

완도해역 해수에서 분리한 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)의 항균제 내성 및 병원성 유전자의 특징

김태옥 · 엄인선 · 조상만¹ · 김희대² · 박권삼*

군산대학교 식품생명공학과, ¹군산대학교 해양생명과학과, ²충북도립대학 바이오생명의약과

Antimicrobial-resistance Profiles and Virulence Genes of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Seawater in the Wando Area

Tae-Ok Kim, In-Seon Eum, Sang-Man Jo¹, Hee-dai Kim²
and Kwon-Sam Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

¹Department of Marine Life and Aquaculture, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

²Department of Biotechnology and Biomedicine, Chungbuk Provincial College, Okcheon 373-807, Korea

Sixty-seven *Vibrio parahaemolyticus* isolates from surface seawater from the Wando area, on the southern coast of Korea, were analyzed for their susceptibility to 15 different antimicrobials and the presence of virulence genes. According to the disk diffusion susceptibility test, all of the strains studied were resistant to ampicillin and oxacillin, while decreasing percentages were resistant to vancomycin (64.2%), streptomycin (56.7%), amikacin (31.3%), kanamycin (22.3%), cephalothin (20.9%), erythromycin (10.4%), ciprofloxacin (4.5%), and tetracycline (3.0%). All of the strains were susceptible to five antimicrobials: chloramphenicol, gentamycin, nalidixic acid, sulfamethoxazole/trimethoprim, and trimethoprim. Fifty-nine isolates (88.1%) were resistant to three or more classes of antimicrobial and defined as multidrug resistant, and two strains were resistant to seven antimicrobial agents. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the 67 *V. parahaemolyticus* isolates to ampicillin and oxacillin ranged from 512–2,048 and 64–512 µg/mL, respectively. All 67 isolates were also examined for the presence of the *tdh* and *trh* virulence genes using the polymerase chain reaction (PCR). However, no isolates possessed either *tdh* or *trh*. The *VPA0477* (β -lactamase) gene, present in all of the tested strains, was validated as a new specific marker gene in PCR assays for the accurate detection and identification of *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, Antimicrobial resistance, Virulence genes, Minimum inhibitory concentration

서론

장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)는 비브리오과(Family Vibrionaceae)에 속하는 저도 호염성 해양세균으로 이 균에 오염된 어패류를 생식하거나 불충분하게 가열 처리된 수산물을 섭취하면 주로 설사, 복통, 구토, 오한 및 미열 등을 동반하는 급성위장염 증상을 유발하는 식중독 원인세균이다(Sakazaki et al., 1968; Honda and Iida, 1993). 식품의약품안전처의 식중독 통계시스템 자료에 의하면 2002년부터 2013년까지 12년간 우

리나라에서 발생한 장염비브리오에 의한 식중독 사고는 주로 여름철에 집중적으로 발생하며 사고건수 및 환자수는 전체 세균성 식중독 사고의 16.5% 및 8.2%를 차지하며, 사고건수로는 병원성대장균, 살모넬라에 이어 3위에 환자수로는 병원성대장균, 황색포도상구균, 살모넬라에 이어 4위를 차지하고 있다(MFDS, 2014). 소득향상과 건강에 대한 관심고조는 수산물에 대한 소비자의 선호가 증가하여 수산물 소비량은 꾸준히 증가하는 추세이다. 통계청 자료에 의하면 국민 1인당 연간 수산물 소비량은 2005년 49.5 kg, 2007년 56.5 kg, 2009년 49.8 kg

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0220>



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.

Kor J Fish Aquat Sci 47(3) 220-226, June 2014

Received 4 March 2014; Revised 29 April 2014; Accepted 27 May 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1822 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: parkks@kunsan.ac.kr

및 2011년 53.5 kg로 매년 다량의 수산물을 소비하고 있기 때문에 수산물의 안전성 확보는 국민보건상 절실히 필요하다(Statistics Korea, 2013).

