

경북지역 설사환자와 환경에서 분리된 장염 비브리오균의 병원성인자에 관한 연구

경북보건환경연구원 미생물과, 국립보건원 세균질환부 장내세균과*, 안동대학교 생물학과†
이상조 · 정중교 · 이도영 · 이복권* · 이건주† · 이희무†

A Study of Virulence Factors and Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Diarrheal Patients and Environmental Sources in Gyeongbuk Province

Sang Jo Lee, Ph.D., Joong Kyo Chung, M.D., Do Young Lee, Ph.D.,
Bok Kwon Lee, Ph.D.*, Kon Joo Lee, Ph.D.†, and Hee Moo Lee, Ph.D.†
Gyeong Sang Buk-Do, Institute of Health and Environment,
Department of Microbiology*, National Institute of Health,
Department of Biology†, Andong National University, Korea

Background : *V. parahaemolyticus*, an important seafood-borne pathogen, is the causative agent of gastroenteritis in humans. In this study, the occurrence and distribution of the thermostable hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) gene were investigated, and as many as 72 different O : K serovar combinations were determined from diarrheal patients and environmental sources in Gyeongbuk provinces during the 2000–2001.

Methods : A total of 50 strains of *V. parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients and environmental sources were analyzed for the *tdh* gene and *trh* gene. The strains were analyzed for kanagawa phenomenon (KP) with the wagatsuma blood agar medium test. Furthermore, the strains belonging to O and K serotypes were determined. DNA sequence determination of the *tdh* gene were verified using GenBank and analyzed.

Results : In the KP experiments of *V. parahaemolyticus*, 80% of the strains isolated from diarrheal patients showed positive, but all of the strains isolated from environment sources were negative. The distribution of O and K serotypes were O3 : K29, O3 : K6, and O3 : K31, etc. isolated from diarrheal patients, and O2 : K28, O3 : K29, and O4 : K34 etc. isolated from environmental sources. As for the *tdh* and *trh* gene of *V. parahaemolyticus*, the *tdh* gene was detected from 88.0% of diarrheal patients and 16.0% of environmental sources. The *trh* gene was not detected from diarrheal patients and 8.0 % of environmental sources, whereas all urease positive strains possessed the *trh* gene. The DNA sequence of *tdh* gene were verified using GenBank and analyzed the difference, *tdh* nucleotide sequence was found among the *V. parahaemolyticus*.

Conclusion : *V. parahaemolyticus* is distributed with high frequency in the environmental sources such as sea water, fishes and shellfishes sampled at the Gyeongbuk coastal area, and the O3 : K6 strains producing TDH were confirmed, which is prevalent throughout the world, from diarrheal patients. Thus, it is very important to establish a measure to prevent food poisoning by *V. parahaemolyticus*.

Key Words : *V. parahaemolyticus*, *tdh*, Virulence factors, Vibrio

서 론

장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)균은 그람음성 간균으로서 해수, 갯벌, 어류, 패류, 해조류와 각종 해산물에 부착하여 서식하는 호염성 세균이다. 이 균은 1950년 일본 오

접수 : 2003년 5월 9일, 승인 : 2003년 12월 15일
교신저자 : 이상조, 대구광역시 북구 산격동 1445-2
경상북도보건환경연구원 미생물과
Tel : 053)602-5321, Fax : 053)956-9094
E-mail : micro003@hanmail.net

사카에서 절인 정어리를 먹고 272명의 식중독 발생으로 처음 분리되어 *Pasteurella parahaemolytica*라고 명명하였으나(1), 그 후 *V. parahaemolyticus*로 다시 명명하였다(2). 이 균은 우리나라, 일본 등 바다와 인접한 나라에서 해산물을 날것으로 먹기 때문에 여름철 발생빈도가 높은 감염형 식중독의 원인균으로서 심한 설사, 복통, 구토를 일으킨다(3). 감염형 식중독의 원인균들은 장의 상피세포에 부착할 수 있는 감수성 물질인 장관독소를 생성하여 장관막의 adenylate cyclase를 활성화시킴으로서, 숙주세포내 cyclic AMP의 농도를 높인다. 이 높아진 cyclic AMP의 농도가 조직 및 결장내에서 세포의 전해질의 정상조절 작용을 방해함으로써 산독증을 유발하거나, 순환계로부터 수분공급을 충분치 못하게 하는 것이다(4, 5).

*V. parahaemolyticus*의 주요 병원성 인자는 wagatsuma 혈액한천 배지상에서 kanagawa phenomenon (KP)을 일으키는 내열성 용혈독(TDH)이 알려져 있으며(6-8), 임상 분리주에서는 TDH를 code하는 thermostable direct hemolysin (*tdh*) 유전자를 주로 보유하지만, 이러한 유전자가 없는 것들도 있다(9). 한편, Honda 등(10), Kishishita 등(11)과, Okuda 등(12)은 *tdh* 유전자는 갖지 않으나, TDH와 유사한 내열성 용혈독 유사독소(TDH-related hemolysin, TRH)를 code하는 *trh* 유전자를 보유한 균주에 대해 보고하였고, 이는 urease 생성과 상관관계가 있으며(9, 13, 14), 최근에 *tdh* 및 *trh* 유전자의 염기배열이 밝혀짐에 따라, polymerase chain reaction (PCR)이나 DNA probe hybridization법을 이용하여 진단이 가능하게 되었다(9).

