

양식 굴(*Crassostrea gigas*)에서 분리된 장염비브리오균의 독소 유전자 보유 및 항균제 감수성

김수경 · 안세라 · 박보미 · 오은경¹ · 송기철 · 김정완² · 유홍식*

국립수산과학원 서해수산연구소, ¹국립수산과학원 남해수산연구소, ²인천대학교 생명과학과

Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from the Oyster *Crassostrea gigas*

Sukyung Kim, Sera An, Bomi Park, Eun-Gyoung Oh¹, Ki Cheol Song, Kim Jung-Wan² and
Hongsik Yu*

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

¹South Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Yeosu 59780, Korea

²Division of Bioengineering, University of Incheon, Incheon 22012, Korea

This study investigated the prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in the oyster *Crassostrea gigas*, which is commonly consumed raw. The presence of virulence factors and the antimicrobial susceptibility of isolates were also investigated. The overall prevalence rate of *V. parahaemolyticus* in oysters was 37.5% (36/96) and the range of concentrations was 30–11,000 MPN/100 g. PCR-based assays indicated that 9.6% (11/115) of the isolates were positive for the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*), while none of the isolates were positive for the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*). The Multiple Antibiotics Resistance (MAR) index was measured for 16 common antimicrobial agents and 46.1% (53/115) of the isolates had a MAR index > 0.2. The MAR index ranged from 0.07 to 0.73. The highest MAR index was observed with strain s150608, isolated in June 2015, which exhibited resistance to 11 antimicrobial agents. Our results demonstrate that oysters are high-risk sources of *V. parahaemolyticus*, although no antimicrobial agent was being used to promote growth or to treat bacterial infections in the sampled oyster-growing areas.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, Oyster, Virulence factors, Antimicrobial susceptibility, MAR index

서 론

장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)은 그람음성, 무포자, 호염성 간균으로 기수와 해양환경에 널리 분포하는 자연상재 세균으로 부적절하게 취급된 수산물을 생식하거나 덜 익혀 섭취하여 발생하는 급성 장염의 주요 원인균이다(Su and Liu, 2007; Gode-Potratz et al., 2011; Ceccarelli et al., 2013; Zarei et al., 2012; Zhang and Orth, 2013; KFSA, 2016). 과거에는 표현형과 생화학적 특성을 바탕으로 장염비브리오균을 동정하였으며 수산물과 해양환경에서 분리된 장염비브리오균 총 균수를 근거로 잠재적 위해를 추정하였다(Malcolm et al., 2015).

그러나 PCR과 같은 분자생물학적 기법을 발달로 장염비브리오균에서 병원성과 관련된 독소 유전자가 확인이 가능하게 되었는데, 이 독소 유전자는 thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene과 TDH related hemolysin (*trh*) gene이며 숙주 세포에 대한 용혈과 세포독성을 유발하는 것으로 밝혀졌다(Broberg et al., 2011; Zhang and Orth, 2013; Letchumanan et al., 2015). 그래서 수산물에서 장염비브리오균 위해평가를 실시하거나 기준규격을 설정하는 경우 특정 수산물에서 독소 유전자 보유 장염비브리오균 출현 빈도를 고려하고 있다.

일반적으로 비브리오균은 대부분의 임상용 항균제에 감수성이 큰 것으로 알려져 있다(Shaw et al., 2014; Yu et al., 2014).

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0116>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 49(2) 116-123, April 2016