장염비브리오는 수온이 17°C 이상으로 상승하는 하절기에는 자유 유행의 형태로 해수에서 쉽게 검출되나 수온이 10°C 이하로 낮아지면 해수에서의 검출빈도는 급격히 떨어지며 수온이 낮은 동절기에는 저질 또는 동물성 플랑크톤의 키틴질 등에 부착하여 월동한다고 보고되어 있다(Kaneko and Colwell, 1975). 해수 및 어패류 등의 자연계에서 분리한 대부분의 장염비브리오는 병원성 인자를 보유하고 있지 않은 비병원성 균주인 반면 식중독 사고의 환자 가검물에서 분리된 대부분의 장염비브리오는 병원성 균주이다(Sakazaki et al., 1968; Honda and Iida, 1993). 이 균이 생산하는 대표적인 병원성 독소는 내열성 용혈독(thermostable direct hemolysin, TDH), 내열성 용혈독 관련용혈독(TDH-related hemolysin, TRH), serine protease 및 type III secretion systems (TTSS 1 및 2)를 통해 분비되는 각종 effector 단백질 등이 보고되어 있으나 정확한 병원성 메커니즘에 관한 설명은 아직도 많이 부족한 실정이다(Honda and Iida, 1993; Lee et al., 2002; Makino et al., 2003; Park et al., 2004; Kodama et al., 2007; Kodama et al., 2008).

페니실린 발견 이후 다양한 종류의 항생제는 사람과 동물의 치료, 질병예방 및 성장촉진 등의 목적으로 사용되고 있다. 2012년 농림수산물검역검사본부(NVRQS, 2009)에 의하면 돼지, 소 및 닭 등 축산용 항생제 판매량은 2005년 이래 서서히 감소하는 추세인데 비해 수산용 항생제 판매량은 2009년 178톤, 2010년 203톤 및 2011년 239톤으로 오히려 사용량이 소폭 증가하고 있는 것으로 파악되고 있다. 수산용 항생제 판매실적은 oxytetracycline, erythromycin, amoxicillin, 설파계열, ciprofloxacin, ampicillin 순으로 집계되고 있다(NVRQS, 2009). 지속적이고 다량의 항생제 사용은 양식어류에서 다양한 항생제에 내성을 나타내는 장염비브리오의 증가를 가중시키는 결과로 나타나고 있다(Son et al., 2005; Lee et al., 2007; Oh et al., 2008; Lee et al., 2009; Ryu et al., 2010; Yu et al., 2010).

세균이 항생제 내성을 갖게 되는 이유는 분해효소에 의한 항생제의 불활성화, 표적 항생물질의 변화, 세포막의 항생제 투과성 변화 및 세포 밖으로 항생제의 유출 등의 다양한 방법에 의한 것으로 알려져 있으며 이들 메커니즘이 단독 또는 복합적으로 작용하여 세균은 항생제에 내성을 갖게 된다. 획득내성은 세균 염색체의 유전자변이, 플라스미드(plasmid) 또는 트랜스포존(transposon)에 매개되는 내성유전자의 획득에 의해 생기며, 내성 유전자는 염색체 또는 plasmid DNA에 존재한다(Kuhl et al., 1978). 그람 음성 세균에서 항생제 다제내성 유전자를 encoding하고 있는 integron은 세균 염색체에서 이동성을 가진 DNA 단편인 transposon을 통하여 유전자의 한 복제단위에서 다른 복제단위로 이동되는데 가장 일반적인 방법은 접합을 통하여 동종 및 이종 세균으로 확산된다고 보고되어 있다(Rowe-

Magnus and Mazel, 2002).