*V. parahaemolyticus*에 의한 식중독은 생활수준의 향상에도 불구하고, 우리나라의 지리적 여건과 어패류의 생식을 즐기는 식습관 등을 고려할 때, 장염 비브리오균에 의한 식중독의 위험은 상존하고 있다. 특히 호염성 세균으로 해·하수 및 어패류 등에서 높은 빈도로 분리되고 있어, 발생 경향의 조사와 식품 위생학적 측면에서 본 균에 관한 연구는 매우 중요하리라 생각된다.

따라서 본 연구는 2001년부터 2002년까지 경북 동해안 일대의 해수 및 어패류 등 환경에서 분리된 균주와 더불어, 주요 병·의원에 내원한 설사환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus*균을 대상으로 혈청형 분포와 병원성과 관계된 독성유전자를 encoding하는 *tdh* 및 *trh* 유전자 보유실태를 검색하였고, *tdh* 유전자 염기서열을 비교 분석하여 병원체의 특성을 파악함으로써 *V. parahaemolyticus*균에 의해 유발되는 식중독 예방대책 수립에 기여코저 본 연구를 수행하였다.

대상 및 방법

1. 시험균주 및 생화학적 특성시험

환경에서 *V. parahaemolyticus*균의 분리는 2001년부터 2002년까지 포항, 경주(갑포), 영덕, 울진 등 경북 동해안 일대의 4개 지역 해수 및 어패류 등을 대상으로 균을 분리하였으며, 환자에서의 균 분리는 도내의 주요 병·의원에서 수집한 설사가검물에서 균을 순수분리 배양하여, urease 생성시험 등의 생화학적 시험은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 API 20E kit를 사용하여 균을 동정하였다. *V. parahaemolyticus*로 최종 동정된 50균주를 본 시험에 사용하였다.

2. O:K 혈청형 분류

*V. parahaemolyticus*의 혈청형별 분류는 균체 항원(O균) 및 협막 항원(K형)에 대한 슬라이드 응집시험으로서, O균은 1% 식염이 들어있는 TSA 배지에 배양된 집락을 식염수 1 mL에 진하게 부유시킨 균액을 100℃에 10분간 가열한 후 식염수로 3,000 rpm, 15분간 원심 세척한 다음, 균액을 각각의 O균 항혈청과 혼합하여 slide 응집법으로 시험하였으며, K형은 TSA 배지에 자란 집락을 부유시켜 K형 항혈청과 혼합하여 뚜렷한 응집이 보이면 양성으로 판정하였다. O균 및 K형 항혈청에 응집현상을 보이지 않는 비형별 균주는 별도로 분류하였으며, 진단용 혈청은 Denka Seiken Co. kit (1998, Japan)를 사용하였다.

3. Kanagawa Phenomenon 시험

*V. parahaemolyticus*균의 KP 반응시험으로는 순수 분리된 *V. parahaemolyticus*균을 wagatsuma 혈액한천 배지에 각각 접종하여 37℃에서 18-24시간 동안 배양 후 집락의 주위에 β -hemolysis를 일으키는 균주를 KP 반응 양성으로 판정하였다.

KP 반응 시험에 사용된 wagatsuma 혈액한천배지는 면양 혈구와 사람의 O형 적혈구를 Alsever's 용액에 채혈하여 3,000×g에서 5분간 원심분리하여 혈장을 제거하고, 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.0)로 적혈구를 3-4회 세척하여 배지에 5% (v/v) 비율로 첨가하여 제조하였다.

4. *tdh* 및 *trh* gene 검색

*V. parahaemolyticus*에서 TDH를 code하는 *tdh* 유전자 및

tdh 유전자는 갖지 않으나 TDH와 유사한 TRH (내열성 용혈독 유사독소)를 code하는 *trh* 유전자의 보유실태를 조사하기 위하여, wagatsuma 혈액 한천배지 상에서 KP 반응 양성 균주와 KP 음성 반응을 보인 균주에 대해서도 *tdh/trh* gene 보유 여부를 검토하였으며, *tdh* 유전자 부분은 forward (5'-GGT ACT AAA TGG CTG ACA TCC-3') 및 reverse (5'-CCA AAT ACA TTT TAC TTG GAA-3') 증폭 size 198 bps 및 *trh* 유전자 부분의 250 bps의 primer를 각각 제작하여 사용하였다(Table 1).

시험균의 DNA는 TSA에 12시간 배양한 배양액을 원심분리(9,000×g 10 min.)하였고, 균체를 약 10⁸ (595 nm에서 O.D 0.6/mL)되게 현탁하여, 95℃에서 10분간 가열한 추출액을 원심분리하여 template DNA로 사용하였다.

PCR 반응은 10×PCR buffer용액 10 µL, dNTP mixture (2.5 mM each) 8 µL, 2.5 U Taq DNA Polymerase 0.5 µL, primer pair 1.0 µL (20 pmol/µL), template DNA 5 µL를 함께 넣어 D.D.W.로 최종용량을 50 µL로 조정하였다. PCR 증폭은 PCR system-2700 (Applied Biosystems Co. USA)을 이용하여, 반응조건은 95℃에서 5분 예비 가열한 후 94℃에서 1분 denaturation, 55℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분씩 extension으로 35 cycles로 증폭시켰다. 각각의 유전자 검출을 위하여 5 µL의 증폭산물과 molecular size marker (100 bp ladder, Bioneer Co.)를 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide 용액(EtBr)으로 염색하여 band를 확인하였다.