Received 29 February 2016; Revised 30 March 2016; Accepted 30 March 2016

*Corresponding author: Tel: +82. 32. -745. 0751 Fax: +82. 32. 745. 0619

E-mail address: email: yhsapknu@gmail.com

그러나 오랜 기간 임상, 농업 및 수산양식 분야에서 항균제와 화학약품을 과도하게 사용함에 따라 항균제 내성 균주가 환경에 유입되고 있다는 주장이 제기되고 있다(Cabello et al., 2013). 이러한 주장은 아시아 지역 수산양식 분야에서는 oxytetracycline, tetracycline, quinolone, sulphonamides와 trimethoprim 등이 생산성 향상을 위해 지속적인 사용되어 왔고, 항균제 내성 장염비브리오균이 우리나라를 비롯한 태국, 말레이시아와 중국 등에서 분리되어 있다는 보고를 근거로 한 것이다(Oh et al., 2011; Rico et al., 2012; Sani et al., 2013; Xu et al., 2014; Yano et al., 2014; Yu et al., 2014). 또한 환경에서 분리된 장염비브리오균을 비롯한 잠재적 병원성 세균이 임상용 항균제에 대해서도 내성을 가질 것이라는 우려가 최근 확산되고 있다(Okamoto et al., 2009; Letchumanan et al., 2015). 이는 국가에 따라 차이가 있으나 비브리오균 감염증 치료를 위해 임상에서 사용되는 항균제에 cephalothin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, tetracycline, doxycycline과 fluoroquinolone 등이 포함되어 있으며 일부는 수산양식 분야에 사용되는 항균제와 동일하거나 유사한 계열이기 때문이다(Tang et al., 2002).

이 연구에서는 주거지역과 자연하천 등 육상 오염원과 인접한 개펄에서 양식되고 생식을 위주로 소비되고 있는 서해안 양식산 굴의 위생안전 확보와 항생제 내성 관리에 필요한 자료를 확보하고자 장염비브리오균 분포와 병인 인자 보유 여부 및 항생제 내성 특성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

패류 시료

장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*) 분리를 위하여 2014년 1월부터 2015년 12월까지 서해안 패류 생산해역에 설정된 4개 지점(인천시 옹진군 덕적면 및 자월면 연안)에서 양식굴(*Crassostrea gigas*)을 매월 채취하여 시료로 하였다. 패류 시료는 멸균된 용기에 채취한 후 10℃ 이하로 유지하면서 실험실로 운반하여 사용하였다. 시험에 사용된 굴 시료수는 총 96개였다. 시료 채취 시 해수의 수온과 염분농도는 YSI 556 multi-probe system (Yellow Springs, YSI Life Science, OH, USA)을 사용하여 현장에서 측정하였다.

장염비브리오균의 분리-동정 및 정량

장염비브리오균은 Bacteriological Analytical Manual의 방법에 따라 3 tube MPN법으로 정량분석을 실시하였다(Elliot et al., 2005). 패각을 제거한 후 패육과 패액 200 g에 phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄, and 1.5 mM KH₂PO₄ pH 7.4)을 2배 비율로 첨가하여 균질화 하였다. 그리고 80 mL의 PBS에 균질액 20 g을 첨가하여 10배 희석액을 만들어 시료로 하였다. 희석액을 이용하여 10배, 1,000배 등 단계별 추가 희석용액을 만들어 사용하였다. 각

희석단계 별로 alkaline peptone water (pH 8.5±0.2, 2% NaCl 함유)가 들어있는 3개의 시험관에 각각 접종하고 35±0.5℃에서 18-24시간 증균 배양하였다. 배양한 후 Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS agar, Difco)에 희석 도말하여, 35℃에서 18-24시간 배양하였다. 전형적인 청록색 집락을 도말하여 Triple Sugar Iron Agar (Difco)에 접종하고 35℃에서 24시간 배양한 후, 전형적인 반응을 나타내는 균주를 대상으로 동정시험을 실시하였다. 동정시험에는 내염성 시험, 42℃ 발육시험, ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranoside) 시험 및 API 20E system (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)을 이용하였으며, 16S rDNA 부분 염기서열을 분석하여 GeneBank에 등록되어 있는 장염비브리오균의 16S rDNA 염기서열과 상동성을 비교하여 확정하였다. 동정결과 장염비브리오균으로 확정된 경우 해당 분리주가 유래한 희석단계별 증균 시험관을 장염비브리오균 양성 시험관으로 하여 그 수를 헤아려 최확수표에서 정량치를 얻고 희석배율을 곱하여 100 g 당 MPN으로 환산한 후 정량치로 하였다.

