

강북지역 소재 전통시장
유통 수산물에서 분리한 장염비브리오균의
항생제 감수성

안전성검사팀

김수진 · 유영아 · 박애숙 · 조인순 · 박정현 · 육동현 · 유인실

**Antimicrobial Resistance Patterns of
Vibrio Parahaemolyticus Isolated from Sea
Products from the Gangbuk Traditional
Market in Korea**

Safety Inspection Team

**Su-jin Kim, Young-a You, Ae-suk Park, In-sun Jo,
Jung-hyun Park, Dong-hyun Yuk and In-sil Yu**

Abstract

This study investigated the resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from sea products, including (crustacean, echinoderms, mollusks (cephalopods/shellfish), tunicates, fish, aquarium and seasoned dried squid) sold at the Gangbuk traditional market from January 2016 through December 2017. The antimicrobial susceptibility patterns of the 40 isolated strains of *Vibrio parahaemolyticus* were analyzed against 11 antimicrobial agents used in Korea for clinical or veterinary therapy. All 40 strains (100%) of *Vibrio parahaemolyticus* showed antimicrobial resistance to one antibiotic. The resistance of the *Vibrio parahaemolyticus* isolates to ampicillin was the highest and 22.5% of the *Vibrio parahaemolyticus* isolated exhibited.

Key words : *Vibrio parahaemolyticus*, antimicrobial susceptibility, traditional market

서 론

해수, 해저 펄 및 수산물에 서식하는 *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*는 호흡성 그람음성 간균이다. 사람에게 위해를 주는 비브리오균중 콜레라균은 수인성 감염병으로 지정되어 있고, 식중독균인 장염비브리오균은 패류 등 수산물 섭취가 많은 여름철 식중독 원인의 대부분을 차지한다. 장염비브리오균에 의한 감염증상은 설사, 복통, 구토, 오한 및 미열 등을 동반하는 급성 위장염을 유발한다. 김(1) 등은 항생제는 감염질환에 치료제로 사용되어 왔으나, 오·남용에 따른 세균의 내성획득은 질병 치료의 어려움 및 슈퍼박테리아의 출현과 같은 추가적인 내성균 확산 등이 우려되고 있다고 하였고, 항생제 내성은 분해효소에 의한 항생제의 불활성화, 표적 항생물질의 변화, 세포막의 항생제 투과성 변화 및 세포 밖으로 항생제의 유출 등 다양한 것으로 알려져 있다. 박(2) 등 및 한(3) 등은 환경요인으로 해수온도의 상승은 해수에 비브리오속균이 증식하여 패류 및 어류에 축적되어 이를 생식 할 경우 건강에 위협을 준다.

따라서 본 실험은 2016부터 2017년까지 2년간 강북지역 전통시장에서 판매되는 수산물 및 도매업 수족관 물을 729건을 대상으로 장염비브리오균을 분리하고, 분리된 균의 항생제 감수성 조사를 통해 수산물의 안전성관리 및 시민건강에 이바지하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

서울시 강북지역에 소재하는 전통시장(경동시장, 마포도매시장)에서 유통되는 수산물을 대상으로 *Vibrio parahaemolyticus*을 분리 하였다. 시판 수산물 7종류에 대해서 2년간 729건을 수거하여 실험하였다. 수산물의 자세한 내용은 표 1과 같이 어류 247건, 패류 141건, 두족류 91건, 갑각류 28건, 극피류 20건, 건어포류(조미건어포) 20건, 피낭류 18건, 수족관물 164건이었다.

2. 실험방법

1) *V. parahaemolyticus* 분리과 동정

식품공전(4) 시험법에 따라 1% NaCl이 첨가된 Alkaline Pepton Water(APW, pH 8.4±0.2) 225 mL에 균질기로 균질화한 25g의 시료들을 각각 넣어 37°C 배양기에서 18~24시간 배양 후 증균된 액상배지에서 1 Loop(10 µL)를 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar, BBL, USA)에 도말하여 37°C 배양기에서 18~24시간 배양하였다. *V. parahaemolyticus*로 의심되는 집락은 순수 분리하여 TSA(Tryptic Soy Agar, BBL, USA) 37°C 배양기에서 18~24시간 배양하여 API 20E kit(Biomérieux, France)로 확인 동정하였다. 확인 동정된 *V. parahaemolyticus*는 보관배지에 부유후 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. Classification of commerical sea products examined during 2016~2017