5. TDH 생성의 시험

*V. parahaemolyticus*균의 내열성용혈독(TDH) 생성의 검출은 RPLA법으로 KAT-RPLA kit (Denka Seiken Co., Japan)를 사용하였다. 분리된 균주를 CAYE-3 배지에 접종하고 37℃에서 18-24시간 동안 정치 배양한 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심분리 후 상등액을 계단희석(2 fold dilution)하여 KAT-RPLA kit 실험법에 준하여 reversed passive latex

agglutination (RPLA)법으로 실시하였다. 결과 판정은 피검 시료가 미감작 latex에서는 응집하지 않고 감작 latex에 응집한 경우를 양성으로, 감작 latex에 응집하지 않은 경우를 음성으로 판정하였다.

6. *tdh* gene 염기서열 분석

*V. parahaemolyticus*의 TDH를 encoding 하는 *tdh* 유전자의 염기서열 분석은 PCR 시험 결과 *tdh* gene을 보유한 26균주 중에서 설사환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus* O3:K29형 6균주를 대상으로 실시하였다. Qiaex PCR purification kit (QIAGEN Hilden Germany)를 사용하여 분리하고 이를 주형으로 하여, direct sequencing을 시행하였다. 사용한 primer는 Table 2를 기초하여 제작하였고, DNA sequencing은 유전자 염기서열 자동분석(ABI 3100 DNA Analyzer system, Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 시행하였다.

유전자 염기서열 분석을 위한 PCR 반응조건은 10×PCR buffer용액 5 µL, dNTP mixture (2.5 mM each) 8 µL, 2.5 U Taq polymerase 0.5 µL 및 primer pair 1.0 µL (20 pmol/µL, Table 2)에 template DNA 5 µL를 넣어 D.D.W.로 최종용량을 50 µL로 하여, 96℃에서 5분 예비 가열한 후 96℃에서 20초 denature, 58℃에서 40초 annealing, 72℃에서 1분 extension을 35 cycles을 반복 실시하였다.

본 실험에서의 읽은 부위의 염기서열 정보는 GenBank에 수록된 Iida 등¹⁵⁾ (GenBank No. D90100, 1990)의 *V. parahaemolyticus* T4750 strain 및 Nishibuchi 등¹⁶⁾ (GenBank No. X54341, 1990)의 *V. parahaemolyticus* strain WP1의 염기서열과의 차이를 비교 분석하였다.

결 과

1. *V. parahaemolyticus*의 혈청형 분류

*V. parahaemolyticus*의 O군 및 K형 분포는 설사환자에서 분리된 25균주 중에서 O3:K29형이 6균주(24.0%)로 가장 많았고, O3:K6형이 4균주(16.0%), O1:K32형, O5:K17형이 각

Table 1. Synthetic Oligonucleotides Used in Experiment

Target gene		5'-3'DNA sequence of primer	Amplicon size (bps)
<i>tdh</i>	F	GGT ACT AAA TGG CTG ACA TCC	198
	R	CCA AAT ACA TTT TAC TTG GAA	
<i>trh</i>	F	GGC TCA AAA TGG TTA AGC GCC	250
	R	CAT TTC CGC TCT CAT ATG CTT	

F: forward primer, R: reverse primer

Table 2. Sequences of PCR Primers Used as *tdh* Gene Detection

		Primer sequence (5'-3')	Positions
<i>tdh</i> *	F	TAG ATT TTA TGA AAC CTG CCA TTC	211-234
	R	TGC ATT GGC ATG CAT AAA TTA GA	892-914

**tdh* gene: 268-837 (Iida et al., 1990. hemolysin from KP positive *V. parahaemolyticus* T4750 strain)

각 2균주(8.0%)였으며, O1:K20, O1:K38, O3:K31 등이 각각 1균주씩 15가지의 혈청형 분포를 보였다. 특히 1996년부터 동남아를 비롯하여 전 세계적으로 유행하고 있는 O3:K6 형이 16.0% (4균주)가 포함되어 있었다. 환경에서 분리된 25 균주의 혈청형 분포는 O2:K28형, O3:K29형, O4:K34형 등이 각각 2주(8%)였으며, O1:K32형, O1:K38형, O3:K31형 등이 각각 1균주씩 18가지 이상의 혈청형 분포를 보였으나, 최근 유행하는 O3:K6형은 분리되지 않았다.

설사환자와 환경에서 분리된 균주의 혈청형의 상동성은 80 % 정도로 나타났으며, 설사환자에서 분리된 O1:K20, O11:K36형은 환경에서는 분리되지 않았으며, 환경에서 분리된 O3:KUT, O5:K30, O8:K20, O8:K70, O11:K50 등은 설사

환자에서는 분리되지 않았다(Table 3).

2. Kanagawa Phenomenon 시험

*V. parahaemolyticus*의 KP 반응 시험은 설사환자와 환경에서 분리된 각각의 25균주에 대해서 실시하였으며, 그 결과는 Table 4와 같았다. 면양혈구에 대한 KP 반응은 설사환자와 환경에서 분리된 모든균에서는 음성 반응을 보였으며, 사람 적혈구에서의 KP 반응은 설사환자에서 분리된 25균주 중 20균주 (80.0%)가 양성 반응을 보였고, 환경에서 분리된 25 균주 모두에서 음성 반응을 보였다.

