

식중독 환자에서 분리한 장염비브리오균의 분자생물학적 특성

역학조사팀

박석기 · 박성규 · 정지현 · 유영아 · 이집호 · 김무상 · 김명희

Molecular Characteristics of *Vibrio* *parahaemolyticus* Isolated From Patients in Seoul

Epidemiology Team

**Seog-gee Park, Seong-kyu Park, Ji-heon Jeong, Young-a You,
Chip-ho Lee, Mu-sang Kim, and Myung-hee Kim**

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is one of the most important food-borne pathogens in Korea, Japan and other countries with long coastlines. This paper reports on the dcauses the potentially severe gastroenteritidis. We isolated 34 strains of *Vibrio parahaemolyticus* from patients in Seoul.

The resistant rates to ampicillin and ticarcillin were 88.2% and 35.2%, respectively, but all isolates were intermediate resistant to streptomycin, 41-77% were to ticarcillin, cephalothin, kanamycin and amikacin. Of them, 32 isolates were resistant to 1 or more antibiotics.

All isolates examined were contained the hemolysin gene(*tdh*, *trh* or *tl*) and RAPD typing by primer 1 was very excellent with Ready To-Go RAPD analysis kit(Amersham Biosciences) and all isolates contained plasmid associated with hemolysin and antibiotics resistance.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, Antibiotic susceptibility, hemolysin, plasmid, RAPD

서 론

*Vibrio parahaemolyticus*는 주로 생선회, 또는 잘 조리되지 않은 해산물 또는 비위생적으로 다루어진 해산물을 소비하였을 때 급성 위장염을 일으키는 장내 병원균이다¹⁾. 이 균은 다른 비브리오속 균과 마찬가지로 estuarine 환경에 전세계적으로 널리 분포하고 있으며, 국내에서도 식중독 원인의 13.9%를 차지하고 있다²⁾.

장염비브리오균은 주로 위장염을 일으키며 2차적으로 창상감염을 일으키는 인체 병원균이다. 장염비브리오 식중독의 주요 증상은 설사, 복부 경련 및 욕지기이며, 주로 오염된 음식을 섭취한지 4~96시간 후에 증상이 발현되며 3~4일 지속되는 것이 특징이다³⁾.

*V. parahaemolyticus*의 아종 타이핑은 식중독 원인균을 추적하는 데 유용하며, 혈청형, 플라스미드형, 리보타이핑, RAPD-PCR 등이 널리 이용되고 있다.

*V. parahaemolyticus*의 항원에는 균체, 편모, 헤파의 3종류가 있으나, O 및 K의 조합에 의해 혈청형이 표시되나, 반응이 까다롭고 불분명할 때가 많기 때문에 형별분류에 주의하여야 한다⁴⁾.

*V. parahaemolyticus*의 병원성은 내열성 용혈소(TDH)와 관계가 있다^{5,6)}. TDH 생산균주는 카나가와 양성이며, Wagatsuma blood agar에서 베타형 용혈을 일으키는 것으로 알려져 있다. 그러나 많은 임상분리주가 카나가와 음성이며, TDH를 생산하지 않으므로, 결정인자가 아니다^{7,8)}. 이 열성 용혈소(thermolabile hemolysin : *tl*)는 Wagatsuma agar에서 용혈을 일으키지 않는 균주에서 특징적이다. 또한 이열성 용혈소는 모든 장염비브리오균에 발견되지만, 인체에서 병원성을 일으키는 것으로 보고되어 있지 않다⁹⁾.

RAPD법은 간단하고 신속하다는 장점이 있다. 이 방법은 임의적인 효소중합반응에서 단일 primer를 사용하여 genomic DNA sequence를 시험관내에서 증폭하는 것에 기초한 것이다¹⁰⁾.

플라스미드 profiling은 각종 비브리오균의 역학 조사방법으로서 한정된 가치가 인정되었다¹¹⁾. 이것은 장내세균과 세균 특히 살모넬라의 결과와 상

반된다¹²⁾. 또한 플라스미드의 제한효소 분석에 의한 분석도 여러 가지 아형을 만들어낸다. 그러므로 역학적 표식자로서 또한 균종간 분류법으로서 유용한 가치가 있다^{13,14)}.

본 연구는 2001년 서울시내 식중독환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus*에 대한 항생제 감수성, hemolysin gene 및 RAPD-PCR 패턴을 조사함으로써, *V. parahaemolyticus*의 분자생물학적 특성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험균주

2001년 서울시내에서 식중독 환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 34주를 시험 균주로 하였다. 시험균주는 1% peptone-30% glycerol에 진하게 푼 후 -70℃에 저장하여 시험에 사용하였다.

