

魚貝類中の 腸炎 *Vibrio*菌의 分布와 抗生劑 併用效果에 關한 研究

調查指導科

崔成玟 · 崔秉玄 · 吳秀暻 · 朴相賢

Studies on Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and Antibiotic Combination Effect against Isolated strain

Investigation and Guidance division

Sung Min Choi, Byung Hyun Choi, Soo Kyoung Oh, Sang Hyun Park

= Abstract =

The experiments was carried out in order to study the antibiotics combination effect and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in fish and shell from Jun. to Sep. 1984.

The results were as follows;

1) 17 strains were isolated as *Vibrio parahaemolyticus* in 159 samples.

Of the kinds of fish and shell, the isolated ratio of *V. parahaemolyticus* in Solon was 27.3%, in Pomfret was 23.1%, and in Hair tail was 20.0%.

2) For serological test, K-antigens isolated were K₈, K₆, K₃, K₂₇, K₃₄, K₃₈.

3) Strains isolated was most highly susceptible to Gentamycin and Chloramphenicol.

4) Combination of Ampillin and Gentamycin was showed the remarkable effect against isolated strain.

緒 論

장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)는 1951년 Fujino 등¹⁾에 의하여 처음 분리된 후 1963년 Sakazaki²⁾에 의하여 *Vibrio*속균이라고 주창되어 1965년 미국 Institute of American Type culture Collection에서 *Vibrio parahaemolyticus* Type Culture No. 17802, 17803으로 정식 명명되었다.

이 균은 沿岸海水와 여기에 서식하고 있는 어패류에 기생하는 好鹽性細菌으로 여름철에는 近海海水에 널리 분포하는 세균성 식중독의 원인균으로서 腸炎 및 急性胃腸炎 型的 증상을 나타낸다.^{3,4)}

우리나라의 식중독 발생 件中 세균에 의한 식중독이 78%를 차지하며 그 중 장염비브리오에 의한 식중독이 11.6%로 높은 발생 빈도를 나타내고 있으며, 그 주원 인식품은 어패류와 육류 및 그 가공품이다.⁵⁾

1969년 1월 중순 경북 안동과 영양 등에서 발생한 물치고기 식중독 발생 例도 역학조사에서 장염비브리오균에 의한 식중독으로 판명되었으며, 일본 후생성 보고에도 일본의 세균성 식중독의 약 70%가 장염비브리오균에 의한 것으로 보고된 바 있어 공중보건학적 측면에서 관심이 점차 높아져 가고 있다.

이와같이 국민보건과 밀접한 관계를 가지고 있는 장염비브리오균은 일본, 한국, 동남아시아 등의 해수 및 어패류에 넓게 분포되어 있다. 우리나라에서는 1967년에 송 등⁶⁾이 경북 포항 근해에서 잡은 어패류와 해수에서 장염비브리오균의 오염 분포도를 조사하여 보고한 이래 많은 학자들에 의해 장염비브리오균에 대한 생태학적 연구 및 어패류의 分布狀況에 대하여 보고된 바 있다.^{7,8,9)}

그러나 한국에서 분리된 장염비브리오균에 대한 항생제 감수성 검사 및 병용효과에 대한 연구는 거의 미비한 실정이다. 따라서 저자들은 하절기 식중독 예방

에 필요한 기초자료를 제공하고자 서울시에 유통되고 있는 어패류를 대상으로 장염비브리오균 분포 및 분리된 균의 항생제 감수성 및 병용효과에 대하여 조사하였기 그 결과를 보고한다.

實驗材料 및 方法

1. 실험재료

1984년 6월부터 9월까지 노랑진 수산시장에서 어류 80점, 패류 79점, 총 159점을 수집하여 시료로 하였다.

2. 실험방법

1) 균 분리 및 동정

시료 10g을 무균적으로 취하여 90ml의 멸균인산완충액(pH 7.2)와 혼합한 다음 homogenizer를 사용하여 균질화 시킨 후 가검시료로 하였으며, 어류의 아가미는 멸균된 면봉을 사용하여 가검물을 문질러 채취하였다.

채취된 시료는 Cowan 등¹⁰⁾의 방법과 Bergey's manual¹¹⁾의 방법에 의하여 균 분리 및 동정실험을 하였다.

(Fig. 1 참조)

2) 항생제 감수성 검사

Ampicillin, Gentamycin, Chloramphenicol, Tetracycline, Tobramycin, Cephalothin 등 6종의 항생제 감수성 조사는 Kirby Bauer의 Disc diffusion method¹²⁾에 의하여 실험하였다.