Table 3. Characteristics of *V. parahaemolyticus* Strains Isolated from Diarrheal Patients and Environmental Sources

Source	Serotype	No. of tested	Urease	KP	Target genes		TDH titer*	
					tdh	trh		
Diarrheal patients	O1:K20	1	—	—	+	—	—	
	O1:K32	2	—	+	+	—	1,024	2,048
	O1:K38	1	—	—	—	—	—	
	O2:K28	1	—	—	+	—	—	
	O3:K6	4	—	+	+	—	512	2,048
	O3:K29	6	—	+	+	—	1,024	2,048
	O3:K31	1	—	+	+	—	1,024	
	O4:K34	1	—	—	—	—	—	
	O4:K42	1	—	+	+	—	1,024	
	O5:K17	2	—	+	+	—	1,024	2,048
	O5:KUT	1	—	+	+	—	512	
	O10:K71	1	—	—	—	—	—	
	O11:K19	1	—	+	+	—	1,024	
	O11:K36	1	—	+	+	—	512	
	OUT or KUT	1	—	+	+	—	1,024	
Shellfish	O1:K32	1	—	—	+	—	—	
Food	O1:K38	1	—	—	—	—	—	
Sea water	O2:K28	2	—	—	—	—	—	
Shellfish	O3:K29	2	—	—	+	—	—	
Fish	O3:KUT	1	—	—	—	—	—	
Sea water	O3:K31	1	—	—	—	—	—	
Shellfish	O4:K34	2	—	—	—	—	—	
Sea water	O4:K42	1	—	—	—	—	—	
Fish	O5:K17	1	—	—	—	—	—	
Sea water	O5:K30	1	—	—	—	—	—	
Shellfish	O5:KUT	1	—	—	+	—	—	
Shellfish	O8:K20	1	—	—	—	—	—	
Shellfish	O8:K70	1	—	—	—	—	—	
Sea water	O10:K71	1	—	—	—	—	—	
Sish	O10:KUT	2	+	—	—	+	—	
Sea water	O11:K19	1	—	—	—	—	—	
Sea water	O11:K50	1	—	—	—	—	—	
Sea water & Fish	OUT: or KUT	4	—	—	—	—	—	
Total		50	2	21	26	2		

*TDH titer was detected with KAP-RPLA kit

3. *tdh* 및 *trh* gene 검색

*V. parahaemolyticus*의 *tdh* gene 보유여부는 설사환자에서 분리된 KP 양성 반응을 보인 균주 모두와 KP 반응 음성을 보인 O1:K20형, O2:K28형 2균주(8%)를 포함하여 88% (22주)에서 *tdh* gene이 검출되었다. 또한, 환경에서 분리된 25균주 모두는 KP 반응 음성을 보였으나, 그 중에서 O3:K29형에서 2균주, O1:K32형, O5:KUT형 등 4균주(16%)에서 *tdh* gene이 검출되었다(Table 3).

한편, 설사환자 및 환경에서 분리된 균에 대한 *trh* gene 보유여부는 설사환자에서 분리된 25균주 모두는 *trh* gene이 검출되지 않았으나, 환경에서 분리된 KP 음성 반응을 보인 urease 생성균주인 O10:KUT형 2균주는 *trh* gene이 검출되

었다(Figure 1).

4. TDH 생성

*V. parahaemolyticus*의 내열성용혈독(TDH) 생성시험 결과는 설사환자에서 분리된 25균주 중에서 KP 양성 반응을 보인 20균주는 TDH를 생성하였으나, *tdh* gene은 보유하였으나 KP 음성 반응을 보인 5균주에서는 TDH를 생성하지 않았다. 또한, 환경에서 분리된 *tdh* gene을 보유한 KP 음성 반응을 보인 25균주 모두에서 TDH는 생성하지 않았다. TDH 역가에서는 설사환자에서 분리된 KP 양성균주에서는 512배부터 2,048배까지 높은 역가를 보였다(Table 3).

5. *tdh* gene 염기서열 분석

tdh 유전자의 염기서열 분석에서는 설사환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus* O3:K29형 6균주 모두에서 동일한 결과를 얻었으며, 1990년 GenBank에 수록된 Iida 등(15)의 분리균주와의 염기서열 비교에서는 100%의 homology를 보였으나, Nishibuchi 등(16)의 분리균의 *tdh* 유전자 염기서열 비교에서는 645번의 guanine 위치에 adenine 및 674번의 adenine 위치에 guanine 등 2곳의 염기서열에서 균주간에 차이를 보였다(15, 16). 이를 토대로 다른 혈청형의 *V. parahaemolyticus*균의 *tdh* 유전자 염기서열에 대해서도 계속 조사가 수행되어야 하겠다.