본 논문은 해수유래 장염비브리오의 각종 항균제 내성 양상 및 병원성 유전인자 보유성에 대한 기초자료를 수집하기 위하여 완도해역 해수에서 분리한 장염비브리오 67 균주를 대상으로 검토하였다. 또한 실험에 사용된 모든 균주에서 내성을 나타내는 ampicillin 및 oxacillin 항균제에 대해서는 최소발육억제 농도도 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

실험에 사용한 장염비브리오는 2011년 6월부터 2012년 10월 까지 전남 완도군 군외면 영흥리 연안 표층 해수에서 분리한 67 균주 및 장염비브리오 RIMD2210633 (Makino et al., 2003)를 표준 균주로 사용하였다. 항균제 감수성 결과의 정도 관리를 위하여 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923을 사용하였다. 해수 중의 장염비브리오는 식품공전이 제시한 방법에 준하여 분리하였다(MFDS, 2002). 해수 10 mL를 double strength alkaline peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) 10 mL에 접종하여 35°C에서 18-24시간 배양 후 Thiosulfate-citrate-bile salts (TCBS) agar (Difco, Detroit, MI, USA)에 한 백금이 희선 접종하여 35°C에서 18-24시간 배양하였다. TCBS 배지상에 장염비브리오로 추정되는 전형적인 3-5 mm 청록색 콜로니에 대해 oxidase 측정 및 API 20E Kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 생화학적 시험을 실시하여 일차적으로 장염비브리오로 동정하였다. 또한 유전학적으로 장염비브리오 동정에 사용되고 있는 *toxR* (Kim et al., 1999) 및 *hns* (No et al., 2011) 유전자의 존재유무는 PCR assay로 확인하였으며 이들 유전자 존재가 모두 확인된 균주에 한하여 최종적으로 장염비브리오로 동정하였다. 동일 균주의 중복분리를 배제하기 위하여 하나의 해수 시료에서 하나의



Fig. 1. Location of sample collection stations in Yeonghueng-ri, Wando coast, between June 2011 and October 2012.

Table 1. Primers used in this study

Target gene	Oligonucleotide sequence	Amplicon size (bp)	References
<i>toxR</i>	5'-AGCCCGCTTTCTTCAGACTC-3' 5'-AACGAGTCTTCTGCATGGTG-3'	399	Kim et al., 1999
TDH	5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3' 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTACC-3'	269	Lee and Park, 2010
TRH	5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3' 5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3'	486	Lee and Park, 2010
<i>hns</i>	5'-AAACACGTTAACCTATTAATAGG-3' 5'-AACGGGAGCCTTTTTAAACAAGA-3'	465	No et al., 2011
VPA0477	5'-ATGAAAAAGTTATTCCTGTTG-3' 5'-TTAACTTTCTTTGTAGTGCTC-3'	852	Lee and Park, 2010

장염비브리오를 분리하였다. 동정된 장염비브리오는 Luria-Bertani (tryptone 1%, yeast-extract 0.5%, NaCl 3%) broth에 배양한 후 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 유전자 증폭을 위한 각종 효소류는 Takara (Japan)사의 제품, 항생제 디스크는 Becton Dickinson (BBL Sensi-Disk, Sparks, MD, USA)사의 제품, ampicillin과 oxacillin의 항생제는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다.

DNA 증폭용 primer set

실험에 사용한 DNA 증폭용 primers의 염기서열 및 증폭에 상 DNA 크기 등은 Table 1에 제시하였다. Primers는 Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰 합성하였다. TDH, TRH, *toxR* 및 *hns* 유전자 DNA 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C에서 1회 3분 열 변성 후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초를 한 단위로 하여 이를 30회 반복하여 DNA를 증폭하였으며, VPA0477 (β -lactamase) 유전자는 95°C에서 1회 3분 열 변성 후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분을 한 단위로 하여 이를 30회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4, France)사의 Gel-Doc system으로 관찰하였다.