Classification	Year		Total
	2016	2017	
Crustaceans	6	22	28
Echinoderms	16	4	20
Mollusks(Cephalopods/Shellfish)	123	109	232
Tunicates	11	7	18
Fish	82	165	247
Aquarium	72	92	164
Seasoned dried Squid	17	3	20
Total	327	402	729

2) 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 40균주의 장염비브리오균을 대상으로 2%(w/v) NaCl를 포함한 Tryptic Soy Broth(BBL)에 배양하여 Spectrometer 650 μ m에서 흡광도 0.5로 조정한 균체를 Müller-Hinton Broth(BBL)상에 도말 10분정도 말린 후 항생제 디스크(OXOID, USA)를 올려놓았다. 사용한 항생제는 Ampicillin(10 μ g; AMP), Gentamicin (10 μ g; CN), Streptomycin(10ug; S), Amoxycillin/Clavulanic(30 μ g; acid(2:1), AMC), Rifampincin(5 μ g; RD), Chloramphenicol(30 μ g; C), Tetracycline(30 μ g; TE), Trimethoprim(5 μ g; W), Sulphamethoxzole/Trimethoprim(25 μ g; SXT), Nalidixic Acid(30 μ g; NA), Ciprofloxacin(5 μ g; CIP)를 사용하여 감수성과 내성 시험을 실시하였다.

3) PCR 분석

PCR System(Aeris, Esco micro, SG/AERIS-BD048)을 사용하였고, 사용 enzyme은 TaKaRa Ex TaqTM, Takara premix Ex TaqTM와 유사한

성능의 효소를 이용하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C 5분간 1회 열변성 후 94 $^{\circ}$ C 1분, 63 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분 30회, 72 $^{\circ}$ C 10분 1회 실시하였다. 생성된 PCR 산물은 1.8% agarose gel에서 전기영동 후 Gel-doc system으로 확인하였다.

4) DNA 증폭용 Primer SET

V. parahaemolyticus 독소 유전자 검색에 사용한 primers는 표 2와 같다.

결 과

1. 유통 수산물에서 *V. parahaemolyticus* 분리율

2016부터 2017년까지 2년간 강북 전통시장에서 유통된 수산물에 대한 *V. parahaemolyticus* 균 분리 결과는 표 3과 같다. 2016년 실험한 327건 중 31주(9.5%), 2017년 402건 중 7주(2.2%)가 분리 되었다. 어종별로는 어류 247건 중 7주(2.8%)가 분리되었고, 연체류는 패류와 두족류를

Table 2. Primers used for PCR

Target gene	Primers	Primer Sequence(5' to 3')	Size(bp)	Reference
<i>tlh</i>	tlh F	AGC TTG TCT GAT ACA GGC AAC ATC	739	KCDC*
	tlh R	GAG TTG CTG TTG TTG GGT GCG TG		

* KCDC : Korea Centers for Disease Control

Table 3. Distribution of *V. parahaemolyticus* isolated from sample

Sea products	No. of sample	No. of positive sample
Crustaceans	28	1
Echinoderms	20	1
Mollusks(Cephalopods/Shellfish)	232	19
Tunicates	18	0
Fish	247	7
Aquarium	164	12
Seasoned dried Squid	20	0
Total	729	40

합쳐서 232건 중 19주(8.2%)가 분리되었다. 갑각류는 28건 중 1주(3.6%), 극피류는 20건 중 1주(5%), 수족관물 164건 중 12주(7.3%)가 분리되었다.

2. 유통 수산물에서 분리한

V. parahaemolyticus 의 항생제 감수성

유통 수산물에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 에 대한 항생제 감수성은 표 4와 같다. 분리된 *V. parahaemolyticus* 40주는 Ampicillin(100%)에 대한 내성율이 가장 높았으며, Amoxycillin/Clavulanic acid(30%), Streptomycin(2.5%), Sulphamethox/Trimethoprim(2.5%) 내성을 나타내었다. Gentamicin, Rifampicin, Chloramphenicol, Tetracycline, Trimethoprim, Nalidixic Acid, Ciprofloxacin은 분리균주에서 감수성을 나타냈다.

