우에서 125개 균주, 새우 사육수에서 147개 균주, 소라 및 전복에서 각 5개 균주씩을 분리하였다. 시기별로는 5월에 2개 시료에서 3개 균주, 6월에 10개 시료에서 45개 균주, 7월에 12개 시료에서 110개 균주, 8월에 13개 시료에서 185개 균주, 9월에 12개 시료에서 236개 균주, 10월에 27개 시료에서 313개 균주를 분리하였다(Table 2).

5월부터 10월까지 인천광역시 옹진군의 소이작도와 승봉도, 충청남도 태안군 이원면의 굴 양식장에서 *V. parahaemolyticus*를 분리한 결과 여름철인 8월에서 10월 사이에 높은 MPN (most probable number)을 보였다(Fig. 2). Park et al. (2019)은 2013년부터 2016년까지 경상남도 연안지역에서 채취한 패류에서 *V. parahaemolyticus*의 분리한 결과 9월에 54.2%로 가장 높은 검출률을 관찰하였다. 그리고 Lee et al. (2019)의 보고에 따르면 전라북도 곰소만 해역에서 3종의 패류(바지락, 가무락, 동죽)에서 *V. parahaemolyticus*를 분리한 결과, 바지락은 8월[8.9×10^2 colony form unit (CFU)/g], 가무락과 동죽은 10월(각각 1.4×10^3 와 1.9×10^3 CFU/g)에 가장 높은 분리율을 보였으며, 수온이 14.6°C로 떨어지는 11월에는 3종의 패류 모두에서 분리율이 급격하게 감소하는 것을 관찰하였다. 이외에도 여름철에 우리나라 연안 지역에서 채취한 패류에서 *V. parahaemolyticus*의 검출률이 높다는 연구결과들이 있으며(Lee et al., 2008; Yu et al., 2014; Kim et al., 2016), 이는 본 연구에서 제시한 5월부터 10월까지 굴에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 균주의 시기별 검출률과 유사한 경향을 보였다.

2019년 6월부터 10월까지 새우 양식장의 새우 및 사육수로부터 2회 이상 연속적으로 채취한 시료에 대해 *V. parahaemolyticus* 검출률을 살펴본 결과 새우에서는 평균 23.1%였고 사육수에서는 평균 26.7%의 검출률을 보여 사육수 시료에서 높은 검출률을 보였다(Table 2). 이는 새우 양식장의 일정한 수온(26-

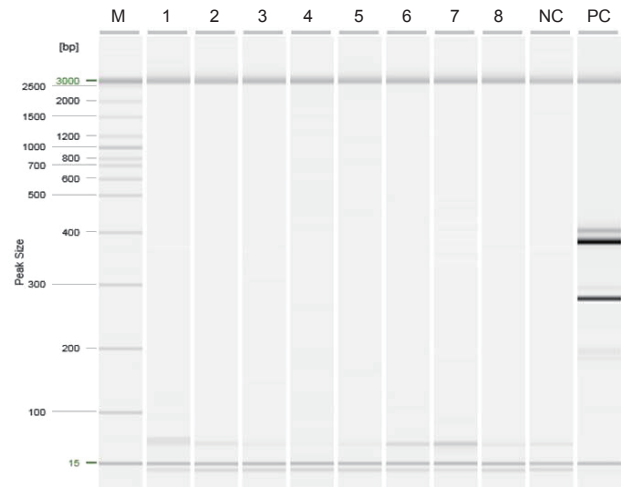


Fig. 3. Representative results of PCR of the AHPND related genes (*pirA/pirB*) using the duplex PCR for *V. parahaemolyticus* isolated from shellfish and shrimp *Litopenaeus vannamei* on the West Coast of Korea. M, size marker; 1, Shrimp (1906 DS-W1); 2, Pond water (1909 DS-W13); 3, Oyster (JN 16-11); 4, Short neck clam (IC 2-1); 5, Conch (CN 4-13); 6, Abalone (CN 3-19); 7, Surf clam (JB 1-7); 8, Ocean quahog (JN 19-20); NC, negative control; PC, positive control.