16S rDNA 및 독소 유전자 확인

16S rDNA 상동성 비교 및 독소 유전자 확인을 위하여 분리균주를 2% 식염이 함유된 Triple Soy Broth (TSB, Oxoid, U.K.) 10 mL에 접종하여 37℃에서 18-24 시간 배양한 후 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 사용할 때 까지 -18℃에 보관하였다. 분리된 DNA로부터 16S rDNA 증폭에는 universal primer (Macrogen, Korea)을 사용하였으며 독소 유전자인 *tdh* 및 *tht* gene의 증폭에는 각각 VPD-1/VPD-2와 VPR-1/VPR-2 (Takara, Japan)를 사용하였다. PCR은 주형 DNA 5 μL, deoxy-nucleoside triphosphate mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP) 2 μL, 10×PCR 용액 5 μL, primer (100 pmol/μL) 1 μL, Taq polymerase 1.25 U를 혼합한 후, 총 부피를 50 μL로 조정하고 Thermal Cycle (Takara, Japan)로 94℃에서 60초, 60℃에서 60초, 72℃에서 60초의 조건에서 35회 반복하여 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 DE/QIAxcel advanced system (Qiagen, Germany)를 이용하여 amplicon 크기를 확인하였다(16S rDNA, 663 bp; *tdh*, 251 bp; *tht*, 250 bp).

항균제 감수성 시험

분리 동정된 장염비브리오균의 항균제 감수성 평가에는 Acar and Goldstein (1991)의 디스크 확산법을 이용하였다. 각 균주를 Muller Hinton Broth (Merck, Germany)에 접종한 후 35℃에서 18-24시간 전 배양한 다음 균 배양액의 농도를 McFarland No. 0.5로 희석 조정하였다. 희석된 균 배양액을 미리 1% 농도가 되도록 식염을 첨가한 두께 4 mm의 Muller Hinton Agar (Merck, Germany) 평판에 도말한 후 실온에 5분간 방치하여 균액을 흡수시키고 항균제 디스크(φ 8 mm)를 균 접종 후 15분 이내에 고착시켰다. 시험 항균제는 ampicillin을 비롯한 15

중 10계열을 사용하였다(Table 1). 항균제 디스크를 고착시킨 Muller Hinton Agar 평판은 35°C, 16-18시간 배양한 다음 균의 증식 저해대 (inhibition zone)의 크기를 caliper로 측정하여 Table 1에 제시된 기준(CLSI, 2015)에 따라 감수성을 판정하였다. 감수성 결과의 정도 관리를 위하여 *Escherichia coli* ATCC 25922를 대조균으로 사용하여 각 항균제 디스크에 대한 역가를 확인하였다.

MAR (Multiple Antibiotic Resistance) Index

분리균주의 항균제에 대한 동시 내성 정도를 비교하기 위하여 분리균주에 대한 MAR index를 다음 계산식에 따라 산출하였다(Krumperman, 1983).

$$MAR_{index} = r/t$$

여기서 “r”은 분리균주가 내성을 나타낸 항균제의 개수, “t”는 시험에 사용된 항균제의 총 개수이다.

결과 및 고찰

장염비브리오균 검출 현황 및 독소 유전자 보유율

장염비브리오균은 전 세계적으로 분포하는 식중독 세균의 일종으로 환경과 수산물에서 분포 및 농도는 계절, 지역, 시료의 유형과 적용 분석법에 따라 다르게 보고되고 있다(Martinez-Urtaza et al., 2008; Zarei et al., 2012). 이 연구에서는 서해안 산 양식 굴(*Crassostrea gigas*) (n=96)을 대상으로 alkaline

peptone water에 증균하여 선택배지를 사용하여 분리한 후 표현형과 유전형 분석을 통하여 동정하고 최확수법으로 정량하여 조사를 실시하였다. 장염비브리오균으로 추정되는 총 390개의 균주가 분리되었으며 115개 균주가 최종적으로 확정되었다. 장염비브리오균으로 확정된 모든 분리주의 16S rDNA 부분 염기서열은 GeneBank에 등록된 *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633의 16S rDNA 염기서열과 99% 이상의 상동성을 보였다(Makino et al., 2003).

2014년도에는 7월부터 10월까지 채집된 양식 굴에서 검출되었고 동절기에는 장염비브리오균이 검출되지 않았으며(<30 MPN/100 g), 2015년도에는 6월부터 10월에까지 채집된 양식 굴에서 검출되었다(Fig. 1). 장염비브리오균이 검출된 시기의 수온은 20°C 이상 이었다. 시료 중 연중 평균 검출율은 2014년에 33.3% (16/48) 그리고 2015년에 41.6% (20/48)에 달했다. 그리고 채취지점별 검출율에는 차이가 없었다. 양식 굴에서 장염비브리오균의 농도는 30-11,000 MPN/100 g의 범위를 나타내었으며 2015년(30-4,600 MPN/100 g)에 비하여 2014년(62-11,000 MPN/100 g)에 다소 큰 검출 범위를 나타내었다(Fig. 1).