3. 유통 수산물에서 분리한

V. parahaemolyticus 내성분포

분리된 *V. parahaemolyticus* 40주에서 가장 많이 검출된 다제 내성 양상은 AM-S-AMC 3제 내성으로 9주(22.5%)로 가장 높게 나타났다. AMP-AMC 2제 내성은 6주(15.0%), AMP-S 2

제 내성은 4주(10.0%), AMP-AMC-RD 3제 내성은 2주(5%), AMP-CN-S-AMC 4제 내성은 2주(5%), AMP-S-AMC-RD 4제 내성은 2주(5%)가 각각 나타났다(표 5).

또한, AMP 1제 내성 1주(2.5%)와 4제 내성 AMP-AMC-RD-W, AMP-CN-S-AMC, AMP-S-AMC-CIP, AMP-S-AMC-SXT, AMP-S-AMC-W은 각각 1주(2.5%)씩 나타났고 5제 내성 AMP-CN-AMC-RD-CIP, AMP-CN-AMC-RD-TE, AMP-S-AMC-RD-CIP, AMP-S-AMC-W도 각각 1주(2.5%)씩 나타났다. 6제 내성 AMP-S-AMC-RD-W-CIP 1주, 8제 내성 AMP-CN-AMC-RD-C-TE-W-CIP 1주, 9제 내성 AMP-CN-S-AMC-C-TE-SXT-NA-CIP, AMP-S-AMC-RD-TE-W-SXT-NA-CIP 각각 1주(2.5%) 및 11제내성 AMP-CN-S-AMC-RD-C-TE-W-SXT-NA-CIP 나타낸 균주도 1주(2.5%)였다.

4. *V. parahaemolyticus*의 *tlh* 유전자 분포

수산물 유래 *V. parahaemolyticus* 40주의 *tlh* 유전자의 존재유무를 PCR assay로 검토한 결과 그림 1과 같이 모든 균주에서 739 bp의 DNA 증폭 산물이 확인되었다.

Table 4. Antimicrobial resistance of *V. parahaemolyticus* isolated from sea products

Antimicrobial agents	Drug amount (μ g)/disk	Diffusion zone break point(mm)	No. of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates(%)
Ampicillin(AMP)	10	≤ 13	100
Gentamicin(CN)	10	≤ 12	0
Streptomycin(S)	10	≤ 11	2.5
Amoxycillin/Clavulanic acid(AMC)	10	≤ 13	30
Rifampicin(RD)	5	≤ 17	0
Chloramphenicol(C)	30	≤ 12	0
Tetracycline(TE)	30	≤ 14	0
Trimethoprim(W)	5	≤ 10	0
Sulphamethox/Trimethoprim(SXT)	25	≤ 10	2.5
Nalidixic Acid(NA)	30	≤ 21	0
Ciprofloxacin(CIP)	5	≤ 20	0

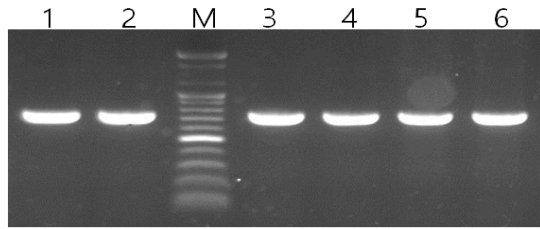


Fig. 1. PCR assay detects the *tlh* gene of *V. parahaemolyticus*.

M, 100bp DNA ladder, lane 1, isolated strain; lane 2, isolated strain; lane 3, isolated strain; lane 4, isolated strain; lane 5, isolated strain; lane 6, isolated strain

고 찰

장염비브리오균은 6월부터 11월까지 장염비브리오균이 생육 하는데 적당한 수온이며 수온이 17°C 이상이 되면 해수 중에서 장염비브리오균이 검출된다. 박(2) 등 및 류(5) 등은 장염비브리오균은 연체류 중 패류에서 체내에 농축되므로 비슷한 수준으로 분리된 결과는 본 실험과 큰 차이를 보이지 않았다. 또한, 본 연구에서 시행한 비브리오균의 항생제 내성에 대한 실험은 수산물시장에서 판매되는 어패류에서 분리된 *V. parahaemolyticus*

Table 5. Antimicrobial resistance patterns of *V. parahaemolyticus* isolated from sea products