28°C)과 염분 농도(10-15 psu)를 유지하는 사육 환경이 *V. parahaemolyticus* 균주의 성장 조건 즉, 성장 온도 범위(20-30°C)와 염분 범위(4-80 psu)와 유사하여 *V. parahaemolyticus* 검출률이 시기별로 차이를 보이지 않는 것으로 판단된다(Farmer et al., 2015; NIFS, 2018).

병원성 관련 유전자 검출

내열성 용혈독소(*tdh*) 및 내열성 용혈독소 유사독소(*trh*) 유전자 검출

*V. parahaemolyticus*로 동정된 892개 균주에 대하여 내열성

용혈독소(*tdh*) 및 내열성 용혈독소 유사독소(*trh*) 유전자 검출률을 조사한 결과 *tdh* 유전자는 검출되지 않았지만, *trh* 유전자는 10월의 바지락 시료에서 분리된 5개 균주(9.6%)에서만 검출되었다(Table 3).

2013년부터 2015년까지 남해안 패류 양식장에서 이루어진 연구를 살펴보면 84개의 *V. parahaemolyticus* 균주에 대해 *tdh* 및 *trh* 유전자 검출률을 조사한 결과, *tdh* 유전자는 3.4-5.9%의 검출률을 보였고, *trh* 유전자는 3.4-12.8%가 검출되어 *tdh* 유전자보다 높은 검출률을 보였지만, 해수에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 37개 균주에서는 *tdh* 및 *trh* 유전자는 검출되지 않았

다(Park et al., 2016). 그리고 Kang et al. (2017)은 굴 시료로부터 *toxR* 유전자를 가진 *V. parahaemolyticus* 31개 균주를 분리하여 *tdh* 및 *trh* 유전자 검출률을 조사한 결과 단지 4개 균주(9.1%)만이 *trh* 유전자를 가지고 있으며, *tdh* 유전자는 검출되지 않았다. 이는 해수 및 수산물에서 분리되는 모든 *V. parahaemolyticus* 균주가 인간에게 장염 및 식중독을 일으키지 않는다는 것을 의미한다. 일반적으로 자연환경에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 균주는 병원성 유전인자 보유율이 낮다고 알려져 있다(Thompson et al., 1976; Honda and Iida, 1993; Yamamoto et al., 2008; Malcolm et al., 2015).

Table 2. Number of isolates from shellfish and shrimp *Litopenaeus vannamei* on the West Coast of Korea during the period May to October in 2019