즉 균액을 MacFarland No. 0.5 표준비색관(1% BaCl₂ 0.5ml+1% (0.36N) H₂SO₄ 99.5ml; 10⁸ CFU/ml)에 맞추고, 3% NaCl을 가한 Müller Hinton Agar (pH 7.2~7.4)를 멸균 후 45°C~50°C로 식힌 다음 직경 9mm인 멸균사체에 25ml의 배지를 분주한 후 표면이 마른 한천평판 위에 균액이 적혀진 면봉을 문질러 고루 접종하였다. 3~5분 동안 방치하여 표면의 습기가 흡수된 뒤 disc dispenser를 이용하여 disc간의 중심거리가 15mm이상 떨어지게 하여 4개의 disc를 놓고 가

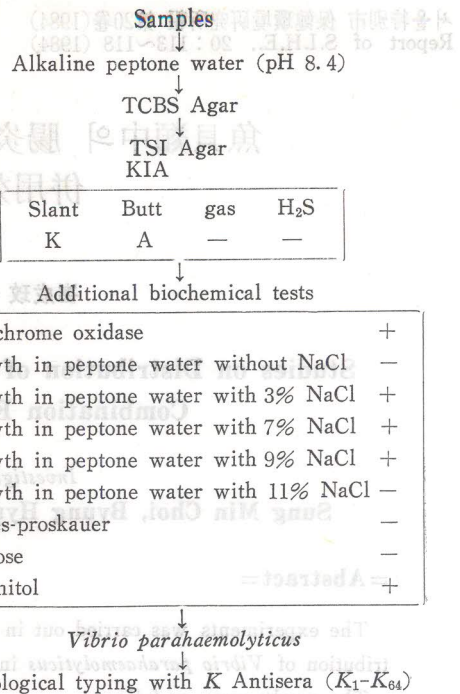


Fig. 1. Identification of *Vibrio parahaemolyticus*.

법게 늘려 밀착시킨 뒤 배양하였다.

16~18시간 배양 후 Zone reader (FISHER products)를 사용하여 억제환의 길이를 측정하여 결과 해석을 Table 1에 의하여 판정하였다.

3) 항생제 최소발육억제농도 측정 (Minimum Inhibitory Concentration)

Barry의 튜브희석법(Broth Dilution method)¹³⁾에 준하여 실험하였다. 즉 Müller-Hinton Broth (DIFCO products)에 ml당 800mcg의 항생제 희석액을 0.5ml 넣어 단계희석한 후 각 1%, 3%, 5%되게 NaCl을 가한 Müller-Hinton Broth 10ml에 실험대상균주 1 loop씩을 접종하여 37°C 항온수조에서 4시간 배양한 것을 Mac-

Table 1. Zone-Diameter Interpretative standard and Approximate MIC correlates

Antibiotics	Disc content	Zone Diameter (mm)			Approximate MIC Correlates	
		Resistant	Intermediate	Susceptible	Resistant	Susceptible
Ampicillin	10mcg	≤11	12~13	≥14	≥32mcg/ml	≤8mcg/ml
Cephalothin	30mcg	≤14	15~17	≥18	—	—
Gentamycin	10mcg	≤12	—	≥13	≥6mcg/ml	≤6mcg/ml
Tetracycline	30mcg	≤14	15~18	≥19	—	—
Chloramphenicol	30mcg	≤12	13~17	≥18	≥25mcg/ml	≤12.5mcg/ml
Tobramycin	10mcg	≤12	13~14	≥15	—	—

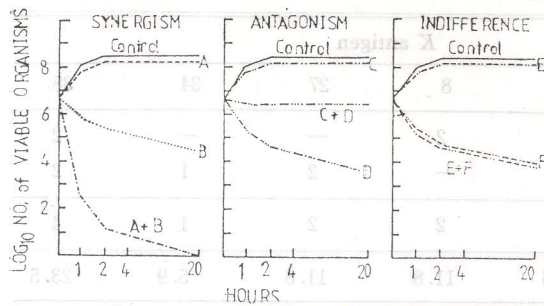


Fig. 2. Effect antimicrobial combinations as determined by the killing curve (time killing curve) method.
A and B=synergism, C and D=antagonism, E and F=indifference.