Table 4. Kanagawa Phenomenon of *V. parahaemolyticus* on Wagatsuma Agar with Sheep Blood Cell and Human Blood Cell

Strains	Sheep blood cell		Human blood cell (O)		Positive (%)
	Hemolysis				
	+	—	+	—	
Isolated from Diarrheal patients (n=25)	0	25	20	5	80.0
Isolated from Environmental sources (n=25)	0	25	0	25	0

+: Positive, -: Negative

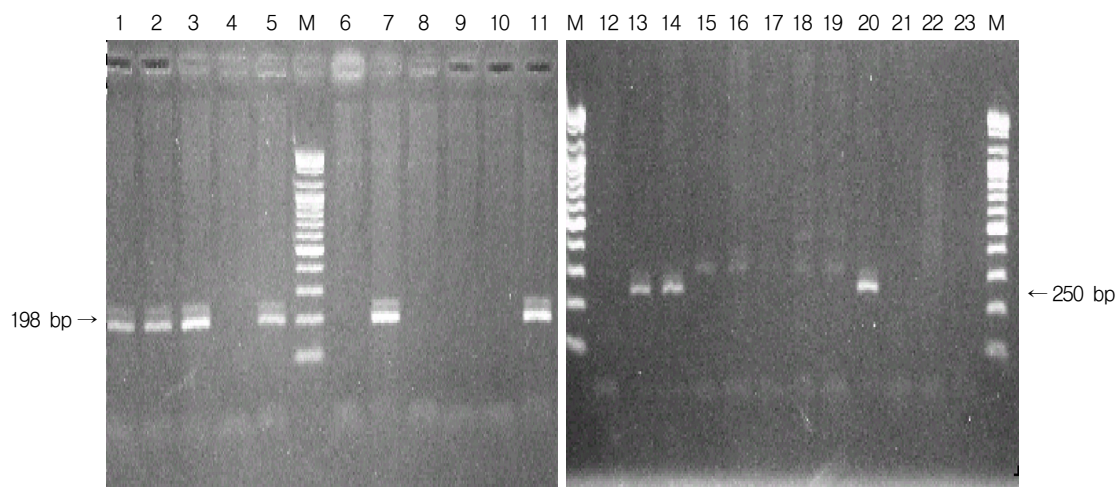


Figure 1. PCR assay detects the *tdh/trh* gene of the *V. parahaemolyticus* product size (bps): 198, *tdh* gene; 250, *trh* gene. M, Molecular weight ladder; lane 1, Isolates from diarrheal patients specimens serotype O1:K20; lane 2 and lane 3, O1:K32; lane 4, O1:K38; lane 5, O2:K28; lane 6, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; lane 7, Isolates from environmental sources serotype O1:K32; lane 8, O2:K39; lane 9, O3:K31; lane 10, O4:K34; lane 11, O5:KUT; lane 12, *V. parahaemolyticus* ATCC 27519; lane 13, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; lane 14, Isolates from environmental sources serotype O1:K32; lane 15, O3:K31; lane 16, O3:K29; lane 17, O4:K34; lane 18, O5:K17; lane 19, O8:K20; lane 20, O10:KUT; lane 21, O11:K50; lane 22 and lane 23, OUT:KUT.

```

V. parahaemolyticus T4750*      ATG AAGTACCGAT ATTTTGCAA AAAATCATT 300
V. parahaemolyticus WP2†      ***
Isolated V. parahaemolyticus O3:K29† ***
      TTATTTATAT CCATGTTGGC TGCATTCAA ACATTTGCCT TTGAGCTTCC
      *****
      *****
      ATCTGTCCCT TTTCCTGCCC CCGGTTCTGA TGAGATATTG TTTGTTGTTC 400
      *****
      *****
      GAGATACAAC TTTTAATACC AATGCACCGG TCAATGTAGA GGTCTCTGAC
      *****
      *****
      TTTTGACAA ACCGTAATGT AAAAAGAAA CCGTACAAAG ATGTTTATGG 500
      *****
      *****
      TCAATCAGTA TTCACAACGT CAGGTACTAA ATGGCTGACA TCCTACATGA
      *****
      *****
      CTGTGAACAT TAATGATAAA GACTATACAA TGGCAGCGGT GTCTGGCTAT 600
      *****
      *****
      AAGCACGGTC ATTCTGCTGT GTTCGTAAAA TCAGATCAAG TACAACCTCA
      *****
      *****
      ACATTCCTAT GATTCTGTAG CTAGCTTTGT TGGTGAAGAT GAAGATTCTA 700
      *****
      *****
      TTCCAAGTAA AATGTATTTG GATGAACTC CAGAATATTT TGTTAATGTA
      *****
      *****
      GAAGCATATG AGAGTGGTAG TGGTAATATA TTGGTAATGT GTATATCCAA 800
      *****
      *****
      CAAAGAATCG TTTTGTGAAT GTAAACATCA ACAATAA
      *****
      *****

```

Figure 2. DNA sequence of *V. parahaemolyticus* *tdh* gene operon nucleotide 268 to 837 (570 bps). *Iida et al. (1990) KP-positive *V. parahaemolyticus* T4750 strain. †Nishibuchi et al. (1990) *V. parahaemolyticus* strain WP1. ‡Isolated from human clinical specimens in *V. parahaemolyticus* O3:K29.