Sites	Sampling sites	Samples	May	June	July	August	September	October	
1	Ganghwa-gun, Incheon #1	Shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (Pond water*)	-	- (2*)	4 (4*)	9 (1*)	5 (21*)	8	
2	Ganghwa-gun, Incheon #2		-	8 (6*)	10 (6*)	9 (4*)	19 (17*)	8 (5*)	
3	Pyeongtaek-si, Gyeonggi-do		-	-	10 (10*)	3 (20*)	12 (19*)	6 (14*)	
4	Taeon-gun, Chungcheongnam-do		-	-	10 (3*)	- (7*)	-	-	
5	Boryeong-si, Chungcheongnam-do		-	4 (8*)	-	-	-	-	
6	Jung-gu, Incheon (Muuido)		-	-	-	-	-	20	
7	Seocheon-gun, Chungcheongnam-do (Cheonsu Bay)		-	-	-	-	-	18	
8	Boryeong-si, Chungcheongnam-do (Wonsando)	Short neck clam <i>Venerupis philippinarum</i>	-	-	-	-	-	18	
9	Buan-gun, Jeollabuk-do (Byeonsan)		-	-	-	-	-	14	
10	Muan-gun, Jeollanam-do (Dolipo)		-	-	-	-	-	10	
11	Sinan-gun, Jeollanam-do (Aphaedo)		-	-	-	-	-	13	
12	Sinan-gun, Jeollanam-do (Jangsando)		-	-	-	-	-	1	
13	Taeon-gun, Chungcheongnam-do (Iwon-myeon#1)	Oyster <i>Crassostrea gigas</i>	1	3	16	33	34	32	
14	Taeon-gun, Chungcheongnam-do (Iwon-myeon #4)		2	4	11	27	32	11	
15	Hampyeong-gun, Jeollanam-do (Hampyeong Bay)		-	-	-	-	-	6	
16	Muan-gun, Jeollanam-do (Tando Bay)		-	-	-	-	-	9	
17	Sinan-gun, Jeollanam-do (Maehwado)		-	-	-	-	-	9	
18	Ongjin-gun, Incheon (Yeongheungdo)		Short neck clam <i>Venerupis philippinarum</i> (Oyster <i>Crassostrea gigas</i> †)	-	-	-	-	-	5 (4†)
19	Ongjin-gun, Incheon (Soijakdo)			-	8 (1†)	- (21†)	14 (17†)	20 (36†)	31 (19†)
20	Ongjin-gun, Incheon (Seungbongdo)	-		1	- (5†)	12 (29†)	12 (9†)	7 (11†)	
21	Taeon-gun, Chungcheongnam-do (Garorim Bay)	Conch <i>Lobatus gigas</i>	-	-	-	-	-	5	
22	Taeon-gun, Chungcheongnam-do (Sowon-myeon)	Abalone <i>Haliotis discus hannai</i>	-	-	-	-	-	5	
23	Gochang-gun, Jeollabuk-do	Surf clam <i>Mactra veneriformis</i>	-	-	-	-	-	20	
24	Yeonggwang-gun, Jeollanam-do (Chilsando)	Ocean quahog <i>Arctica islandica</i>	-	-	-	-	-	4	

* and † in parentheses were isolated from pond water and Oyster, respectively. -, no data.