시험균주는 API 20E에 의한 생화학 시험에 의해 *V. parahaemolyticus* 균을 확인하였으며, *V. parahaemolyticus* 항혈청(Denka Seiken)에 의해 혈청학적 동정을 하였다.

2. 항생제 감수성 시험

*V. parahaemolyticus*의 항균제에 대한 감수성 시험은 Kirby-Bauer의 disc diffusion method에 의하여 실시하였다.²⁾ 항균제 감수성 검사용 디스크는 BBL사의 제품으로 nalidixic acid (NA, 30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC 20/10 µg), ampicillin(AM, 10µg), cephalothin(CF, 30µg), chloramphenicol(CM, 30µg), Gentamicin(GM, 10µg), kanamycin(KM, 30µg), streptomycin(SM 10µg), tetracycline(TE, 30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT, 1.25/23.75µg), amikacin(AN, 30µg), ciprofloxacin(CIP, 5µg), ampicillin/sulbactam (SAM, 10/10µg), ceftriaxone(CRO, 30µg), cefoxitin(FOX, 30µg), and ticarcillin(TIC, 75 µg) 등 16종의 항균제에 대하여 조사하였으며, 감수성은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)¹⁵⁾의 기준에 의

하여 판정하였다.

3. DNA 정제

V. parahaemolyticus DNA의 정제는 Ausubel 등¹⁶⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉 *V. parahaemolyticus*균을 하루밤 진탕배양한 균액 5ml를 원심분리하여 집균하고, Tris-EDTA buffer(10mM Tris · Cl(pH 8.0), 1mM EDTA) 567 μ l에 부유시켰다. 10% sodium dodecyl sulfate 30 μ l, proteinase K(Sigma)(20mg/ml) 3 μ l 및 RNase(Sigma)(mg/ml)를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 5M NaCl 100 μ l 및 hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 80 μ l를 가하고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, 동량의 chloroform-isoamyl alcohol(24:1, v/v)을 넣고 잘 흔들어 섞고, 원심분리하여 1차 추출한 후 동량의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25:24:1, v/v)로 2차 추출하였다. DNA는 0.6 용량의 100% 냉 isopropyl alcohol로 침전시키고 -20 $^{\circ}$ C에서 하루밤 반응시킨 후, 70% 냉 ethanol 1ml로 세척하고 Speedvac으로 10분간 건조시켰다. DNA는 Tris-EDTA buffer (pH 8.0)로 녹인 후, spectrophotometer(Beckman DU650)로 농도를 측정하였다.

4. hemolysin gene의 확인

PCR에 의한 *V. parahaemolyticus*의 hemolysin 확인은 Bej 등¹⁷⁾의 방법에 따라 실시하였다. 반응액은 Premix(Takara)를 이용하여 하였으며, primer는 (주) 바이오니아에 주문 생산한 것을 사용하였다. hemolysin gene에 대한 primer는 다음과 같았다 : tl gene(L-tl:5'-aaageggattatgcaagaagcactg-3', R-tl:5'-gctactttctagcattttctctgc-3'), tdh gene(L-tdh: 5'-gtaaaggtctctgactttggac-3, R-tdh:5'-tggaatagaacctcatcttcacc-3'), trh gene(L-trh: 5'-ttgcttcgatattttcagtatct-3', R-trh:5'-cataacaacatatgccatttccg-3'). PCR 증폭은 DNA thermal cycler (Perkin Elmer 9600)를 사용하였으며, 다음과 같은 반응조건으로 PCR을 하였다: 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기 denaturation을 한 후 94 $^{\circ}$ C 1분, 58 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분을 30회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 5분간

추가반응을 시켰다. PCR 생성물은 1% agarose에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 transilluminator(Vilber Lourmat)로 밴드를 확인하였다.