Farland No. 0.5 표준비색관 (1% BaCl₂ 0.5ml+1% (0.36N) H₂SO₄ 99.5ml: 10⁸ CFU/ml)에 맞추고 10⁵~10⁸ CFU (Colony Forming Unit)/ml가 되게 생리식염수로 희석하고 0.5ml씩 튜브에 분주하여 ml당 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09, 0.04mcg으로 항생제가 함유되도록 하여 37°C에서 18시간 배양한 다음 육안적으로 균 발육의 유무를 보아 최소발육억제농도를 정하였다.

4) 항생제 병용효과의 측정

Ampicillin, Gentamycin, Chloramphenicol 3종의 항생제간의 병용효과 측정은 Roger 등¹⁴⁾의 killing curve method에 의하여 조사하였다. 즉 MIC가 높은 균주를 택하여 MacFarland No. 0.5 표준비색관 (10⁸ CFU/ml)의 농도에 맞춘 균액을 1:200으로 단계희석한 후 각각의 항생제 1/2 MIC 농도가 되도록 혼합하여 최초 세균수를 측정한 후 1시간, 2시간, 4시간, 20시간 배양 후의 0.1ml씩을 취하여 standard method¹⁵⁾의 방법에 준하여 세균수 변화를 조사하였다. 병용효과의 판정방법은 Lorian¹⁶⁾의 방법에 의하여 판정하였다. (Fig. 2 참조)

結果 및 考察

1. 장염비브리오균 分布度

魚類 80점, 貝類 79점에서 장염비브리오균의 檢出率을 조사한 바 결과는 Table 2와 같았다.

총 159점 試料에서 17菌株(10.7%)가 檢出되었으며, 檢출율이 가장 높은 魚貝類는 맛살로서 27.3%였으며, 병어(23.1%), 칼치(20%)도 비교적 높은 檢출율을 나타냈다.

李 등¹⁷⁾은 남해안 지방에서 36.7%, 柳¹⁸⁾는 인천지방

Table 2. The isolated rate of *Vibrio parahaemolyticus*

name of fish	no. of samples	no. of isolated	percentage
송 어 (Gray mullet)	32	1	3.1
농 어 (Seabass)	8	1	12.5
병 어 (Pomfret)	13	3	23.1
광 어 (Flounder)	9	1	11.1
민 어 (Croaker)	6	1	16.7
칼 치 (Hair tail)	5	1	20.0
새 우 (Shrimp)	12	—	—
반 지 락 (Short necked clam)	23	2	8.7
모시조개 (Corb shell)	11	1	9.1
피 조 개 (Ark shell)	14	2	14.3
홍 합 (Sea mussel)	15	1	6.7
맛 살 (Solen)	11	3	27.3
Total	159	17	10.7

어류에서 26%의 檢출율을 나타냈다고 보고하였다. 또한 새 등¹⁹⁾은 포함 근해 어패류별 장염비브리오균의 檢출율 조사에서 칼치, 도미, 조개, 전복 등에서 10%~20%의 檢出率을 나타냈다고 보고하였으며,辛 등²⁰⁾은 오징어(36.4%), 칼치(35.4%), 바지락(32.5%) 등이 높은 檢출율을 나타냈다고 보고한 바 있다.

본 조사 결과에서는 10.7%의 낮은 檢출율을 나타냈으며 어패류별로는 맛살(27.3%), 병어(23.1%), 칼치(20%) 등이 높게 나타낸 것으로 보아 장염비브리오균의 분포상황은 조사지역, 조사시간, 검체수, 해수의 온도 및 해상의 기후 등과 어패류의 상태에 기인하는

Table 3. The rate of isolated of *V. parahaemolyticus* by organs

name of fish	no. of strains	Organ	
		Gill (%)	Viscera (%)
송 어 (Gray mullet)	1	1	—
농 어 (Seabass)	1	1	—
병 어 (Pomfret)	3	2	1
광 어 (Flounder)	1	1	—
민 어 (Croaker)	1	1	—
칼 치 (Hair tail)	1	—	1
Total	8	6(75)	2(25)

Table 4. Distribution of K Antigen of *V. parahaemolyticus*

Samples	no. of strains	K antigen					
		3	6	8	27	34	38
Fishes	8	3	1	2	—	—	2
Shell fishes	9	2	2	—	2	1	2
Total	17	5	3	2	2	1	4
Percentage	—	29.4	17.6	11.8	11.8	5.9	23.5

것으로 생각된다.