항균제 감수성 시험

균주의 항균제 감수성은 Acar and Goldstein (1991)의 디스크 확산법과 미국 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002)에 준하여 시험하였다. 식염 3% 첨가된 LB broth에 시험 균주를 접종하여 35°C에서 하룻밤 배양한 후 멸균생리식염수로 2회 세정하고 농도를 McFarland 0.5로 조정하여 Muller Hinton Agar (Merck, Germany) 평판에 도말하였다. 여기에 검사 항균제 디스크를 고착하여 35°C에서 18시간 배양한 후 각 항균제에 의해 형성된 생육저지환의 크기를 측정하고 표준지표에 따라 감수성 여부를 평가하였다. 시험 항균제는 amikacin (AN; 30 μ g), ampicillin (AM; 10 μ g), cepha-

lothin (CF; 30 μ g), chloramphenicol (C; 30 μ g), ciprofloxacin (CIP; 5 μ g), erythromycin (E; 15 μ g), gentamicin (GM; 10 μ g), kanamycin (K; 30 μ g), nalidixic acid (NA; 30 μ g), oxacillin (OX; 1 μ g), streptomycin (S; 10 μ g), sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT; 23.75/1.25 μ g), tetracycline (TE; 30 μ g), trimethoprim (T; 5 μ g), vancomycin (VA; 30 μ g) 등 15종의 항균제 디스크를 사용하였다.

최소발육억제 농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

시험 균주의 최소발육억제농도는 미국 NCCLS에 기초하여 변법으로 측정하였다. 멸균된 Muller Hinton broth (Merck, Germany)에 1 μ g/mL에서 4,096 μ g/mL까지 농도를 달리한 ampicillin 및 1 μ g/mL에서 1,024 μ g/mL까지 농도를 달리한 oxacillin을 첨가한 후 멸균된 소형시험관에 각 농도의 항생제가 첨가된 배지를 2 mL씩 분주하였다. 여기에 식염이 3% 첨가된 Luria-Bertani (LB) broth에서 하룻밤 전 배양한 시험균액 3 μ L을 접종하여 35°C에서 18시간 정지 배양한 후 균 증식여부는 육안으로 확인하였다.

결과 및 고찰

해수분리 장염비브리오의 특성

일반적으로 임상분리 장염비브리오의 대부분은 이 균의 대표적인 병원성 인자인 TDH 또는 TRH 유전자를 보유하고 있는데 비해 해수 및 어패류 등의 환경유래 장염비브리오에는 이들 병원성 유전자 보유율은 매우 낮은 것으로 보고되어 있다 (Shirai et al., 1990). 그러나 새로운 검출방법의 개발로 인하여 환경 유래 장염비브리오에서도 병원성 유전자를 보유하고 있는 균주 검출율은 높아지고 있는 추세이다 (Deepanjali et al., 2005; Jones et al., 2012; Ellingsen et al., 2013; Gutierrez et al.,

2013). 해수 유래 장염비브리오의 항균성 내성 양상 및 병원성 유전자 보유성을 검토하기 위하여 2011년 6월부터 2012년 10월까지 전남 완도군 근외면 영흥리 연안의 표층해수에서 API 20E Kit등을 이용하여 71균주의 장염비브리오를 분리하였다. 이들 균주를 대상으로 장염비브리오 동정을 위한 특이 유전자로 알려져 있는 *toxR* (Kim et al., 1999) 및 *hns* (No et al., 2011) 유전자의 존재유무를 PCR assay로 확인하였다. 그 결과 67균주에서는 이들 유전자의 예상 DNA 증폭산물과 유사한 크기의 DNA 단편이 확인되었으나 나머지 4균주에서는 *toxR* 및 *hns* 유전자 모두 증폭이 확인되지 않았다(자료 미제시). 이 결과는 *toxR* 및 *hns* 유전자 증폭이 확인되지 않은 4균주는 장염비브리오가 아닌 것으로 판명되었기에 실험에 사용하지 않았다. 과거 대부분의 연구에서 장염비브리오 동정을 API 20E Kit를 포함한 생화학적 결과만으로 동정한 사례가 많았기 때문에 장염비브리오가 아닌 비브리오속의 균주가 실험에 포함됐을 가능성이 내포된다. 따라서 장염비브리오 동정의 정확성을 높이기 위해서는 생화학적 결과를 포함한 *toxR* 및 *hns* 유전자의 존재유무까지 확인하는 것이 반드시 필요하다 하겠다. 67균주를 대상으로 병원성 유전자(TDH 및 TRH)의 존재유무는 Table 1에 제시한 primer를 사용하여 PCR assay로 검토한 결과 67모든 균주는 TDH 및 TRH 유전자를 보유하지 않은 비병원성 장염비브리오로 확인되었다(자료 미제시).