고 찰

*V. parahaemolyticus*에 대한 혈청형 분류는 인체의 감염균에 대해 주로 시도되었으나, 최근에는 자연계에서 분리되는 균에 대해서도 혈청형 분류를 종종 실시하고 있다. 본 실험에서 O항원에 대한 항혈청은 O1에서 O11까지 11균을 사용하였으며, K항원에 대한 항혈청은 71형(K1-K71)으로서 먼저 KI-IX의 다가혈청을 사용하여 형별 분류를 한 후에 단일 혈청을 이용하였다. 설사환자에서 분리된 균주는 O3:K29형이 6균주(24.0%)로 가장 많았고, 환경에서 O3:K29형이 2균주(8.0%) 분리됨에 따라, 식중독 발생과 이들 혈청형의 분포에 있어서 상당한 관련성을 내포하고 있었다. 또한, Bhuiyan 등

(17)은 1998년부터 2000년까지 Dhaka, Bangladesh의 ICDDR 병원의 설사환자에서 분리된 66균주에 대한 혈청형 분포에서 O3:K6이 42.4%, O4:K68이 18.2%, O1:K56 6.1% 등 17가지의 분포를 보였다고 보고하였으며, 국내에서는 주 등(18)은 남해안 일대의 해수, 해산물에서 분리한 100균주 중에서 가장 높은 분리율은 O2:K28형으로 28.8%, 다음이 O5:K17형으로 15.5%, O3:K37형이 13.3% 순으로 보고하였으며, 또한 유(19)는 1969년부터 1983년까지 어패류와 환자에서 분리된 균주에서 O2:K3형이 52%로 가장 많았고, O10:K52가 10%, O4:K9가 9%, O3:K5가 5%였으나 O3:K6형은 분리되지 않았다고 보고한 결과 등으로 미루어 볼 때, 분리되는 지역에 따라 다양한 혈청형 분포를 나타내었다(17, 20).

한편, Okuda 등(20)은 1994년부터 1996년까지 켈커타지역의 병원에 내원한 환자에서 분리한 균주 가운데 1996년 전에는 분리된 예가 없었던 O3:K6형이 1997년에는 50-80%로 가장 많이 분리되었으며, 일본에서도 1996년 이후에 집단 식중독에 검출된 혈청형이 예전에 우세했던 O4:K8형에서 O3:K6형으로 변화였고 1997년부터 1998년에도 이 혈청형이 가장 많은 분리율을 보고하였다(17, 21). 그 외에 인도, 방글라데시, 태국, 대만 등에도 1996년 이후에 O3:K6형에 의한 식중독이 계속 유행하며(22, 23), 본 실험에서의 설사환자에서 O3:K6형이 4균주(16.0%) 분리됨에 따라, 동남아를 비롯하여 전세계적으로 유행하고 있는 O3:K6형과 동일한 pattern을 보임에 따라 해외 여행자 증가와 함께 이들 혈청형에 대한 동향을 지속적으로 관찰할 필요가 있을 것으로 사료되었다.

장염 비브리오균이 분비하는 TDH는 사람 적혈구를 첨가한 wagatsuma 혈액한천배지에서 β -hemolysis를 주로 일으키며, 이는 kanagawa phenomenon (KP) 양성 반응으로서 설사를 유발하는 병원성인자로 취급하였다. Wagatsuma (6), Sochard 등(24), Kaysner 등(25)은 KP는 주로 설사환자에서 분리된 균주에서 이러한 현상이 나타나며, 환경에서 분리되는 균에서는 소수로 나타남을 보고하였다. Farmer 등(26)은 설사환자에서 분리된 균주의 96%가 KP 양성이었으며, 환경에서 분리된 균주의 경우 1%가 양성이라고 보고하여 본 실험 결과와는 다소 차이를 나타내었다. 그러나 강 등(27)의 결과와 유사하게 환경에서 분리된 균주에서는 31.3%에서 KP 양성반응을 보였다. 최근에는 분자생물학의 발전으로 KP 양성균주들이 thermostable direct hemolysin (*tdh*)이 관여하는 것으로 나타났으며(13, 16), TDH 생성에서는 Nishibuchi 등(34)의 보고에서와 마찬가지로 KP 양성균주 모두에서 TDH 독소를 분비하는 것으로 나타났었다. 그러나 설사환자에서 분리된 25균주 중 4균주(16%)에서는 *tdh* gene은 보유하고 있었으나, KP 음성으로서 TDH 독소 발현은 하지 못하는 것으로 나타났으며, 또한, 환경에서 분리된 O10:KUT형 2균주(8.0%)에서도 *trh* gene은 보유하고 있었으나 TDH 독소 발현은 하지 못하는 것으로 나타났다. 이는 이들 유전자의 발현에 대한 앞으로의 계속적인 연구가 요구된다.

Nishibuchi 등(9), Okuda 등(12)은 설사환자에서 분리된 KP 양성균주와 일부 음성균주에서도 *tdh* 유전자가 검출되는 경향이 있는 것으로 보고하였으며(29), 최근 임상증상이 있으면서 KP 음성반응을 보이고 및 *tdh* gene을 보유하지 않은 균에서 TDH-related molysin (TRH)를 code하는 *trh* gene을 가진 균을 발견하였다(14, 30). 이는 *trh* gene은 TRH를

encoding하는 것으로 밝혀졌으며, Nishibuchi 등(9)에 의하여 *tdh* gene과의 염기서열에서 68%의 상동성을 나타냄을 보고하였다. 또한, Okuda 등(31), Nishibuchi 등(9)의 보고에서 urease 생성과 *trh* 유전자와의 상관성을 언급하였는데, 본 실험에서 환경에서 분리주인 혈청형 O10:KUT형 2균주에서는 urease 생성을 나타내었고, KP를 일으키지는 않았으나 *trh* gene을 보유하고 있어 이들의 보고와 같이 urease 생성과 *trh* 유전자 사이에 밀접한 상관관계를 나타내었다(11, 32, 32).