魚類 中 部位別 장염비브리오균의 檢出率을 조사한 바 결과는 Table 3과 같았다.

魚類에서 검출된 8菌株 中 6菌株(75%)가 아가미에서 검출되었으며, 2菌株가 내장에서 검출되었다.

Akiyama¹⁸⁾는 얇은 바다의 表層을 遊泳하는 魚族에서 검출율이 높다고 하였으며, Kan¹⁹⁾은 魚體 汚染이 6月경부터 시작하여 아가미, 위장, 내장까지 파급된다고 보고한 바 있다.

또한 辛 등⁹⁾은 魚體 汚染度를 조사한 바 아가미에서 57%, 내장에서 54%의 검출율을 나타냈다고 보고한 바 본 조사성적에서도 비슷한 결과를 나타냈다.

分離菌株에 대한 K 항원별 分布度를 조사한 바 결과는 Table 4와 같았다.

총 17菌株 中 6種 K 항원이 分類되었으며, 그 중 K₃ 항원 균주가 5菌株(29.4%), K₃₈ 항원 균주가 4菌株(23.5%)로 높은 分布度를 나타냈다.

1964年 Sakazaki²⁰⁾의 日本의 장염비브리오균 分離菌株에 대한 K 항원별 성적에 의하면 K₃ 항원 菌株는 食中毒 件數가 가장 많았던 菌型이었으며, K₁₁ 항원 菌株는 그 다음으로 많은 中毒例 血清型이나 自然系 分布에서는 검출하지 못하였다고 보고하였으며, 辛 등⁹⁾은 K₃ 抗原 菌株가 10.4% 검출율을 나타냈다고 보고한 바 있다.

본 조사성적에서도 毒性이 강한 K₃ 抗原 菌株가 29.4

%의 檢出率을 나타낸 것으로 보아 夏節期 食中毒 豫防을 위하여 철저한 위생관리가 시급히 요망됨을 말해 주고 있는 것으로 생각된다.

2. 抗生劑 感受性 및 併用效果

分離菌株 中 17菌株에 대해서 disc diffusion susceptibility test에 의한 6種의 抗生劑 感受性을 조사한 바 결과는 Table 5와 같았다.

Gentamycin과 Chloramphenicol에 대해서는 100%의 감수성을 나타냈으며, Ampicillin이 23.5%로 가장 낮은 감수성을 나타냈다. 약제 감수성이 가장 낮은 Ampicillin과 감수성이 높은 Gentamycin과 Chloramphenicol에 대한 分離菌株에 대한 최소 발육억제 농도 (Minimum Inhibitory Concentration)를 측정한 바 결과는 Fig. 3과 같았다.

Ampicillin은 3.12mcg/ml~100mcg/ml의 MIC 분포를 나타냈으며, 分離菌株 中 약 80%가 50mcg/ml에서 증식이 억제되었다.

Chloramphenicol은 0.39mcg/ml ~ 6.25mcg/ml의 MIC 분포를 나타냈으며, 分離菌株 中 90%가 3.12mcg/ml에서 증식이 억제되었다.

Gentamycin은 0.19mcg/ml~3.12mcg/ml의 MIC 분포를 나타냈으며, 分離菌株 中 90%가 1.56mcg/ml에서 증식이 억제되었다.

Bauer 등¹²⁾에 의하면 Ampicillin은 ≤8mcg/ml에서 Chloramphenicol은 ≤12.5mcg/ml, Gentamycin은 ≤6

Table 5. Result of Disc Diffusion susceptibility test against 17 strains

Antibiotics	Resistant	Intermediate	Susceptible	Percentage of susceptible
Ampicillin	11	2	4	23.5
Cephalothin	2	4	11	64.7
Gentamycin	—	—	17	100
Tetracycline	—	5	12	70.6
Chloramphenicol	—	—	17	100
Tobramycin	5	3	9	52.9