장염비브리오의 항균제 내성

해수 및 어패류 등 다양한 환경시료에서 분리한 장염비브리오

Table 2. Antimicrobial susceptibility and resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from surface seawater in Wando area

Antimicrobials	No. of isolates		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin (AN)	21	35	11
Ampicillin (AM)	67	0	0
Cephalothin (CF)	14	28	25
Chloramphenicol (C)	0	0	67
Ciprofloxacin (CIP)	3	49	15
Erythromycin (E)	7	46	14
Gentamicin (GM)	0	8	59
Kanamycin (K)	15	45	7
Nalidixic acid (NA)	0	3	64
Oxacillin (OX)	67	0	0
Streptomycin (S)	38	22	7
Sulfamethoxazole /Trimethoprim (SXT)	0	2	65
Tetracycline (TE)	2	4	61
Trimethoprim (T)	0	0	67
Vancomycin (VA)	43	11	13

오는 ampicillin, cephalothin, amikacin, cefoxitin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, vancomycin 등의 단독 항균제에 내성을 나타낼 뿐만 아니라 다제 내성균의 검출빈도도 높은 것으로 보고되어 있다(Son et al., 2005; Lee et al., 2009; Ryu et al., 2010; Han et al., 2012). 완도해역 해수에서 분리한 장염비브리오 67균주를 대상으로 15종의 항균제에 대한 감수성 여부를 디스크 확산법으로 측정한 결과는 Table 2에 제시하였다. 15종의 항균제 중 10종의 항균제는 일부 또는 모든 균주에서 내성을 나타내었으며, chloramphenicol, gentamicin, nalidixic acid, sulfamethoxazole/trimethoprim 및 trimethoprim 등 5종의 항균제는 거의 모든 균주에서 감수성을 나타내었다. 특히, 실험에 사용된 67균주 전부는 ampicillin과 oxacillin에 내성을 나타내었다. 내성율이 높은 항생제 순서는 ampicillin과 oxacillin에 이어 43균주에서 내성을 나타내는 vancomycin (64.2%), 38균주에서 내성을 나타내는 streptomycin (56.7%), 21균주에서 내성을 나타내는 amikacin (31.3%), 15균주에서 내성을 나타내는 kanamycin (22.4%), cephalothin (20.9%), erythromycin (10.4%), ciprofloxacin (4.5%) 및 tetracycline (3.0%) 순서였다. 본 연구에 사용된 항균제 중 vancomycin은 그람 양성균에는 항균효능을 나타내나 그람 음성균에는 항균효능이 적기 때문에 내성을 나타내는 장염비브리오가 많은 것으로 사료된다.

실험에 사용한 67균주는 chloramphenicol와 trimethoprim에는 100% 감수성을 나타내었으며, sulfamethoxazole/trimethoprim (97.0%), nalidixic acid (95.5%), tetracycline (91.0%), gentamicin (88.1%) 순으로 감수성을 나타내었다. 이 결과는 각종 항균제에 대한 장염비브리오의 내성 및 감수성 비율은 분리원, 분리시기 및 분리장소 등의 요인에 따라 차이가 있다는 기존의 연구결과와 거의 일치하는 경향이다(Son et al., 2003; Son et al., 2005; Lee et al., 2007; Lee and Park, 2010; Ryu et al., 2010; Han et al., 2012).