5. plasmid

*V. parahaemolyticus*의 플라스미드는 Kado 및 Liu 방법¹⁸⁾에 의해 실시하였다. 즉 실험균주를 brain heart infusion 배지 3ml에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 배양한 균액을 원심분리하여 집균하였다. 집균한 균체는 TE buffer(40mM Tris-acetate, 2mM EDTA pH 7.9) 200 μ l에 부유시킨 후 lysing solution(50mM Tris, 3% sodium dodecyl sulfate pH 12.4) 400 μ l를 가하고 55 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후 phenol-chloroform(1:1) 용액 600 μ l씩을 가하고 혼합되도록 천천히 흔들었다. 원심분리하여 상층액을 분리한후 2배 용량의 ethanol과 1/10 용량의 3M sodium acetate 용액을 가하고, -20 $^{\circ}$ C에서 하루밤 정치한 다음 원심분리하여 상층액은 버렸다. 침전물은 증류수 15 μ l에 용해한 후, loading buffer(50% glycerol-0.005M Tris acetate pH7.9-bromocresol purple 0.25%) 3 μ l를 가하고 전기영동용 재료로 삼았다.

전기영동은 0.8% agarose submarine electrophoresis(mupid, Cosmo, Ltd.)로 하였다. Trisborate(89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA pH 8.0) 하에서 50V로 90분간 전기영동하였다. DNA 밴드는 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)를 함유한 증류수 용액에서 30분간 염색하였으며, UV transilluminator (Vilber Lourmat)로 밴드를 확인하였다.

6. RAPD-PCR

RAPD-PCR은 Ready To-Go RAPD analysis kit(Amersham Biosciences 27-9502-01)을 사용하여 실시하였다. 즉 kit에 존재하는 primer 1(5'-GGTGCGGAAI-3')과 primer 4(5'-AAG-AGCCCCGT-3')를 primer로 활용하고, 미리 제조된 Ready To-Go beads를 사용하여 PCR을 하였다. DNA template 2 μ l, Primer 5 μ l, 증류수

18 μ l를 사용하여 최종 25 μ l가 되도록 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 95 $^{\circ}$ C 1분, 36 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분을 45회 실시하였다. 생성된 PCR 산물은 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide를 함유한 1X TAE를 사용하여 만든 2% agarose gel에 전기영동하고 transilluminator로 확인하였다. 산물의 크기는 100bp molecular weight ladder(DNA Molecular Weight Marker XIV: Boehringer Mannheim)를 사용하여 측정하였다.

결 과

1. 항생제 감수성

V. parahaemolyticus 34주의 16종 항균제에 대한 감수성은 Table 1과 같았다. 즉 AM에 대하여 88.2%(30주)의 가장 높은 내성을 나타내었으며, TIC 35.3%(12주), AMC 20.6%(7주), CF

5.9%(2주)의 내성을 나타낸 반면, CM, NA, TE, SAM 및 SXT은 모두 감수성을 나타내었고, CIP 및 CRO 각 97.1%(33주), FOX 91.2%(31주), AMC 67.6%(23주), AN 58.8%(20주), KM 44.1%(15주), CF 17.6%(6주)의 감수성을 나타내었다. 그러나 SM은 34주 모두 중등도 내성을 나타내었으며, CF 76.5%(26주), TIC 64.7%(22주), KM 55.9%(19주), AN 41.2%(14주) 등은 중등도 내성이 매우 높았다.

*V. parahaemolyticus*의 다제내성 양상은 Table 2와 같았다. 즉 AM 단제내성이 17주(50%)로 가장 많았으며, AMC내성 2주(5.9%), AM-TIC 내성 7주(11.8%), AM-AMC 및 CF-AM 내성 각 1주(2.9%), A-TIC-AMC 내성 3주(8.8%), CF-AM-TIC-AM 내성 1주(2.9%)이었다. 전체적으로 단제 내성이 19주(55.9%)를 차지하였으며, 2제내성 9주(26.5%), 3제내성 3주(8.8%), 4제 내성 1주(2.9%)이었다. 또한 32주

Table 1. Distribution of drug resistant rate of *V. parahaemolyticus* isolated from patients in Seoul

| | No of isolates(%) | | |
|-------------------------------|-------------------|--------------|-------------|
| | Resistant | Intermediate | Susceptible |
| Amikacin | 0 | 14(41.2) | 20(58.8) |
| Ampicillin | 30(88.2) | 4(11.8) | 0 |
| Ampicillin/clavulanic acid | 7(20.6) | 4(11.8) | 23(67.6) |
| Ampicillin/sulbactam | 0 | 0 | 34(100) |
| Cephalothin | 2(5.9) | 26(76.5) | 6(17.6) |
| Cefoxitin | 0 | 3(8.8) | 31(91.2) |
| Ceftriaxone | 0 | 1(2.9) | 33(97.1) |
| Chloramphenicol | 0 | 0 | 34(100) |
| Ciprofloxacin | 0 | 1(2.9) | 33(97.1) |
| Gentamicin | 0 | 0 | 34(100) |
| Kanamycin | 0 | 19(55.9) | 15(44.1) |
| Nalidixic acid | 0 | 0 | 34(100) |
| Streptomycin | 0 | 34(100) | 0 |
| Tetracycline | 0 | 0 | 34(100) |
| Ticarcillin | 12(35.3) | 22(64.7) | 0 |
| trimethoprim/sulfamethoxazole | 0 | 0 | 34(100) |

(94.1%)가 내성을 나타내어 매우 높은 내성 양상을 나타내었다.