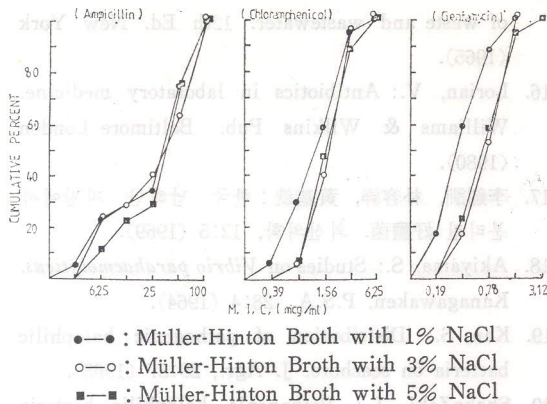
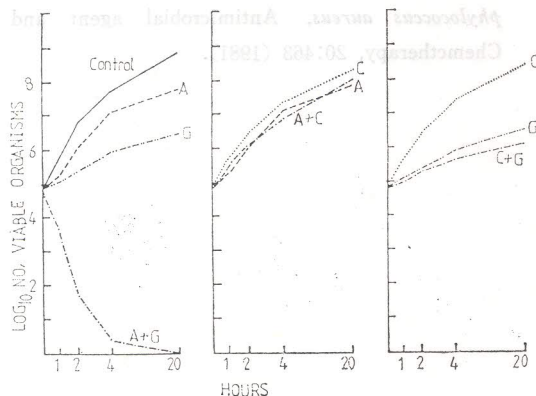


Fig. 3. Distribution of Minimum Inhibitory Concentration against *Vibrio parahaemolyticus*.

mcg/ml의 MIC일때 감수성이 있다고 보고한 바 본 조사성적에서는 Ampicillin이 8mcg/ml 이상의 分布도를 나타냈으나 Chloramphenicol, Gentamycin은 모두 감수성이 있는 것으로 나타났다.

또한 장염비브리오균은 好鹽性細菌이므로 1%, 3%, 5% NaCl의 농도에 따라 MIC 변화를 조사하였던 바 Ampicillin, chloramphenicol은 NaCl 농도에 별다른 영향을 받지 않았으나 Gentamycin은 3%, 5% NaCl을 첨가했을때 보다 1% NaCl 농도를 첨가했을 경우에 MIC가 낮아지는 경향을 나타냈다.

Ericsson 등²¹⁾은 Gentamycin은 培地조건, magnesium, calcium 등의 농도에 따라 MIC가 변화한다고



Control : no antibiotics
 A : Ampicillin (50mcg/ml)
 C : Chloramphenicol (1.56mcg/ml)
 G : Gentamycin (0.78mcg/ml)

Fig. 4. Evaluation of Antibiotic Combination against *Vibrio parahaemolyticus*.

보고한 바 있으며, Paisley 등²²⁾도 pH, 균의 inoculum size에 따라 MIC가 변화한다고 보고한 바 본 조사성적에서도 Gentamycin의 MIC가 NaCl 농도에 따라 차이를 나타냈다.

分離菌株 중 MIC가 높은 균주를 택하여 killing curve method에 의한 抗生劑 併用效果를 조사한 바 결과는 Fig. 4와 같았다.

Ampicillin과 Gentamycin 併用效果는 완전한 상승효과를 나타냈으며, Gentamycin과 Chloramphenicol 병용효과는 부분적인 상승효과를 나타냈다.

또한 Ampicillin과 Chloramphenicol 병용효과는 기대하는 효과를 관찰할 수 없었다.

Zinner 등²³⁾은 Penicillin계와 Aminoglycoside계 항생제는 우수한 병용효과를 나타낸다고 보고하였으며, Paisley 등²²⁾도 *E. coli*에 대해 부분적인 상승작용이 있다고 보고한 바 본 조사결과에서도 Ampicillin과 Gentamycin의 병용효과는 완전한 상승효과를 나타냈다.

따라서 국내 임상임상영역에서 사용되지 오래되어 내성 양성으로 전환되는 추세를 보이고 있는 Ampicillin을 Aminoglycoside계인 Gentamycin과 병용투여시 감염증 치료에 기대할 만한 효과를 거둘 것으로 생각된다.

結 論

서울에 유통되고 있는 魚貝類 159점을 1984년 6월부터 9월 사이에 수집하여 장염비브리오균 분포 및 그 분리균주에 대한 抗生劑 감수성 및 併用效果를 조사한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 총 159점의 어패류에서 17균주(10.7%)의 장염비브리오균이 檢出되었으며, 맛살(27.3%), 병어(23.1%), 갈치(20%)가 높은 검출율을 나타냈다.
- 2) 分離菌株의 K 인자 血清反應에서 K_3 , K_6 , K_8 , K_{26} , K_{34} , K_{38} 를 分類하였다.
- 3) 分離菌株에 대한 感受性이 가장 높은 抗生劑는 Gentamycin과 Chloramphenicol이었다.
- 4) Ampicillin과 Gentamycin의 併用效果는 分離菌株에 대한 완전한 상승효과를 나타냈다.