Antimicrobial resistance patterns	No. of resistant isolates	Total(%)
AMP	1	2.5
AMP-AMC	6	15.0
AMP-S	4	10.0
AMP-AMC-RD	2	5.0
AMP-S-AMC	9	22.5
AMP-AMC-RD-W	1	2.5
AMP-CN-S-AMC	2	5.0
AMP-CN-S-AMC	1	2.5
AMP-S-AMC-CIP	1	2.5
AMP-S-AMC-RD	2	5.0
AMP-S-AMC-W	1	2.5
AMP-S-AMC-SXT	1	2.5
AMP-S-AMC-W	1	2.5
AMP-CN-AMC-RD-CIP	1	2.5
AMP-CN-AMC-RD-TE	1	2.5
AMP-S-AMC-RD-CIP	1	2.5
AMP-S-AMC-RD-W-CIP	1	2.5
AMP-CN-AMC-RD-C-TE-W-CIP	1	2.5
AMP-CN-S-AMC-C-TE-SXT-NA-CIP	1	2.5
AMP-S-AMC-RD-TE-W-SXT-NA-CIP	1	2.5
AMP-CN-S-AMC-RD-C-TE-W-SXT-NA-CIP	1	2.5
Total	40	100

AMP : ampicillin, CN : gentamicin, S : streptomycin, AMC : amoxycillin/clavulacic acid, RD : rifampincin, C : chloramphe, TE : tetracycline, W : trimethoprim, SXT : sulphamethox/Trimethoprim, NA : nalidixic acid, CIP : ciprofloxacin

molyticus 균주는 Ampicillin(95.2%)에 대한 류(5) 등 내성을 보였다고 하였으며 강(6) 등은 Ampicillin(100%)에 대한 내성을 보이고 다른 10종의 항생제 대해서 감수성을 보였다는 실험 결과와 유사하였다. 류 등(5)은 7제 다제 내성패턴이 가장 많은 내성을 나타낸 결과와 강(6) 등의 10제 다제 내성 패턴에 감수성을 보였다는 결과를 비교할 때, 다제 내성패턴은 6제 내성을 보이는 것으로 나타났다. 본 실험의 11제 다제 내성 결과는 양식 어업의 증가 하는 추세에서 내성획득 및 세균간의 접합 등으로 이루어진 결과로 사료된다. 항생제 내성균이 가진 내성유전인자는 식품, 환경 등 여러 가지 경로를 통해 인간에게 질병을 유발하는 병원균에 내성을 전달 할 수도 있으므로 항생제 사용 줄이기 및 어류의 질병을 억제 하는 백신 사용 등의 대책이 필요하다. 또한, 수산물 생산해역에서 지속적이고 철저한 유통 수산물 중 다제 내성 모니터링이 필요하고, 뿐만 아니라 내성균 확산방지와 수산물 안전성 확보를 위해 총체적인 항균제의 오·남용 방지를 위한 사용자교육, 관리당국의 항생제 내성관리를 철저히 하여야 할 것으로 판단된다.

요 약

V. parahaemolyticus 는 우리나라에서 하절기에 발생하는 식중독의 주요 원인균으로 주로 해수 및 어패류를 통해 인체에 감염된다. 최근 지구 온난화로 해수의 온도가 상승하면서 해양환경 중 세균들의 분포도가 증가하고 또 다양한 항생제에 대한 내성을 보이는 병원균들이 확산되고 있어 *V. parahaemolyticus*의 특성을 조사하여 국민보건 및 합리적 유통관리를 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

1. 2016년 1월부터 2017년 12월까지 서울 강북 지역 채래시장에 판매되고 있는 수산물 시료 어류, 갑각류, 연체류, 수족관물 등 총 729건의 시료에서 40균주의 *V. parahaemolyticus*를 분리하였다.

2. *V. parahaemolyticus* 는 연체류 8.2%의 높은 분리율을 보였고 어류, 갑각류, 극피류에서는 5~2.8%의 분리율을 보였다. 특히 수족관물에서 7.3%가 분리되어 수족관물의 위생적관리 필요성을 보여주었다.

3. 40균주는 Ampicillin(100%)에 대한 내성률이 가장 높았으며 다제 내성 결과는 AM-S-AMC 3제 내성으로 9주(22.5%)로 가장 높게 나타났다.