Table 2. Multiple drug resistance patterns of *V. parahaemolyticus* isolate from patients in Seoul

| Multiple resistant pattern | No of isolates | |
|----------------------------|----------------|----|
| AM | 17 | 19 |
| AMC | 2 | |
| AM-TIC | 7 | |
| AM-AMC | 1 | 9 |
| CF-AM | 1 | |
| AM-TIC-AMC | 3 | 3 |
| CF-AM-TIC-AM | 1 | 1 |
| None | 2 | 2 |
| Total | 34 | 34 |

2. hemolysin

식중독 환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 의 PCR에 의한 hemolysin 분석 결과는 Table 3 및 Fig. 1과 같았다. *trh gene*은 0.5Kbp, *tl gene*은 0.45Kbp 그리고 *tdh gene*은 0.269Kbp의 크기를 나타내었다(Fig. 1). *trh*, *tl* 및 *tdh gene*을 모두 가진 균주는 28주(82.4%)이었으며, *trh* 및 *tl gene*을 갖고 있는 균주는 1주(2.9%), *trh* 및 *tdh gene*을 갖고 있는 균주는 3주(8.8%), *trh gene*만을 갖고 있는 균주는 2주(5.9%)이었다.

Table 3. Specificity of the multiplex PCR amplification of *tdh*, *tl*, *trh* target gene in *V. parahaemolyticus* isolated from foodborne patients

| Target gene of hemolysin | No. of isolates |
|-------------------------------------|-----------------|
| <i>trh</i> - <i>tl</i> - <i>tdh</i> | 28 |
| <i>trh</i> - <i>tl</i> | 1 |
| <i>trh</i> - <i>tdh</i> | 3 |
| <i>trh</i> | 2 |

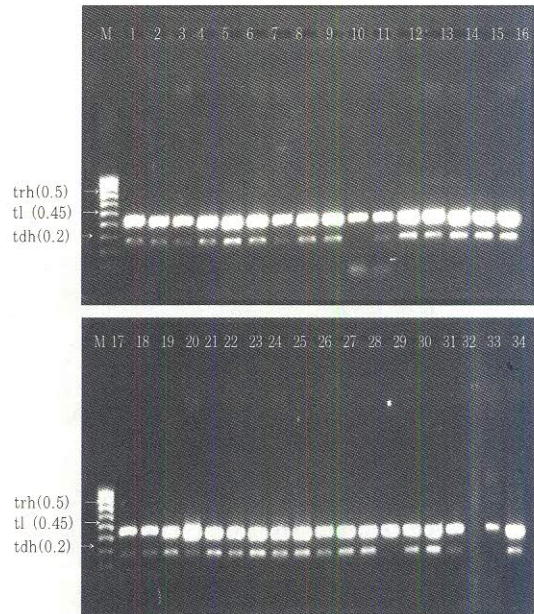


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis showing the results from PCR amplification of genomic DNA from *V. parahaemolyticus* isolated from patients.

4. RAPD-PCR

Ready To-Go RAPD Analysis kit의 primer 1을 사용하여 PCR을 한 결과는 Fig. 2와 같다. 주요한 밴드 크기는 2.2kb, 1.6kb, 1.0kb 및 0.8kb의 4밴드이었으며, 전체적으로 약 11종으로 분류되었다. 대부분 4종 이외에 최대 5종 및 최소 1종을 추가로 생산하고 있었다.

Ready To-Go RAPD Analysis kit의 primer 4를 사용하여 PCR을 한 결과는 Fig. 3과 같다. 주요한 밴드 크기는 primer 1과는 보다는 적게 생성되어 1.5kb, 0.9kb 및 0.7kb가 주종을 이루었으며, primer 1보다는 적은 밴드를 생성하였으며, primer 1과 같은 약 11종으로 분류되었다.