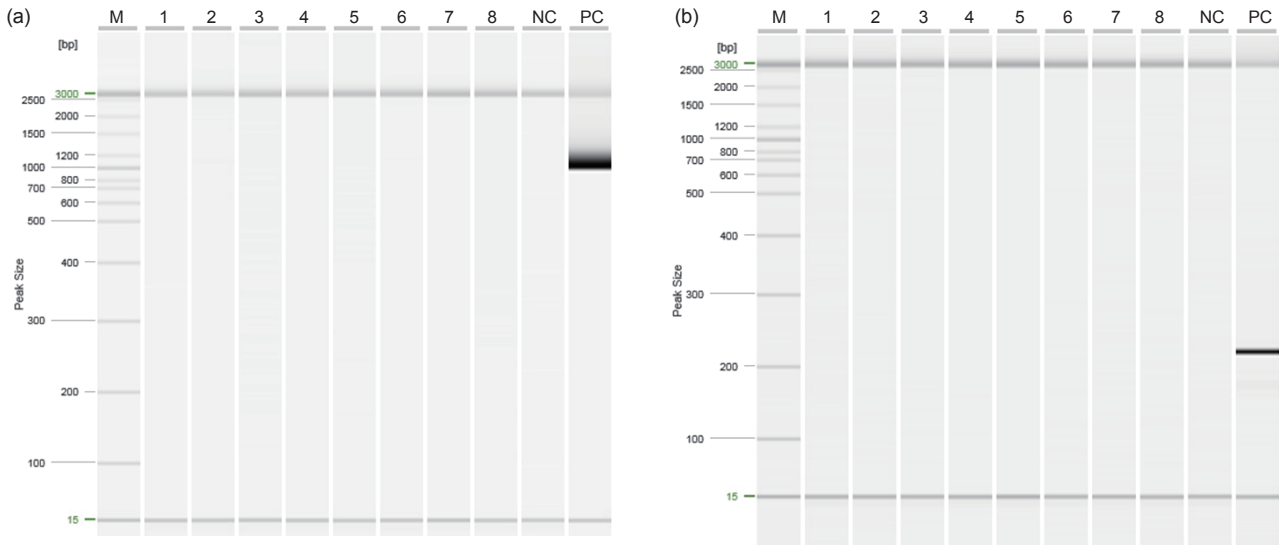


Fig. 4. Representative results of PCR of the AHPND related genes (*pirA/pirB*) using the (a) first PCR and (b) nested PCR for *V. parahaemolyticus* isolated from shellfish and shrimp on the West Coast of Korea. M, size marker; 1, Shrimp (1906 DS-W1); 2, Pond water (1909 DS-W13); 3, Oyster (JN 16-11); 4, Short neck clam (IC 2-1); 5, Conch (CN 4-13); 6, Abalone (CN 3-19); 7, Surf clam (JB 1-7); 8, Ocean quahog (JN 19-20); NC, negative control; PC, positive control.

AHPND 관련 유전자 검출

*V. parahaemolyticus*로 동정된 892개 균주에 대하여 duplex PCR 및 nested PCR을 이용하여 AHPND 관련 유전자인 *pirA*와 *pirB* 유전자 검출률을 조사한 결과 모든 균주에서 검출되지 않았다(Fig. 3 and Fig. 4, Table 3).

2009년 AHPND가 처음 발병한 이후, AHPND에 대한 연구는 현재까지 꾸준히 이루어지고 있다. 2012년에 중국의 흰다리 새우 양식장에서 AHPND를 유발하는 *V. parahaemolyticus*를 분리하였고, 2013년에 침지와 경구감염을 통해 *V. parahaemolyticus*가 AHPND의 원인균임을 밝혔다(Zhang et al., 2012; Tran et al., 2013). Han et al. (2015)는 병원성 및 비병원성 *Vibrio*속과 *Photobacterium*속의 77개 균주를 대상으로 AHPND를 유발하는 *pirA/pirB* 유전자 검출시험을 한 결과 AHPND 증상이 있는 새우 양식장에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 균주에서 *pirA/pirB* 유전자가 검출되었다. 하지만, AHPND 증상을 보

이지 않는 새우 양식장에서 분리된 *V. parahaemolyticus*에서는 *pirA/pirB* 유전자가 검출되지 않는 것을 확인하였다. 이는 본 연구에서 조사한 AHPND가 발생하지 않은 패류 및 새우 양식장에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 균주들이 *pirA/pirB* 유전자를 보유하지 않는 결과와 일치하였다. 그리고 Han et al. (2015) 연구팀은 베트남의 새우 양식장에서 AHPND에 감염된 새우로부터 *V. parahaemolyticus* 2개 균주를 분리하여 병원성 시험한 결과 1개 균주만이 AHPND 증상을 보이는 것을 확인하였다. AHPND를 유발하는 *V. parahaemolyticus*의 전체 염기서열을 분석한 결과 약 69 kb 크기의 plasmid에 곤충관련독소(Pir toxins) 유전자를 암호화하고 있는 것을 확인하였다. 위 연구진들은 *V. parahaemolyticus* 균주들간 AHPND 발생 무무가 차이 나는 원인을 새우의 위/간췌장 또는 새우 양식장의 biofilm에서 세균들이 밀집되어 집락을 형성할 때 균주간의 전위(transposition), 접합(conjugation) 및 plasmid 흡수를 통해 *pirA/pirB* 유

Table 3. Detection rates (%) of thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene and AHPND related genes (*pirA/pirB*) in *V. parahaemolyticus* isolated from shellfish and shrimp *Litopenaeus vannamei* on the West Coast of Korea during the period May to October in 2019

Areas	Number of isolates	<i>trh</i> gene		Detection rates (%) of <i>pirA/pirB</i> genes
		Detection rates(%)	Source	
Incheon	428	0%	-	0%
Gyeonggi-do	94	0%	-	0%
Chungcheongnam-do	284	0%	-	0%
Jeollabuk-do	34	0%	-	0%
Jeollanam-do	52	9.6%	Short neck clam (October)	0%

전자가 비병원성 *V. parahaemolyticus*로 전달될 수 있다고 추정하였다.