參 考 文 獻

1. Fujino, J.Y., Okuno, D., Nakada, A.: On the bacteriological examination of Shirasu-Food poisoning. Med. J. Osaka univ., 4:299 (1953).
2. Sakazaki, R.: Studies on the enteropathogenic

facultative halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. J.J. Med. Sci. & Biolo., 16:161 (1963).

3. Asagawa, H., Eghigawa, J.: The study of halophilic bacteria (Part I.). J.J.S.T., 10:74 (1961).
4. Asagawa, H., Akahana, G., Eshigawa, J.: The study of halophilic bacteria (Part IV). Shizuoka, Ken. Hygienic Lab., 13:34 (1964).
5. 보건사회부, 보건주보, p. 461 (1984).
6. 全壽基, 鄭在奎: Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* in Korea. 現代醫學, 6:1 (1967).
7. 柳在根: 어패류 유통 과정별 세균오염도 조사. 공중보건학잡지, 7:1 (1970).
8. 李龍肅, 柳榮海, 全舜姬: 서울에서 발견된 설사원인균과 그 분포. 대한의학협회지, 10:8 (1967).
9. 辛正來, 張載弘, 林鳳澤: 장염비브리오에 관한 조사연구. 서울시위생시험소보, 6:71 (1970).
10. Cowan and Steel: Manual for the identification of medical bacteria. second Ed. Cambridge univ. press (1974).
11. Bergey's manual of Determination Bacteriology, The Williams & Wilkins company, Baltimore, (1974).
12. Bauer, L.W., Kerby, W.M., Sherris, J.C.: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. The American J. of clinical pathology, 36:493 (1966).
13. Barry, L.: The antimicrobial susceptibility test principles and practice. Les & Feliger Philadelphia (1976).
14. Roger, J.B. and Kathleen, N.: Effect of different media on in vitro studies of Antibiotic combinations. J. Appl. Microbiology, 16:890 (1968).
15. A.P.H.A.: Standard method for the Examination of waste and wastewater. 12th Ed. New York (1965).
16. Lorian, V.: Antibiotics in laboratory medicine. Williams & Wilkins Pub. Baltimore/London (1980).
17. 李鍾訓, 朴容祥, 黃基統: 한국 남해안 지방에서 분리된 好鹽菌. 최신의학, 12:5 (1969).
18. Akiyama, S.: Studies on *Vibrio parahaemolyticus*. Kanagawaken, P.S.A., 28:4 (1964).
19. Kan, S.: Distribution of pathogenic halophilic bacteria on seashore. J. Agr., 29:37 (1963).
20. ShakaZaki, L.: Pathogenic halophilic bacteria and its bacteriological character. J.J.P.S., 10:59 (1964).
21. Ericsson, H.M. and J.C. sherris: Antibiotic sensitivity testing, Report of an international collaborative study, actapathol. Microbial, second Sect. B, Suppl. p. 217 (1971).
22. Paisley, J.W. and J.A. Washington: Susceptibility of *Escherichia coli* K I to Four combination of Antimicrobial Agents potentially useful for treatment of neonatal Meningitis. J. infect, dis, 140:183 (1979).
23. Zinner, S.H., J. Klustersky, H., Gaya, Caya, C., Bernard, J.C., Rgff. and Tbe, EORCT: In vitro and in vivo studies of three antibiotics combinations against, Gram negative Bacteria and *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agent and Chemtherapy, 20:463 (1981).

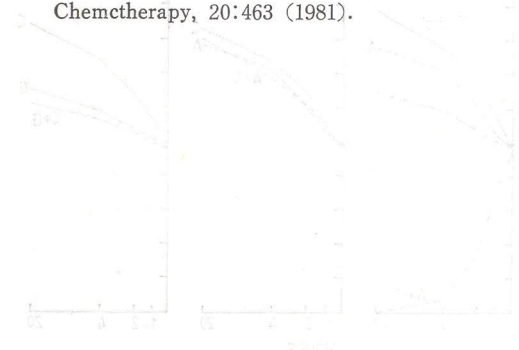


Fig. 4. Evaluation of Antibiotic Combination against *Vibrio parahaemolyticus*.
 Control: no antibiotics
 A: Ampicillin (50mcg/ml)
 C: Chloramphenicol (1.56mcg/ml)
 G: Gentamycin (0.78mcg/ml)