5. plasmid

식중독 환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 의 플라스미드 양상은 Fig. 4와 같았다. 즉 대부분의 균주에서 23kb의 플라스미드를 갖고 있었으며, 15kb, 10kb, 8kb, 6kb, 5kb, 3kb 등의 플라스미드를 함유하고 있었다. 가장 많은 플라스미드

를 가진 균주는 3개의 플라스미드를 갖고 있었으며, 단 1주에서만 검출되지 않았다.

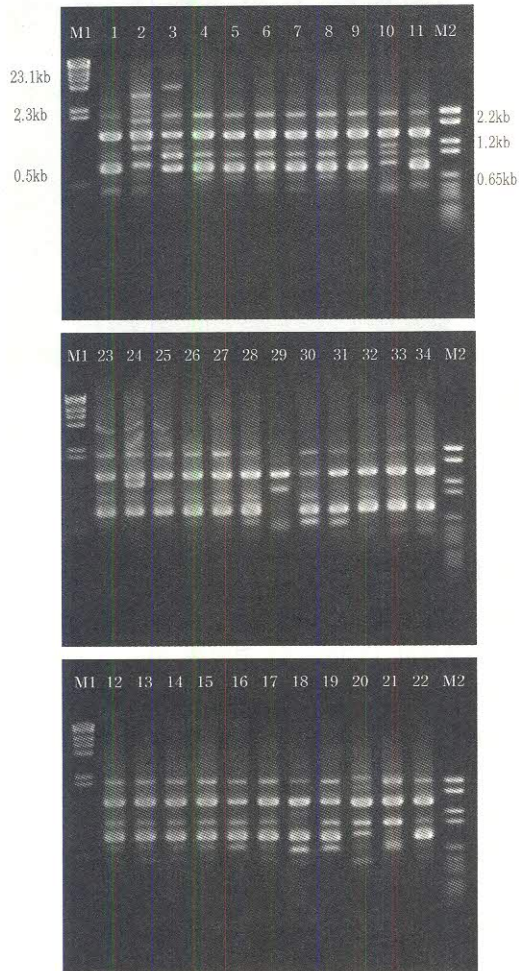


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis showing the results from PCR amplification of genomic DNA from *V. parahaemolyticus* isolated from patients by Ready To-Go RAPD analysis kit primer 1. M1: DNA molecular weight marker II(Boehringer Mannheim 236250), M2: DNA molecular weight marker VI(Boehringer Mannheim 1062590).

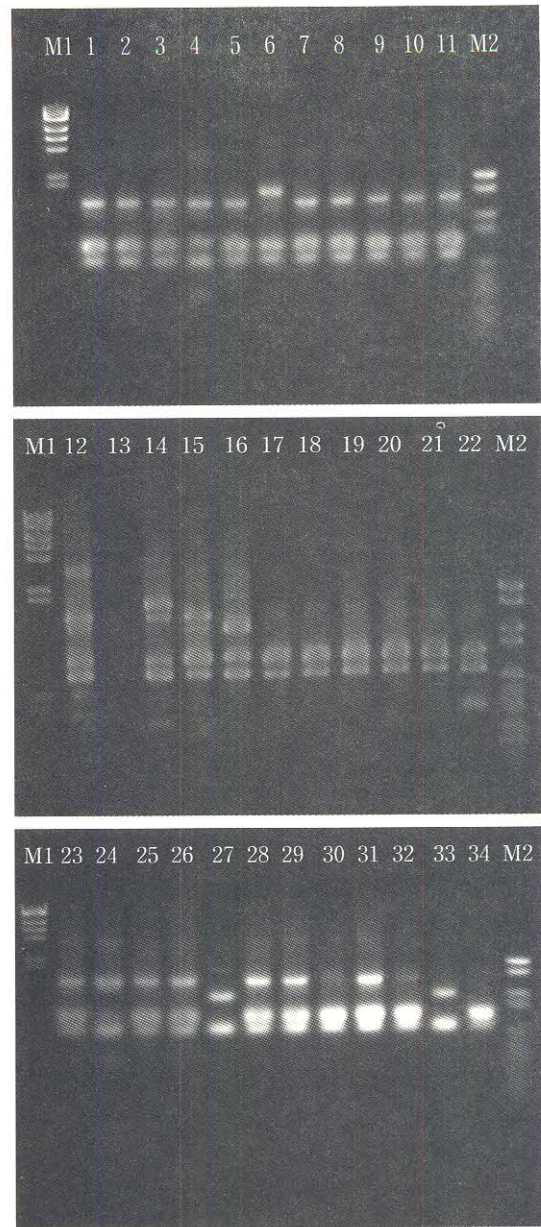


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis showing the results from PCR amplification of genomic DNA from *V. parahaemolyticus* isolated from patients by Ready To-Go RAPD analysis kit primer 4. M1: DNA molecular weight marker II(Boehringer Mannheim 236250), M2: DNA molecular weight marker VI(Boehringer Mannheim 1062590).