최근 AHPND가 발생한 국가들 사이에 AHPND를 일으키는 *V. parahaemolyticus* 균주의 분자 역학적 연관성을 조사하기 위해 여러 국가로부터 *V. parahaemolyticus*를 분리하여 전체 염기서열 분석하였지만 뚜렷한 연관성을 발견하지 못했다 (Kondo et al., 2014; Yang et al., 2014; Lee et al., 2015; Fu et al., 2017). Fu et al. (2017)은 중국의 3개지역에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 9개 균주와 Genbank에 공개된 여러 나라의 *V. parahaemolyticus* 93개 균주의 전체 염기서열을 이용하여 *V. parahaemolyticus*의 유전적 다양성을 조사하였다. Fu et al. (2017)에 의해 분리된 *V. parahaemolyticus* 9개 균주 중 2개 균주만이 *pirA/pirB* 유전자를 가지며 AHPND를 유발하였으며, Genbank에 공개된 *V. parahaemolyticus* 균주들 중에서는 16개 균주만이 *pirA/pirB* 유전자를 가지고 있었다. 그리고 *V. parahaemolyticus* FDA_R31균주를 기준으로 단일 유전 변이(single nucleotide polymorphisms, SNPs)를 살펴본 결과 35,001에서 35,889 SNPs가 있는 것을 보고하였다. 이는 *V. parahaemolyticus* 균주들 사이에 유전적 다양성이 존재하는 것을 의미한다. 그리고 *V. parahaemolyticus* 102개 균주의 전체 염기서열을 이용하여 계통분류학적 특성을 분석한 결과 국가 및 지역별로 구분되는 것을 확인하였다. 이는 *V. parahaemolyticus*가 유전적으로 단일 계통이 아닐 수 있으며 AHPND가 여러 지역에서 독립적으로 발생한 것으로 추정하였다. 따라서 국가별 또는 지역별로 AHPND를 유발하는 *V. parahaemolyticus*의 유래에 대한 역학적인 연구가 반드시 필요하다.

본 연구에서 2019년 5월부터 10월까지 서해안 지역의 패류 및 새우 양식장에서 분리한 892개의 *V. parahaemolyticus* 균주들을 대상으로 AHPND와의 병인학적 연관성을 조사한 결과, 분리된 *V. parahaemolyticus* 균주에서 AHPND를 유발하는 *PirA/PirB* 유전자는 전혀 검출되지 않았다. 이는 서해 연안 해수 및 서식 생물에 존재하는 수인성 *V. parahaemolyticus* 뿐만 아니라 양식장에 상존하는 *V. parahaemolyticus*는 AHPND를 유발하는 *V. parahaemolyticus*와는 역학적 상관관계가 멀다는 것을 시사한다. 인체에 병원성을 보이는 비브리오균과 양식 새우에 AHPND를 유발하는 비브리오균과의 연관성에 대한 연구는 국내뿐만 아니라 해외에서도 조사되지 않았다. 그리고 추가적으로 수산생물 병원체와 인체 병원체에 대한 유래와 분포, 서식 특성을 구분하는 조사 분석이 필요하다. 아시아를 비롯한 여러 국가의 새우 양식장에서 AHPND에 의한 피해가 지속적으로 증가하고 있어 감염 역학적 관점에서 원인세균의 분리 유래를 지속적으로 모니터링할 필요성이 있다고 여겨진다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원의 수산생물 방역기술 개발 및 프로그램 운영(R2020060)과 수출패류 생산해역 및 수산물 위생조