장염비브리오의 다제 항균제 내성

실험에 사용한 67균주에 대한 다제 항균제 내성에 관한 결과는 Table 3에 나타내었다. Ampicillin과 oxacillin의 2종의 항균제에 대해서 67균주에서 내성(100.0%)을 보이며, 여기에 1종의 항균제 즉 전체 3종의 항균제에 내성을 보이는 균주는 8주 (11.9%), 4종의 항균제에 내성을 보이는 균주는 26주(38.8%), 5종의 항균제에 내성을 보이는 균주는 19주(28.4%), 6종의 항균제에 내성을 보이는 균주는 4균주(6.0%) 및 7종의 항생제에 내성을 보이는 균주는 2균주(3.0%) 였다. 3종 또는 그 이상의 항균제에 대한 내성을 나타내는 다제 내성균은 전체 59균주 (88.1%)로 상당히 높은 비율을 차지하고 있었다(Table 3). 가장 높은 빈도의 항균제 내성조합은 AM-OX-VA-S로 14균주 (20.9%) 이며, 다음으로 AM-OX-VA-S-CF의 5균주(7.5%) 및 AM-OX-VA-S-K의 4균주(6.0%)로 파악되었으며 기타 항균제 내성조합 빈도는 3균주 이하로 매우 낮은 편이었다(Table 3).

장염비브리오의 ampicillin 및 oxacillin의 최소발육억제농도 측정

67균주에 대한 ampicillin 및 oxacillin에 대한 최소발육억제농도(MIC)를 측정된 결과는 Table 4 및 5에 나타내었다. Table 4에 나타낸 바와 같이 ampicillin의 경우, 2,048 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 20균주(29.8%), 1,024 µg/mL의 MIC를 나

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from surface seawater in Wando area

Resistance type	No. of resistant strains
AM-OX	67
AM-OX-AN	1
AM-OX-K	2
AM-OX-VA	2
AM-OX-CIP	1
AM-OX-CF	1
AM-OX-E	1
AM-OX-VA-S	14
AM-OX-VA-AN	2
AM-OX-VA-K	2
AM-OX-S-AN	2
AM-OX-S-K	1
AM-OX-S-CF	1
AM-OX-VA-CF	1
AM-OX-AN-K	2
AM-OX-AN-E	1
AM-OX-VA-S-CF	5
AM-OX-VA-S-K	4
AM-OX-VA-S-AN	3
AM-OX-VA-S-E	1
AM-OX-VA-AN-CF	1
AM-OX-VA-AN-E	2
AM-OX-VA-AN-K	1
AM-OX-S-AN-CF	1
AM-OX-S-K-CIP	1
AM-OX-VA-S-AN-CF	1
AM-OX-VA-S-CF-CIP	1
AM-OX-VA-AN-CF-E	1
AM-OX-S-AN-K-E	1
AM-OX-VA-S-AN-K-TE	1
AM-OX-VA-S-AN-CF-TE	1
Total	126

AM, ampicillin; OX, oxacillin; AN, amikacin; K, kanamycin; VA, vancomycin; CIP, Ciprofloxacin; CF, cephalothin; E, Erythromycin; S, streptomycin; TE, Tetracycline.

타내는 균주는 28균주로 전체의 41.8%를 차지하였다. 512 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 19균주(28.4%)였다. 실험에 사용한 장염비브리오 67균주의 ampicillin에 대한 최소발육억제농도의 평균치는 1,184 µg/mL로 확인되었다(Table 4). 이 결과는 자연계에서 분리한 장염비브리오는 일반적으로 ampicillin에 고도내성을 나타내고 있다는 기존의 결과와 대체로 유사하다(Tanil et al., 2005; Lee et al., 2007; Ferrini et al., 2008; Lee et al., 2009; Lee and Park, 2010; Lee et al., 2011).

또한 oxacillin에 대한 최소발육억제농도를 측정된 결과, 512 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 3균주(4.5%), 256 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 4균주(6.0%), 128 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 23균주(34.3%) 및 64 µg/mL의 MIC를 나타내는 균주는 37균주(55.2%)로 최소발육억제농도의 평균치는 117.5 µg/mL로 확인되었다(Table 5). 장염비브리오의 oxacillin에 대한 최소발육억제농도는 ampicillin에 비해 약 10배 정도 낮은 농도인 것으로 확인되었다.