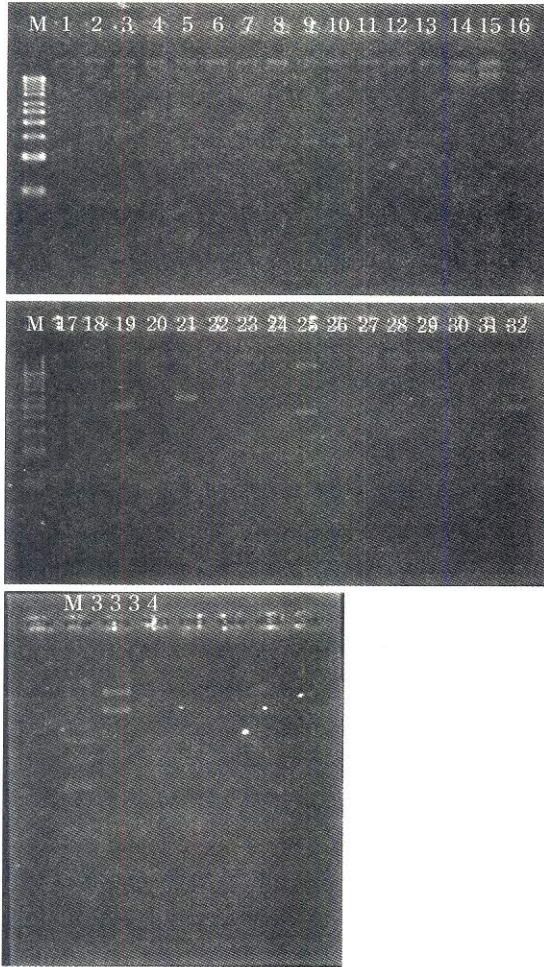


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis showing the results of plasmid from *V. parahaemolyticus* isolated from patients. M: DNA molecular weight marker II(Boehringer Mannheim 236250), M2: DNA molecular weight marker VI (Boehringer Mannheim 1062590).

고 찰

Rep-PCR genomic fingerprinting은 대부분의 그람 음성균과 일부 그람 양성균의 genome에 multiple copy로 존재하는 매우 안정성 있으며, 반복적인 DNA 배열에 상보적인 DNA primer를 이용한다. 3종류의 유용한 반복배열이 확인되었는

데 35-40bp repetitive extragenic palindromic (REP) sequence, 124-127bp enterobacterial repetitive intergenic consensus(ERIC) sequence 및 154bp BOX element이다. 이 배열은 genome 주변 별개의 유전자 사이에 위치하고 있다. 증폭된 분획은 agarose gel에서 전기영동되어 rep-PCR genomic fingerprint에 의한 윤곽을 얻을 수 있다¹⁹⁾.

Polymorphic DNA의 random amplification (RAPD)에 기초하며 생물학에서 광범위하게 이용되는 신속 genomic typing법이 Welsh와 McClelland²⁰⁾와 Williams 등²¹⁾에 의해 개발되었다. 이것은 genome 내에 있는 multiple location에서 annealing하고 시발할 수 있는 짧은 임의선별된 primer가 template DNA의 증폭된 증폭산물 특성의 스펙트럼을 생산할 수 있다는 점에서 매우 유용한 fingerprint법이다. 확립된 RFLP fingerprinting 법에 의한 polymorphism의 검출에는 target DNA 서열이나 probe를 미리 알아야 하지만, RAPD는 임의적으로 선택된 oligonucleotide primer로 모든 genome을 증폭시킬 수 있다²²⁾. 이러한 접근은 여러 가지 세균을 감별하는데 이용되고 있다²³⁻²⁵⁾.