참고문헌

1. 김태욱, 엄인선, 조상민, 김희대, 박권삼 : 완도해역 해수에서 분리한 장염비브리오의 항균제 내성 및 병원성 유전자의 특징. Korean J. Fish Aquat Sci., 47(3):220~226, 2014.
2. 박아라, 박근바위, 김송희, 함인태, 권지영, 김지희, 유흥식, 이희정, 목종수 : 서해안 패류에서 분리한 대장균 및 장염비브리오균의 항균제 내성 패턴. Korean J. Fish Aquat Sci., 50(6):662~668, 2017.
3. 한아름, 윤영준, 김정완 : 경기인천 연안에서 분리된 장염비브리오균의 항생제 내성 및 플라스미드 보유 현황. Korean J. of Microbiology., 48(1):22~28, 2012.
4. 식품공전, 식품의약품안전처. 2018.
5. 류승희, 황영옥, 박석기, 이영기 : 시판어패류에서 분리한 장염 비브리오균의 항생제 감수성 특성. Korean J. Food Sci. Technol., 42(4):508~513, 2010.
6. 강창호, 오수지, 소재성 : 서해안에서 분리한 비브리오균의 항생제 감수성특성. Korean J. of Microbiology., 49(2):146~149. 2013.
7. 이 향, 오영희, 최성민, 박석기 : 어패류에서 분리한 장염비브리오균의 분포 및 항균제 감수성. 한국 환경보건학회지, 33(1):16~20, 2007.
8. 이근우, 박권삼 : 해수에서 분리한 장염비브리오의 항생제 내성 및 암피실린 내성 유전자의 동정. Korean J. Fish Aquat Sci., 43(6):637~641, 2010.

9. 김상숙, 이희무, 이중복 : 최근 한국에서 유행하는 장염비브리오균의 분자 역학적 특성. Korean J. Biotechnol. Bioeng., 18(6): 522~528, 2003.
10. 김태욱, 엄인선, 김희대, 박권삼 : 곰소만 해역 해수에서 분리한 장염비브리오의 항균제 내성 및 최소발육억제농도의 구명. Korean J. Fish Aquat Sci., 49(5):582~588, 2016.
11. 박권삼 : β -Lactamase(VPA0477) 유전자를 표적으로 Polymerase chain reaction에 의한 장염비브리오의 검출. Korean J. Fish Aquat Sci., 47(6):740~744, 2014.
12. 노아름 : 장염비브리오의 신속동정을 위한 H-NS유전자의 유용성 및 유전적 특성군산대학교 대학원, 2011.
13. 김태욱 : 장염비브리오 세팔로틴 내성유전자의 유전학적 특성. 군산대학교 대학원. 2016.
14. 김민정, 조정자, 류병호 : 비브리오균속이 생산하는 식중독 유발 Toxin 유전자의 검출. Korean J. of Life Science., 10(4):380~387, 2000.
15. 이향 : 시판 굴의 유통조건에 따른 장염 비브리오균의 미생물학적 변화. Fd. Hyg. Safety., 21(4):238~243, 2006.
16. 김영만, 이명숙, 장동석 : 생선회에 오염된 장염비브리오균에 미치는 저장온도의 영향. 한수회., 19(2):136~140, 1986.
17. 김희연, 최진경, 신일식 : 어패류에 오염된 장염비브리오균에 대한 차아염소산수의 살균효과. Korean J. Food Sci. Technol., 47(6): 719~724, 2015.
18. 최승태, 박미연, 장동석 : 자외선을 이용한 활어용 수조수의 위생대책 수립. Korean J. Fish Aquat Sci., 28(4):428~434, 1995.
19. 주진우 : 한국남해안일대의 장염비브리오 분포연구 - 제주, 거제, 남해, 옥지, 부산 및 마산 근해의 해수, 해저펄 및 해산물에서 장염비브리오 분리. 대한미생물학회지., 18(1): 1983.
20. 정형모, 서인주 : 장염비브리오의 역학 및 병원성에 관한 연구. 대한미생물학회지, 16(1), 1981.
21. 김태욱, 박권삼 : MPN 및 H-NS 유전자를 표적으로 하는 PCR assay를 병용한 장염비브리오의 정량. Korean J. Fish Aquat Sci., 47(5):556~561. 2014.
22. 이정복 : 경기도 해봉의 장염비브리오 분포조사연구. 아주대학교 산업대학원, 1987.