이 연구에서 장염비브리오 검출율은 인도의 다양한 수산물에서 장염비브리오 검출율이 48-55%였다는 보고와 중국의 어패류에서 검출율이 47.2% 였다는 보고 보다 다소 낮은 것이며, 이전에 수행한 연구에서 남해안 양식 굴에서 장염비브리오균 검출율을 72.5%로 보고한 것과 많은 차이가 있었다(Chakraborty et al., 2008; Chao et al., 2009; Yu et al., 2014; Letchumanen

Table 1. Tested antimicrobial agents and breakpoints for the interpretation of the disk diffusion method

Class	Antimicrobial agent	Disc potency (µg/disk)	Zone diameter interpretive standards (mm)		
			Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillins	Ampicillin (AM)	10	≥17	14-16	≤13
Cephalosporins	Cefotaxime (CTX)	30	≥23	15-22	≤14
	Cefotetan (CTT)	30	≥16	13-15	≤12
	Cefepime (CEP)	30	≥18	15-17	≤14
	Cephalothin (KF/CF)	30	≥18	15-17	≤14
Aminoglycosides	Streptomycin (S)	10	≥15	12-14	≤11
	Gentamicin (CN/GM)	10	≥15	13-14	≤12
	Kanamycin (K)	30	≥18	14-17	≤13
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin (CIP)	5	≥21	16-20	≤15
Quinolones	Nalidixic acid (NA)	30	≥19	14-18	≤13
Sulfonamides	Sulphamethoxazole-Trimethoprim (SXT)	1.25/23.75	≥16	11-15	≤10
Phenicol	Chloramphenicol (C)	30	≥18	13-17	≤12
Tetracyclines	Tetracyclin (TE)	30	≥15	12-14	≤11
Ansamycins	Rifampin (RD/RA)	5	≥20	17-19	≤16
Macrorides	Erythromycin (E)	15	≥23	14-22	≤13

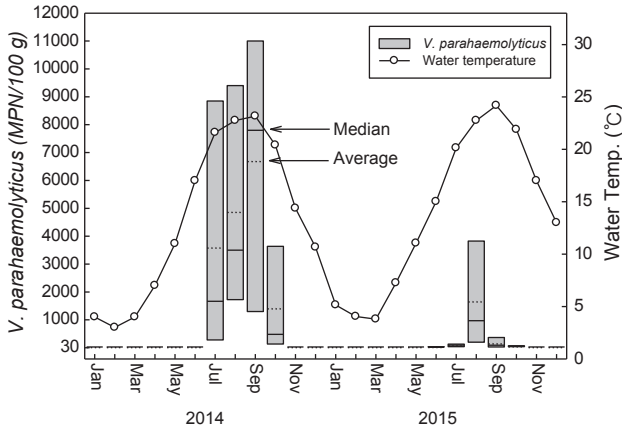


Fig. 1. Monthly prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters *Crassostrea gigas* collected at the west coast of Korea. Limit of the detection = 30 MPN/100 g.

et al., 2015). 또한 미국의 Chesapeake Bay에서 채취한 굴 시료에서 장염비브리오균 검출율이 100%였다는 보고도 있다 (Parveen et al., 2008). 이는 수산물에 축적되는 장염비브리오균의 농도가 다양한 연안해역의 환경에 영향을 받으며 통계적 유의성이 확보될 만큼 충분한 시료를 확보하지 못하는데 기인하는 여겨진다 (WHO/FAO, 2002; Kirs et al., 2011).

한편, 분리된 장염비브리오균 115균주 중 독소 유전자(*tdh/ trh gene*) 보유율을 조사한 결과, 내열성 용혈독소 유전자인 *tdh gene*을 보유한 균주는 없었고 유사 용혈독소 유전자인 *trh gene*을 보유한 분리균은 11균주(9.6%)로 나타났다(Table 2).