본 실험에서 사용한 Amersham Biosciences에서 제조된 Ready To-Go RAPD Analysis kit는 이와 같은 RAPD에 의한 시험 균주를 비교하는데 매우 유용하였다. 특히 Wong 등²⁶⁾은 primer 284를 이용하여 타이완의 식중독 환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus*에서 분자학적 타이핑이 가능하였다고 하였으나, 본 실험에서는 분리되지 않았으며, 오히려 primer 1을 이용한 타이핑이 가장 우수하였으며, primer 4를 이용한 타이핑은 primer 1보다 떨어졌다. 이와 같은 결과는 지역적 차이 및 균의 특성에 의한 것으로 추정된다. 따라서 본 실험에서는 primer 1과 4를 활용하였지만 나머지 4종의 primer를 활용하여 비교하면 훌륭한 타이핑자료가 될 것으로 추정된다.

Wong과 Lin²⁷⁾은 *V. parahaemolyticus*에 대한 RS, RDP 및 ERIC 타이핑을 한 결과 ERIC 타이핑이 가장 우수하다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 그다지 타이핑 능력이 우수한 것으로 나

타나지 않아 본 실험과 상반된 결과를 나타내었으며, Hoi 등²⁸⁾은 *V. vulnificus* 균에 대한 16S와 23S rRNA에 대한 리보타이핑과 RAPD를 비교한 결과 RAPD의 우수성을 비교하였으며, Warner와 Oliver²⁹⁾는 *V. vulnificus*의 RAPD를 조사한 결과 영양결핍상태에서 자란 균주와 영양이 풍부한 상태에서 자란 균에 차이를 RAPD에 의해 타이핑할 수 있음을 보고하여 앞으로의 실험에 중요한 단서를 제공하고 있다. 이와같이 RAPD에 의한 타이핑은 주변 상황에 매우 민감하게 반응하고 있기 때문에 앞으로 많은 실험을 통해 계속 타이핑을 해야 할 것으로 추정된다.

식중독환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 균은 모두 hemolysin에 대한 gene을 갖고 있었다. 그러나 모든 균이 모든 gene을 갖는 것이 아니라 6주에서는 2종 또는 1종의 gene 만을 함유하고 있어 매우 재미있는 현상을 제시하였다. 그러나 어류 및 해수에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 균에서는 hemolysin gene이 검출되지 않아 비병원성균임을 확인할 수 있었으나, 원인을 제공하는 어류나 해수에서 hemolysin gene이 검출되지 않았기 때문에 어디에서 hemolysin gene을 획득하는지에 대한 의문이 남아 있어 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한편 본 실험에서 사용한 균주는 식중독 환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 균이기 때문에 병원성을 모두 갖고 있다고 생각된다. 따라서 병원성 플라스미드로 생각되는 23kb 크기의 플라스미드가 거의 모든 균주에서 검출된 것으로 생각되며, 그 이외 크기의 플라스미드는 병원성과는 관계가 없는 것으로 생각된다. 그러나 비병원성 균주에서는 플라스미드가 거의 분리되지 않는 점과 항생제 내성 전달에 대한 플라스미드를 조사하지 않았기 때문에 23kb 플라스미드가 병원성과 항생제 내성 전달에 모두 관여하는지는 확인할 수 없었다. 따라서 플라스미드 제거에 의한 항생제 감수성 양상을 조사한다면 좀 더 확실한 결과를 알 수 있을 것으로 생각된다.

이상과 같은 결과를 종합하면, 식중독 환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus*는 식중독 예방을 위한 중요한 자료를 제공하고 있으며, 지금까지

사용한 생화학적 특성 및 혈청학적 특성 이외에 분자생물학적 특성을 비교하는 것은 역학조사자료로서 매우 중요하며, 이와 같은 분자생물학적 특성을 실험 방법에 따라 매우 다양하기 때문에 특별한 주의가 필요하며, 좀 더 다양한 자료가 수집되어야만 식중독 발생양상 및 전파 및 전염경로를 확인할 수 있기 때문에 더 많은 노력과 자료 수집이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

2002년도 서울에서 발생한 식중독 환자에서 분리한 34주의 *V. parahaemolyticus* 균에 대한 항생제 감수성, hemolysins gene 유무, RAPD analysis 및 plasmid 유무에 대한 조사를 실시한 결과, 모든 균주에서 hemolysin gene을 갖고 있었으며, Ready To-Go RAPD analysis kit (Amersham Biosciences)의 primer 1을 이용한 RAPD 타이핑이 가장 우수하였으며, 모든 균주는 hemolysin과 관련된 것으로 생각되는 플라스미드를 함유하고 있었다.