*V. parahaemolyticus*의 내열성 용혈독(TDH)을 encoding하는 *tdh* 유전자의 염기서열 분석에서는 Figure 2에서 보는 바와 같이 설사환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus* O3:K29형 6균주 모두에서 1990년도에 GenBank에 수록된 Iida 등(15) (GenBank No. D90100, 1990)의 설사환자에서 분리된 KP positive *V. parahaemolyticus* T4750 균주의 염기서열과는 100%의 homology를 보였으나, Nishibuchi 등(16) (GenBank No. X54341, 1990)의 *V. parahaemolyticus* strain WP1의 *tdh* 유전자 염기서열과는 645번의 guanine 위치에 adenine 및 674번의 adenine 위치에 guanine 등 2곳의 염기서열 비교에서 차이를 보였다(15, 16).

이상의 실험 결과를 미루어 볼 때, 식품위생 및 임상 세균학적으로 *V. parahaemolyticus*는 중요시되고 있을 뿐만 아니라 환경오염으로 인한 연안에서는 오히려 증가되고 있고, 분리되는 균 중서에도 다양한 혈청형 분포와 병원성인자를 소유하는 것으로 나타났다. 특히 우리나라의 지리적 여건과 어패류의 생식을 즐기는 식습관으로 비추어 볼 때, 식중독 등 예방대책 수립을 위한 연구는 매우 중요하며, 앞으로도 지속적으로 수행되어야 할 과제이다.

요 약

목 적 : 장염 비브리오 등 식중독을 예방하기 위한 질병유행예측조사 사업의 일환으로 2001년부터 2002년까지 경북지역 설사환자와 환경에서 분리된 *V. parahaemolyticus*를 대상으로 O:K 혈청형 분포, *tdh/trh* gene 보유실태 파악 및 TDH 생성능, *tdh* 유전자의 염기서열 비교 분석을 통하여 장염 비브리오균의 병원성인자에 관한 특성을 파악하고자 본 과제를 수행하였다.

방 법 : 도내의 설사환자와 환경에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 50균주를 대상으로 O:K 혈청형별 분류, 병원성인자 검색은 wagatsuma 혈액한천배지에서 Kanagawa phenomenon (KP) 시험을 실시하였으며, TDH를 code하는 *tdh* 유전자 및 TDH와 유사한 TRH를 code하는 *trh* 유전자의 보유

실태를 PCR로 확인하였으며, *tdh* 유전자의 염기서열을 비교 분석하였다.

결 과 : 설사환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus*의 혈청형은 O1:K32, O3:K6, O3:K29, O5:K17형 등 15가지로 O3:K29형이 24.0%로 가장 많았고, 최근 유행하는 O3:K6형이 16.0% 포함되어 있었다. 환경에서 분리된 균의 혈청형은 O1:K32, O2:K28, O3:K29, O4:K34형 등 18가지로 비정형균주 (OUT:KUT)가 16.0%로 가장 많았다. KP 시험에서 설사환자에서 분리균은 80.0%가 양성반응을 나타내었으나 환경에서 분리균은 모두 음성반응을 나타내었다. KP 양성 균주 모두와 KP 음성 균주 12% (6주)에서 *tdh* gene이 검출되었다. *tdh* gene은 환자에서 분리균은 88.0%, 환경에서 분리균은 16% 검출되었다. *trh* gene은 설사환자에서 분리균 모두에서 검출되지 않았으나, 환경에서 분리균은 8.0% 검출되었다. TDH 생성은 환자에서 분리된 KP 양성 균주는 512 배부터 2,048 배까지 TDH 생성능을 나타내었으나, KP 음성 균주는 *tdh* 및 *trh* gene은 보유하였지만 TDH는 생성되지 않았다. 설사환자에서 분리된 *V. parahaemolyticus* O3:K29형의 *tdh* 유전자 염기서열 비교 분석에서 GenBank에 수록된 *V. parahaemolyticus* *tdh* gene과의 염기서열에서 동일하였거나 일부분 차이를 보였다.

결 론 : *V. parahaemolyticus*의 병원성 인자로서 *tdh* 유전자 분포는 설사환자에서 88.0% 환경에서 16% 검출되었고, 혈청형 분포도 다양한 양상을 나타내었다. 또한, 세계적으로 유행하는 O3:K6 혈청형이 경북 도내의 설사환자에서도 일부 분리됨에 따라 장염 비브리오 식중독 및 예방대책 수립은 매우 중요하리라 생각되었다.

참 고 문 헌

- 1) Fujino T: From *Pasteurella parahaemolyticus* to *Vibrio parahaemolyticus*. (in Japanese). pp13-37. In T. Fujino and Fukumi H. (ed.). *Vibrio parahaemolyticus*. Isseido publishing co. Tokyo, 1953
- 2) Sakazaki R, Iwanami S, Fukumi H: Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Jap J Med Sci Biol* 16:161-188, 1963
- 3) Chiou A, Chen LH, Chen SK: Foodborne illness in Taiwan, 1981-1989. *Food Aust* 43:70-71, 1991
- 4) Pierson S: Detection and quantitation of foodborn pathogens and their toxins Gram-negative bacterial pathogens. *Foodborne microorganisms and their toxins: Developing methodology*. marcel decker. Inc. U.S.A.