사(R2020052)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2019. *Vibrio* species causing vibriosis. Retrieved from <https://www.cdc.gov/vibrio/faq.html> on May 1, 2020.
- Dangtip S, Sirikharin R, Sanguanrut P, Thitamadee S, Srituny-alucksana K, Taengchaiyaphum S, Mavichak R, Proesprai-wong P and Flegel TW. 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep* 2, 158-162. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002>.
- Dhar AK, Piamsomboon P, Caro LFA, Kanrar S, Adami R Jr and Juan YS. 2019. First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. *Dis Aquat Org* 132, 241-247. <https://doi.org/10.3354/dao03330>.
- Elliot EL, Kaysner CA, Jackson L and Tamplin ML. 1995. *Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Bacteriological analytical manual. Association of Official Analytical Chemists ed. FDA, Arlington, U.S.A., 9.01-9.27.
- Farmer JJ III, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM and Janda JM. 2015. Genus *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}. In: Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. John Wiley Sons, Hoboken, NJ, U.S.A. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01078>.
- Feng B, Liu H, Wang M, Sun X, Pan Y and Zhao Y. 2017. Diversity analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Aquacul Fish* 2, 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.10.001>.
- Fu S, Tian H, Wei D, Zhang X and Liu Y. 2017. Delineating the origins of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from outbreaks of acute hepatopancreatic necrosis disease in asia by the use of whole genome sequencing. *Front Microbiol* 28, 2354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02354>.
- Han JE, Tang KFJ, Tran LH and Lightner DV. 2015. *Phototribadus* insect-related (Pir) toxinlike genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Organ* 113, 33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>.
- Honda T and Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* 4, 106-113.
- Hwang SD, Hwang JY, Kang BC, Jeon HR, Chun WJ, Lee DW, Sohn SB, Kim SM, Kim SR, Lee KY, Jung MH, Seo JS, Kwon M and Jee BY. 2018. Whole genome sequence of acute hepatopancreatic necrosis (AHPND) isolated from Korea. In: Proceedings of the Korean Federation of Fisheries Science and Technology Societies (KOFFST) International Conference 2018, Busan, Korea, 492.

- Joshi J, Srisala J, Truong VH, Chen IT, Nuangsaeng B, Suthienkul O, Lo CF, Flegel TW, Sritunyalucksana K and Thitamadee S. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture* 428-429, 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>.
- Kang CH, Shin Y, Jang S, Yu H, Kim S, An S, Park K and So JS. 2017. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea: Resistance to various antibiotics and prevalence of virulence genes. *Mar Pollut Bull* 118, 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.070>.
- Kang CH, Shin YJ, Kim WR, Kim YG, Song KC, Oh EG, Kim SK, Yu HS and So JS. 2016. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Environ Sci Pollut Res* 23, 918-926. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5650-9>.
- Kim NE and Kim DH. 2015. Acute hepatopancreatic necrosis of shrimp and import health measures. *J fish Pathol* 28, 1-7. <https://doi.org/10.7847/jfp.2015.28.1.001>.
- Kim SK, An SR, Park BM, Oh EG, Song KC, Kim JW and Yu HS. 2016. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oyster *Crassostrea gigas*. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 116-123. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0116>.
- Kondo H, Tinwongger S, Proespraiwong P, Mavichak R, Unajak S, Nozaki R and Hirono I. 2014. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc* 2, e00221-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00221-14>.
- Kongrueng J, Yingkajorn M, Bunpa S, Sermwitaya-wong N, Singkhamanan K and Vudhakul V. 2015. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J Fish Dis* 38, 957-966. <https://doi.org/10.1111/jfd.12308>.
- Lee CT, Chen IT, Yang YT, Ko TP, Huang YT, Huang JY, Huang MF, Lin SJ, Chen CY, Lin SS, Lightner DV, Wang HC, Wang AH, Wang HC, Hor LI and Lo CF. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10798-10803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112>.
- Lee DS, Shin HY, Park KS and Shin IS. 2019. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish at Gomso Bay. *Korean J Fish Aquat Sci* 52, 114-120. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0114>.
- Lee JK, Jung DW, Eom SY, Oh SW, Kim Y, Kwak HS and Kim YH. 2008. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. *Food Control* 19, 990-994. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.10.006>.
- Lightner, DV, Redman, RM, Pantoja, CR, Noble, BL and Tran L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Retrieved from <https://www.aquaculturealliance.org/pdf/GAA-Lightner-Jan12.pdf> on May 1, 2020.
- Malcolm TTH, Cheah YK, Radzi CWJWM, Kasim FA, Kantilal HK, John TYH, Martinez-Urtazaf J, Nakaguchig Y, Nishibuchig M and Sona R. 2015. Detection and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by using multiplex PCR and loop-mediated isothermal amplification assay. *Food Control* 47, 664-671. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.010>.
- Marudhupandi T, Kumar TTA, Prakash S, Balamurugan J, Dhayanithia NB. 2017. *Vibrio parahaemolyticus* a causative bacterium for tail rot disease in ornamental fish, *Amphiprion sebae*. *Aquaculture Reports* 8, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.09.004>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2018. Standard manual of whiteleg shrimp farming. NIFS, Busan, Korea.
- Park K, Mok JS, Kwon JY, Ryu AR and Shim KB. 2019. Seasonal and Spatial Variation of Pathogenic *Vibrio* Species Isolated from Seawater and Shellfish off the Gyeongnam Coast of Korea in 2013-2016. *Korean J Fish Aquat Sci* 52, 27-34. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0027>.
- Park K, Mok JS, Ryu AR, Kwon JY, Ham IT and Shim KB. 2018. Occurrence and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater and bivalve shellfish of the Gyeongnam coast, Korea, in 2004-2016. *Mar Poll Bull* 137, 382-387. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.033>.
- Park YS, Park K, Kwon JY, Yu HS, Lee HJ, Kim JH, Lee TS and Kim PH. 2016. Antimicrobial resistance and distribution of virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish farms on the southern coast of Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 460-466. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0460>.
- Parte AC. 2018. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 1825-1829. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>.
- Song X, Zang J, Yu W, Shi X and Wu Y. 2020. Occurrence and Identification of Pathogenic *Vibrio* Contaminants in Common Seafood Available in a Chinese Traditional Market in Qingdao, Shandong Province. *Front Microbiol* 11,1488. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01488>.
- Sudheesh PS and Xu HS. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196, 37-46. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00575-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00575-5).
- Thompson CA, Vanderzant C and Ray SM. 1976. Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources. *J Food Sci* 41, 204-205.
- Thompson FL, Austin B and Swings J. 2006. The biology of vibrios. ASM Press copyright, Washington DC, U.S.A., 190-203.

- Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K and Lightner DV. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ* 105, 45-55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>.
- Urakawa H, Yoshida T, Nishimura M and Ohwada K. 2000. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environ Microbiol* 2, 542-554. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00137.x>.
- Yamamoto A, Iwahori J, Vuddhakul V, Charernjiratrang W, Vose D, Osaka K, Shigematsu M, Toyofuku H, Yamamoto S, Nishibuchi M and Kasuga F. 2008. Quantitative modelling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand. *Int J Food Microbiol* 124, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.021>.
- Yang JH, Mok JS, Jung YJ, Lee KJ, Kwon JY, Park K, Moon SY, Kwon SJ, Ryu AR and Lee TS. 2017. Distribution and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species associated with zooplankton in coastal area of Korea. *Mar Poll Bull* 125, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.054>.
- Yang Q, Dong X, Xie G, Fu S, Zou P, Sun J, Wang Y and Huang J. 2019. Comparative genomic analysis unravels the transmission pattern and intra-species divergence of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Mol Genet Genomics* 294, 1007-1022. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01559-7>.
- Yang YT, Chen IT, Lee CT, Chen CY, Lin SS, Hor LI, Tseng TC, Huang YT, Sritunyalucksana K, Thitamadee S, Wang HC and Lo CF. 2014. Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc* 2, e00816-14. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00816-14>.
- Yu HS, Oh EG, Shin SB, Park YS, Lee HJ, Kim JH and Song KC. 2014. Distribution and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Korean shellfish. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 508-515. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0508>.
- Zhang BC, Liu F, Bian HH, Liu J, Pan LQ and Huang J. 2012. Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*. *Prog Fish Sci* 33, 56-62. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186135>.
- Zorriehzahra MJ and Banaederakhshan R. 2015. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv Anim Vet Sci* 3, 64-72. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.7>.