유럽과 아시아 지역에서 이루어진 조사에 의하면 *tdh* 및 *trh gene* 보유 장염비브리오균의 비율이 약 0-6% 정도라고 보고되고 있다(DePaola et al., 2000; Vuddhakul et al., 2000; Alam et al., 2002; Hervio-Heath et al., 2002; Haley et al., 2014; Yu et al., 2014). 일반적으로 장염비브리오균이 수산물에서 흔히 검출되나 모든 균주가 병원성을 가지는 것은 아니라고 알려져 있는데 이는 환경 분리주 중 *tdh* 및 *trh gene* 등 병인 인자 보유율이 다른 병원성 세균에 비하여 높지 않기 때문이다(Panicker et al., 2004; Deepanjali et al., 2005; Canizalez-Roman et al., 2011; Gutierrez West et al., 2013; Johnson et al., 2008; Yamamoto et al., 2008; Malcolm et al., 2015). 그러나 우리나라는 수산물을

생식하는 식습관을 가지고 있어 하절기를 중심으로 장염비브리오균에 의한 식중독이 지속적으로 발생하고 있기 때문에, 지역별 수산물 품종별 총 장염비브리오균 및 독소 유전자 보유 균주 출현율에 대한 지속적인 모니터링과 위해분석이 필요할 것으로 사료된다(KFDA, 2016).

항균제 감수성

이 연구에서는 미국 CDC가 비브리오 감염증 치료에 사용을 권고한 cefotaxime, gentamicin, sulfamethoxazole-trimethoprim 등 16종의 항균제(Table 1)를 이용하여 분리된 장염비브리오균의 항균제에 대한 감수성을 조사하였다(Daniels et al., 2000; Shaw et al., 2014). 분리균주의 94.8%가 ampicillin에 내성을 나타내었으며, cephalothin (53.9%), streptomycin

Table 3. Antimicrobial resistance of *V. parahaemolyticus* isolates from oysters *Crassostrea gigas*

Antimicrobial agent	No. of isolates (%) ¹		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ampicillin (AM)	2 (1.7)	4 (3.5)	109 (94.8)
Cefotaxime (CTX)	87 (75.7)	28 (24.3)	0 (0)
Cefotetan (CTT)	98 (85.2)	17 (14.8)	0 (0)
Cefepime (CEP)	101 (87.8)	10 (8.7)	4 (3.5)
Cephalothin (KF/CF)	20 (17.4)	33 (28.7)	62 (53.9)
Streptomycin (S)	46 (40.0)	0 (0)	69 (60.0)
Gentamicin (CN/GM)	78 (67.8)	29 (25.2)	8 (7.0)
Kanamycin (K)	30 (26.1)	73 (63.5)	12 (0.4)
Ciprofloxacin (CIP)	71 (61.7)	39 (33.9)	5 (4.4)
Nalidixic acid (NA)	111 (96.6)	2 (1.7)	2 (1.7)
Sulphamethoxazole-Trimethoprim (SXT)	109 (94.8)	6 (5.2)	0 (0)
Chloramphenicol (C)	113 (98.3)	2 (1.7)	0 (0)
Tetracyclin (TE)	100 (87.0)	14 (12.1)	1 (0.9)
Rifampin (RD/RA)	18 (15.7)	42 (36.5)	55 (47.8)
Erythromycin (E)	1 (0.9)	98 (85.2)	16 (13.9)

¹the ratio of the numbers of strains susceptible/intermediate resistant/resistant to the tested antimicrobial agents to total numbers of tested isolates expressed as a fraction of 100.

Table 2. Presence of virulence factors in *V. parahaemolyticus* isolates from oysters *Crassostrea gigas*

	No. of isolates									
	2014				2015					Total (%)
	Jul	Aug	Sep	Oct	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	
<i>trh</i>	0	5	2	4	0	0	0	0	0	11 (9.6%)
<i>tdh</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0%)
None	16	14	21	9	3	11	16	8	6	104 (90.4%)

Table 4. Antibiograms and MAR indices of the *V. parahaemolyticus* isolates from oysters *Crassostrea gigas*