장염비브리오의 ampicillin 내성유전자 VPA0477 (β-lactamase)의 존재유무를 PCR assay로 확인한 결과 실험에 사용한 모든 균주에서 양성으로 확인되었으며, 일부 균주에 대한 PCR assay 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 이 결과는 장염비브리오에 존재하는 VPA0477 유전자는 장염비브리오 동정을 위한 표적유전자로 활용될 가능성이 제기된다.

본 실험에 제공된 완도해역에서 분리한 67균주 장염비브리오는 모든 균주에서 ampicillin 및 oxacillin에 내성을 나타낼 뿐만 아니라 다수의 항균제에 대해서도 내성 보유현상이 보편화되어 있다는 점에서 장염비브리오의 항균제 내성에 관한 꾸준한 모니터링 및 감시가 필요하다고 판단된다. 또한 다양한 항균제 내성 유전자의 동정 및 염색체 DNA상에서의 존재양상 등의 파악은 내성유전자의 획득 및 확산 메커니즘을 이해하는데 큰 도움

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) to ampicillin of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from surface seawater in Wando area

MIC to ampicillin (µg/mL)	Ratio (%)
2,048	20/67 (29.8)
1,024	28/67 (41.8)
512	19/67 (28.4)

Table 5. Minimum inhibitory concentrations (MIC) to oxacillin of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from surface seawater in Wando area

MIC to oxacillin (µg/mL)	Ratio (%)
512	3/67 (4.5)
256	4/67 (6.0)
128	23/67 (34.3)
64	37/67 (55.2)

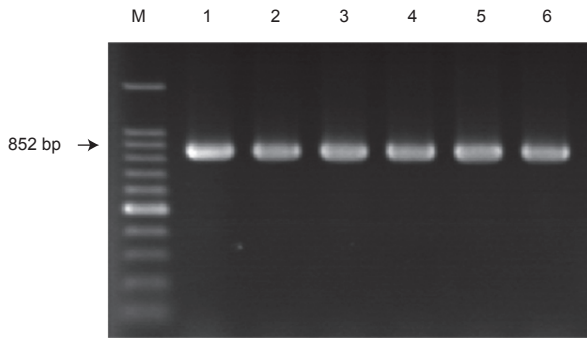


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified in PCR using VPA0477 primers. M, 100 bp ladder marker; lane 1, RIMD2210633; lane 2, strain 3; lane 3, strain 10; lane 4, strain 41; lane 5, strain 61; lane 6, strain 17.

이 될 것으로 기대된다.

사 사

이 연구는 농림수산물부 수산실용화기술개발 사업에 의해 이루어진 것이며, 현장조사에 적극 협조하여 주신 영흥어촌계 원 여러분께 깊이 감사 드립니다.

References

Acar JF and Goldstein FW. 1991. Disk susceptibility test. In: Antibiotics in Laboratory Medicine, Lorian V, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 17-52.

Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I and Karunasagar I. 2005. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Appl Environ Microbiol* 71, 3575-3580.

Ellingsen AB, Olsen JS, Granum PE, Rørvik LM and González-Escalona N. 2013. Genetic characterization of *trh* positive *Vibrio* spp. isolated from Norway. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 1-10.

Ferrini AM, Mannoni V, Suffredini E, Cozzi L and Croci L. 2008. Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. *Food Anal Methods* 1, 164-170.

Gutierrez West CK, Klein SL and Lovell CR. 2013. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. *Appl Environ Microbiol* 79, 2247-2252. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03792-12>.

Han AR, Yoon YJ and Kim JW. 2012. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Kyunggi-Incheon coastal area. *Korean J Microbiol* 48, 22-28.

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.

Jones JL, Ludeke CH, Bowers JC, Garrett N, Fischer M, Parsons MB, Bopp CA and DePaola A. 2012. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol* 50, 2343-2352. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00196-12>.

Kaneko T and Colwell RR. 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Appl Microbiol* 29, 269-274.

Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S and Nishibuchi M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol* 37, 1173-1177.