항생제 내성은 Ampicillin에 대한 항생제 내성이 88.2%, Ticarcillin에 대한 내성이 35.2%로 높았으며, Streptomycin에 대해서는 모든 균주가 중등도 내성을 나타내고, Ticarcillin, Cephalothin, Kanamycin 및 Amikacin에 대하여 40-77%의 높은 중등도 내성을 나타내었다. 또한 32주에서 1제 이상의 항생제 내성을 나타내었다.

참고문헌

1. Doyle, M.P.: Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York (1989)
2. 국립보건원: 2002년 전염병관리 사업지침. (2002)
3. 박석기, 황영옥, 정지현, 정윤태 : 식중독 미생물, 서울시 보건환경연구원(1999)
4. Denka Seiken: Bacteriology productin-

- formation. Denka Seiken Co., Ltd.(1999)
5. Honda, T., and Iida, T.: The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. Rev. Med. Microbiol., 4:106(1993)
 6. Kaysner, C.A., Tamplin, M.L., Twedt, R.M.: vibrio. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F.(Eds), Compendium of Methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association, Washington, D.C. 451 (1992)
 7. Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H., Fukushima, S., Takano, J., Nishibuchi, M., and Takeda, Y.: Detection of the thermostable direct hemolysin gene(*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene(*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. Mol. Cell Prob., 6:477(1992)
 8. Okuda, J., and Nishibuchi, M.: Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct hemolysin gene. Mol. Microbiol., 30:499 (1998)
 9. Taniguchi, H., Hirano, H., Kubomura, S., Higashi, K., and Muzuguchi, Y.: Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. Microb. Pathogen., 1:425(1986)
 10. Aznar, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. : Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes. System. Appl. Microbiol., 16:303(1993)
 11. Larsen, J.L., and Olsen, J.E.: Occurrence of plasmids in Danish isolates of *Vibrio anguillarum* serovars O1 and O2 and association of plasmids with phenotypic characteristics. Appl. Environ. Microbiol., 57:2158(1991)
 12. Borrego, J.J., Castro, D., Jimenez-Notario, M., Luque, A., Martinez-Manzanares, E., Rodriguez-Avial, C., and Picazo, J.J.: Comparison of epidemiological markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain. J. Clin. Microbiol., 30:3058(1992)
 13. Olsen, J.E., and Larsen, J.L.: Ribotypes and plasmid contents of *Vibrio anguillarum* strains in relation to serovar. Appl. Environ. Microbiol., 59:3863(1993)
 14. Olsen, J.E., Skov, M.N., Threlfall, E.J., and Brown, D. J. : Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype enteritidis documented by IS200, ribo-, pulsed field electrophoresis- and RFLP typing. J. Med. Microbiol., 28:97(1994)
 15. National Committee for Clinical Laboratory Standards : Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed., Approved standards M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, Pa.(1997)
 16. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Sideman, J., Smith, J., and Struhl, K.: Current protocols in molecular Biology, Wiley, New York (1987)
 17. Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D., and Kaysner, C.A.: Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J.

- Microbiol. Methods., 36:215(1999)
18. Kado, C.O., and Liu, S.T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145:1367(1981)
 19. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., and Lupski, J.R.: Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.*, 5:25 (1994)
 20. Welsh, J., and McClelland, M.: Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213(1990)
 21. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18:6581 (1990)
 22. Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., and Gresshoff, P.M.: DNA amplification fingerprintin: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. rep.*, 9:294 (1991)
 23. Hilton, A.C., Banks, J.G., and Penn, C.W.: Random amplification of polymorphic DNA(RAPD) of Salmonella: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J. Appl. Bacteriol.*, 81:575(1996)
 24. Miyata, M., Aoki, T., Inglis, V., Yoshida, T., and Endo, M.: RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.*, 79:181(1995)
 25. Pacheco, A.B., Ferreira, L.C., Pichel, M.G., Almeida, D.F., Binsztein, N., and Viboud, G.I.: Beyond serotypes and virulence-associated factors: detection of genetic diversity among O153:H45 CFA/I heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 39:4500(2001)
 26. Wong, H.C., Liu, C.C., Pan, T.M., Wang, T.K., Lee, C.L., and Shih, D.Y.C.: Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan, by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1809(1999)
 27. Wong, H.C., and Lin, C.H.: Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J. Clin. Microbiol.*, 39:4233 (2001)
 28. Hoi, L., Dalsgaard, A., Larsen, J.L., Warner, J.M, and Oliver, J.D.: Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:1674(1997)
 29. Warner, J.M, and Oliver, J.D.: Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3025(1998)