Antibiograms		No. of isolates	MAR index
Antimicrobial agents	No. of antimicrobials		
AM		17	
CF	1	2	0.07
S		1	
AM/CF		15	
AM/E		2	
AM/GM		1	
AM/K	2	2	0.13
AM/RA		11	
AM/S		9	
CF/S		1	
RA/CF		1	
AM/CF/RA		11	
AM/CF/S		4	
AM/GM/CF	3	2	0.20
AM/RA/E		3	
AM/RA/S		4	
AM/CF/E/S		2	
AM/CF/K/S		1	
AM/GM/CF/S		1	
AM/RA/CF/GM		1	
AM/RA/CF/K	4	1	0.27
AM/RA/CF/S		7	
AM/RA/CIP/CF		1	
AM/RA/E/CF		5	
AM/RA/K/S		1	
AM/RA/CIP/CF/K		1	
AM/RA/S/CF/CTT	5	1	0.33
AM/RA/S/CF/K		2	
AM/RA/S/E/GM		1	
AM/RA/CIP/CF/K/S	6	1	0.40
AM/CF/GM/E/RA/NA/K/S	8	1	0.53
CF/GM/E/RA/CIP/CTT/K/S		1	
AM/TE/CF/GM/E/RA/CIP/CTT/NA/K/S	11	1	0.73

AM, Ampicillin; C, Chloramphenicol; CEP, Cefepime; CIP, Ciprofloxacin; GM, Gentamicin; CTT, Cefotetan; CTX, Cefotaxime; E, Erythromycin; K, Kanamycin; CF, Cephalothin; NA, Nalidixic acid; RA, Rifampin; S, Streptomycin; SXT, Sulphamethoxazole-Trimethoprim; TE, Tetracyclin.

(60.0)과 rifampin (47.8)에 높은 내성을 보였다(Table 3). 그리고 cefotaxime, cefotetan, sulfamethoxazole-trimethoprim과 tetracyclin에는 감수성 또는 중간 내성을 나타내었다.

수산물에서 분리된 장염비브리오균의 높은 ampicillin 내성에 관한 보고는 쉽게 찾아 볼 수 있으며, 그 원인을 1세대 항생제로서 과다 노출에 따른 내성 획득으로 보는 의견도 있다(Okuda et al., 1997; Han et al., 2007; Oh et al., 2011; Al-Othubi et al., 2014; Sudha et al., 2014). 또한 sulfamethoxazole-trimethoprim과 tetracyclin에 높은 감수성을 보인 결과는 수산물을 대상으로 한 다른 조사 결과와 유사하다(Han et al., 2007; Sahilah et al., 2014; Sudha et al., 2014; Letchumanan et al., 2015). 그리고 분리 균주의 MAR index 범위는 0.07-0.73로 나타났다(Table 4). 가장 높은 MAR index를 보인 균주는 2015년 6월 덕적면 연안에서 분리된 장염비브리오균(s150608)으로 11개의 항균제에 내성을 나타내었다. 그리고 분리균주의 46.1% (53/115)가 MAR index 0.2 이상을 나타내었다.

Krumperman (1983)은 MAR index 0.2를 해당 시료가 고 위험도 오염원에 영향을 받았는지 여부를 결정하는 기준점으로 제시한 바 있다. 제시된 이 값은 객관성이 있는 절대적 기준은 아니라고 하더라도, 항균제를 사용하여 양식된 새우류에서 분리된 장염비브리오균의 50% 이상이 MAR index 0.2 이상을 나타내었다는 보고를 고려한다면, 양식 굴에서 MAR index 0.2 이상을 나타낸 장염비브리오균의 비율이 거의 유사하게 나타나고 있어 조사해역 굴 양식장이 위험도가 높은 육해상 오염원에 영향을 받고 있다는 것으로 추측된다(Furtula et al., 2013; Letchumanan et al., 2015).

비브리오 균 중 일부는 내성인자들을 수계 침전물이나 주변 환경으로부터 획득할 수 있다는 보고도 있으며, 주거지가 밀집하여 있는 지역에서 발생한 오수가 유입되는 지역에서 분리된 장염비브리오균은 상대적으로 높은 내성균 검출 경향을 나타내었다는 보고도 있다(Neela et al., 2007; Oh et al., 2009). 서식지가 연안에 위치하고 있으며 여과섭식의 생리적 특성을 가진 패류의 경우는 각종 식중독 원인균의 전달 매개체로서 나아가 해양세균과 육상세균 간 내성인자 전달 매개체로서도 위험균에 속하는 수산물이기 때문에 생산단계와 수확 후 단계에서 적절한 위생 관리가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2016년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업(R2016059)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