Kodama T, Hiyoshi H, Gotoh K, Akeda Y, Matsuda S, Park KS, Cantarelli VV, Iida T and Honda T. 2008. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Infect Immun* 76, 4282-4289.

Kodama T, Rokuda M, Park KS, Cantarelli VV, Matsuda S, Iida T and Honda T. 2007. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Cell Microbiol* 9, 2598-2609.

Kuhl SA, Pattee PA and Baldwin NJ. 1978. Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 135, 460-465.

Lee CY, Cheng MF, Yu MS and Pan MJ. 2002. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* 19, 31-37.

Lee H, Oh YH, Park SG and Choi SM. 2007. Antibiotic susceptibility and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the seafood. *Kor J Env Hlth* 33, 16-20.

Lee HW, Lim SK and Kim MN. 2009. Characteristics of ampicillin-resistant *Vibrio* spp. isolated from a west coastal area of Korea peninsula. *J Kor Fish Soc* 42, 20-25.

Lee KW and Park KS. 2010. Antibiotic-resistance profiles and the identification of the ampicillin-resistance gene of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater. *Kor J Fish Aquat Sci* 43, 637-641.

Lee NH, Song HJ, Park CS, Kim HD and Park KS. 2011. Genetic characterization of β -lactamase (VPA0477) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Kor J Fish Aquat Sci* 44, 597-604.

Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M and Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361, 743-749.

Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). 2014. Korea food code. Retrieved from <http://www.mfds.go.kr/e-stat/index>.

- do?nMenuCode=20 on February 6.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement M100-S12. Wayne, Pennsylvania, U.S.A., 19087-19098.
- National Veterinary Research and Quarantine Service (NVRQS). 2009. Monitoring of microbial resistance on the food animals and meats. National Veterinary Research and Quarantine Service, Korea, 1-92.
- No AR, Okada K, Kogure K and Park KS. 2011. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR targeted to the histone-like nucleoid structure (H-NS) gene and its genetic characterization. *Lett Appl Microbiol* 53, 127-133.
- Oh EG, Yu HS, Shin SB, Son KT, Park KB, Kwon JY, Lee TS and Lee HJ. 2008. Trimethoprim resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the fish farm. *J Kor Fish Soc* 41, 324-329.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T and Honda T. 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 72, 6659-6665.
- Rowe-Magnus DA and Mazel D. 2002. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* 292, 115-125.
- Ryu SH, Hwang YO, Park SG and Lee YK. 2010. Antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from commercial marine products. *Korean J Food Sci Technol* 42, 508-513.
- Sakazaki R, Tamura K, Kato T, Obara Y and Yamai S. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. *Jpn J Med Sci Biol* 21, 325-331.
- Shirai H, Ito H, Hirayama T, Nakamoto Y, Nakabayashi N, Kumagai K, Takeda Y and Nishibuchi M. 1990. Molecular epidemiological evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect Immun* 58, 3568-3573.
- Son JC, Park SW and Min KJ. 2003. Environmental and antimicrobial characteristics of *Vibrio* spp. isolated from fish, shellfish and brackish water samples in Gyeongbuk eastern coast. *Kor J Env Hlth* 29, 94-102.
- Son KT, Oh EG, Lee TS, Lee HJ, Kim PH and Kim JH. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from farms on the southern coast of Korea. *J Kor Fish Soc* 38, 365-371.
- Statistics Korea. 2013. Retrieved from http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=1317. on July 19.
- Tanil GB, Radu S, Nishibuchi M, Rahim RA, Napis S, Maurice L and Gunsalam JW. 2005. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal seawater in peninsular Malaysia. *Southeast Asian J Trop Public Health* 36, 940-945.
- Yu HS, Park KB, Oh EG, Lee TS, Shin SB, Kwon JY, Kim JH and Son KT. 2010. Trimethoprim resistance by class I integron in *Vibrio parahaemolyticus* from a fish farm. *Kor J Fish Aquat Sci* 43, 125-130.