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.
- Alam MJ, Tomochika KI, Miyoshi SI and Shinoda S. 2002. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. FEMS Microbiol Lett 208, 83-87. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11064.x>.
- Broberg CA, Calder TJ and Orth K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. Microbes Infect 13, 992-1001. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.013>.
- Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A and Buschmann AH. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Appl Environ Microbiol 15, 1917-1942. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12134>.
- Canizalez RA, Flores VH, Zazueta BJ, Muro AS and Leon SN. 2011. Comparative evaluation of achromogenic agar medium-PCR protocol with a conventional method for isolation of *Vibrio parahaemolyticus* strains from environmental and clinical samples. Can J Microbiol 57, 136-142. <http://dx.doi.org/10.1139/W10-108>.
- Ceccarelli D, Hasan NA, Hug A and Colwell RR. 2013. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. Front Cell Infect Microbiol 3, 1-9. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00097>.
- Chakraborty RD, Surendran PK and Joseph TC. 2008. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from seafoods along the southwest coast of India. World J Microbiol Biotechnol 24, 2045-2054. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-00809708-4>.
- Chao G, Jiao X, Zhou X, Yang Z, Huan J, Pan Z, Zhou L and Qian X. 2009. Serodiversity, pandemic O3:K6 clone, molecular typing, and antibiotic susceptibility of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Jiangsu, China. Foodborne Pathog Dis 6, 1021-1028. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0295>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). 2015. Susceptibility testing process. In: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard 12th edition. CLSI document M2-A10. Jean BP, ed. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne Pa, U.S.A., 15-39.
- Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruze S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM and Slutsker L. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infection in the United States, 1973-1998. J Infect Dis 181, 1661-1666. <http://dx.doi.org/10.1086/315459>.
- 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 south west coast of India. Appl Environ Microbiol 71, 3575-3580. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.7.3575-3580.2005>.
- DePaola A, Kaysner CA, Bowers J and Cook DW. 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). Appl Environ Microbiol 66, 4649-4654. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.11.4649-4654.2000>.
- 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.
- Furtula V, Charlene RJ, Erin GF, John BB, Lari MH and Patricia AC. 2013. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. Isolated from Environmental Samples in an Area of Intensive Poultry Production Int J Environ Res Public Health 10, 1020-1036. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10031020>.
- Gode-Potratz CJ, Kustusch RJ, Breheny PJ, Weiss DS and McCarter LL. 2011. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. Mol Microbiol 79, 240-263. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07445.x>.
- Gutierrez WCK, 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>.
- Haley BJ, Kokashvili T, Tskshvediani A, Janelidze N, Mitaishvili N, Grim CJ, Constantin de MG, Chen AJ, Taviani E, Eliashvili T, Tediashvili M, Whitehouse CA, Colwell RR, Huq A. 2014. Molecular diversity and predictability of *Vibrio parahaemolyticus* along the Georgian coastal zone of the Black Sea. Front Microbiol 5, 1-9. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00045>.
- Han F, Walker RD, Janes ME, Prinyawinwatkul W and Ge B. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. Appl Environ Microbiol 73, 7096-7098. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01116-07>.
- Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien JM, Robert-Pillot A, Fournier JM and Pommepuy M. 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. J Appl Microbiol 92, 1123-1135. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01663.x>.
- Johnson CN, Flowers AR, Young VC, Gonzalez-Escalona N, DePaola A, Norie NFIII and Grimes DJ. 2008. Genetic relatedness among *tdh+* and *trh+* *Vibrio parahaemolyticus* cultured from Gulf of Mexico oysters (*Crassostrea virginica*) and surrounding water and sediment. Microb Eco 57, 437-443. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-008-9418-3>.
- KFDA. 2016. Food poisoning statistics by pathogen and month. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=519&menu_grp=MENU_GRP02 on February 22.
- Kirs M, DePaola A, Fyfe R, Jones JL, Krantz J, Van Laanen

- A, Cotton D and Castle M. 2011. A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Int J Food Microbiol* 147, 149-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.012>.
- Krumperman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* 46, 165-170.
- Letchumanan V, Yin WF, Lee LH and Chan KG. 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia. *Front Microbiol* 6, 1-11. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00277>.
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12659-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12659-1).
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.010>.
- Martinez-Urtaza J, Huapaya B, Gavilan RG, Blanc-Abad V, Ansedo-Bermejo J, Cadarso-Suarez C, Figueiras A, Trinanes J. 2008. Emergence of Asiatic vibrio disease in south America in phase with ElNino. *Epidemiol* 19, 829-837. <http://dx.doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181883d43>.
- Neela FA, Nonaka L and Suzuki S. 2007. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater. *J Microbiol* 45, 64-68.
- Oh EG, Son KT, Ha KS, Yoo HD, Yu HS, Shin SB, Lee HJ and Kim JH. 2009. Antimicrobial resistance of *Vibrio* strains from brackish water on the coast of gyeongsangnamdo. *J Kor Fish Soc* 42, 335-343. <http://dx.doi.org/10.5657/kfas.2009.42.4.335>.
- Oh EG, Son KT, Yu HS, Lee TS, Lee HJ, Shin SB, Kwon JY, Park KBW and KIM JH. 2011. Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Farmed Fish in Korea during 2005-2007. *J Food Protec* 74, 380-386. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0508>.
- Okamoto AS, AndreattiFilho RL, Rocha TS, Menconi A and Marietto-Goncalves GA. 2009. Detection and transfer of antimicrobial resistance gene integron in *Salmonella enteritidis* derived from avian material. *Rev Brasil Ciên Avic* 11, 195-201. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X200900030009>.
- Panicker G, Myers ML and Bej AK. 2004. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 70, 498-507. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.1.498-507.2004>.
- Parveen S, Hettiarachchi KA, Bowers JC, Jones JL, Tamplin ML, McKay R, Beatty W, Brohawn K, Dasilva LV, Depaola A. 2008. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *Int J Food Microbiol* 128, 354-361. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.019>.
- Rico A, Satapornvanit K, Haque MM, Min J, Nguyen PT, Telfer T and van den Brink PJ. 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Rev Aquac* 4, 75-93. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01062.x>.
- Sahilah AM, Laila RA, Sallehuddin HM, Osman H, Aminah A and Ahmah AA. 2014. Antibiotic resistance and molecular typing among cockle (*Anadara granosa*) strains of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction (PCR)-based analysis. *World J Microbiol Biotech* 30, 649-659. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-013-1494-y>.
- Sani NA, Ariyawansa S, Babji AS and Hashim JK. 2013. The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in cooked black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) in Malaysia. *Food Control* 31, 546-552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.018>.
- Shaw KS, RosenbergGoldstein RE, He X, Jacobs JM, Crump BC and Sapkota AR. 2014. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland coastal bay. *PLoS One* 9:e89616. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089616>.
- Su CY and Liu C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol* 24, 549-558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.005>.
- Sudha S, Mridula C, Silvester R and Hatha AAM. 2014. Prevalence and antibiotic resistance of pathogenic vibrios in shellfishes from Cochin market. *Indian J Mar Sci* 43, 815-824.
- Tang HJ, Chang MC, Ko WC, Huang KY, Lee CL and Chuang YC. 2002. *In vitro* and *in vivo* activities of newer fluoroquinolones against *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3580-3584. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.11.3580-3584.2002>.
- Vuddhakul V, Chowdhury A, Laohaprerthisan V, Pungrasamee P, Patararun-grong N and Thianmontri P. 2000. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 66, 2685-2689. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.6.2685-2689.2000>.
- WHO/FAO, 2002. Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Vibrio* spp. in seafood In: Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. Geneva, Switzerland, 3-27.

- Xu X, Wu Q, Zhang J, Cheng J, Zhang S and Wu K. 2014. Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets. Food Control 46, 81-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.042>.
- Yamamoto A, Iwahori J, Vuddhakul V, Chareunjiratrak W, Vose D, Osaka K, Shigematsu M, Toyofuku H, Yamamoto S, Nishibuchi M and Kasuga F. 2008. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand. Int J Food Microbiol 124, 70-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.021>.
- Yano Y, Hamano K, Satomi M, Tsutsui I, Ban M and Aue-umneoy D. 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. Food Control 38, 30-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.019>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0508>.
- Zarei M, Borujeni MP, Jamnejad A and Khezzzadeh M. 2012. Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. Food Control 25, 107-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.024>.
- Zhang L and Orth K. 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. Curr Opin Microbiol 16, 70-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.002>.