- 317, 1986
- 5) Collins CH: *Bacterial food poisoning, microbiological methods*. 5th ed. Butter worth co. U.S.A. 182, 1984
- 6) Wagatsuma S: A medium for the test of the hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle* 13: 159, 1968
- 7) Takeda Y: Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacol Ther* 19:123-146, 1983
- 8) Kaysner CA, Tamplin ML, Twedt RM: *Vibrio*. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, DC. pp451-473, 1992
- 9) Nishibuchi M, Taniguchi T, Misawa T, Khaeomaneelam V, Honda T, Miwatani T: Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 57:2691-2697, 1989
- 10) Hondo S, Goto I, Minematsu I, Ikeda N, Asano N, Ishibashi M, Kinoshita Y, Nishibuchi N, Honda T, Miwatani T: Gastroenteritis due to kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet* I:331-332, 1987
- 11) Kishishita M, Matsouka N, Kumagai K, Yamasaki S, Takeda Y, Nishibuchi M: Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 58:2449-2457, 1992
- 12) Okuda J, Nishibuchi M: Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype of *V. parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct hemolysin gene. *Mol Microbiol* 30:499-511, 1998
- 13) Honda T, Abad-Lapuebla MA, Ni Y, Yamamoto K, Miwatani T: Characterization of a new thermostable direct hemolysin produced by a kanagawa-phenomenon-negative clinical isolate of *V. parahaemolyticus*. *J Gen Microbiol* 137:253-259, 1991
- 14) Tada J, Ohashi T, Nishimura N, Shirasaki Y, Ozaki H., Fukushima S, Takano J, Nishibuchi M, 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* 6:477-487, 1992
- 15) Iida T, Yamamoto K: Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysins from a kanagawa phenomenon-positive *V. parahaemolyticus* T4750 strain. *Res. Insti. for Micro. Diseases Osaka University Yamada-oka (3)1*, 1990
- 16) Nishibuchi M, Kaper JB: Duplication and variation of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Mol Microbiol* 4:87-99, 1990
- 17) Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M,

- Alam K, Chowdhury NR, Nishibuchi M, Faruque SM, Sack DA, Takeda Y, Nair GB: *Prevalence of the pandemic genotype of Vibrio parahaemolyticus in Dhaka, Bangladesh and Significance of its distribution across different serotypes. J Clin Microbiol* 40:284-286, 2002
- 18) 주진우: 한국남해안 일대의 장염 비브리오 분포연구-제주, 거제, 남해, 욕지, 부산 및 마산 근해의 해수, 해저펄 및 해산물에서 장염 비브리오 분리. *대한미생물학회지* 18:1-9, 1983
 - 19) 유재근: 한국에서 분리된 *Vibrio parahaemolyticus*의 생물학적 성장연구. 건국대학교 대학원 박사학위논문, 1984
 - 20) Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nish T, Takeda Nair GB, Nishibuchi M: *Emergence of a unique O3:K6 clone Vibrio parahaemolyticus India Calcutta, In and isolation of strains from the same clone group from southeast asian travelers arrive in Japan. J Clin Microbiol* 35:3150-3156, 1997
 - 21) Nasu H, T Lida, T Sugahara, Y Yamaichi, K Yokoyama, K Makino, H Shinagawa, T Honda: *A filamentous phage associate with recent pandemic Vibrio parahaemolyticus O3:K6 strains. J Clin Microbiol* 38:2156-2161, 2000
 - 22) CDC: *MMWR* 47:457-462, 1998
 - 23) CDC: *MMWR* 48:48-51, 1999
 - 24) Sochrd MR, RR Colwell: *Toxin isolation from a Kanagawa-Phenomenona negative strain Vibrio parahaemolyticus. Microbiol Immunol* 21:243-254, 1977
 - 25) Kaysner CA, Tamplin ML, Twedt RM: *Vibrio. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, DC. pp451-473, 1992*
 - 26) Farmer J, J Michael, T Kelly, FW Hickman-Brenner: *Vibrio manual of clinical microbiology 4th Edit. pp282, 1985*
 - 27) 강동훈, 전상수, 정덕화, 조성환: 남해연안에 분포되어 있는 *Vibrio parahaemolyticus*의 성장 및 Grapefruit Seed Extract 처리에 의한 항균 효과. *한국식품위생안전성학회지* 9:141-149, 1999
 - 28) Nishibuchi M, Kaper JB: *Nuclotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of Vibrio parahaemolyticus. J Bacteriol* 162:558-564, 1985
 - 29) Asim KB, Donald PP, Cynthia WB, Micheal CL, Vickery, Danial DJ, Charles AK: *Detection of total and hemolysin-producing V. parahaemolyticus in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tds and trh. J Microbiol Methods* 36:215-225, 1999
 - 30) Honda T, Ni Y, Miwatani T: *Purification and characterization of a hemolysin produced by a 20 clinical isolate of kanagawa phenomenon negative Vibrio parahaemolyticus related to the thermostable direct hemolysin. Infect Immun* 56:961-965, 1988
 - 31) Okuda J, Ishibashi M, Abboott SL, Janda JM, Nishibuchi M: *Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) gene in the urease-positive strains of Vibrio parahaemolyticus isolated on the west Coast of the United States. J Clin Microbiol* 35:1965-1971, 1997
 - 32) Matsumoto M, Suzuki M, Hiramatsu R, Yamazaki M, Matsui H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki, Y: *Epidemiological investigation of a fatal case of cholera in Japan by phenotypic techniques and pulsed-field gel electrophoresis. J Med Microbiol* 51:264-268, 2002
 - 33) Sarkar A, Nandy RK, Nair GB, Ghose AC: *Vibrio pathogenicity island and cholera toxin genetic element-associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of Vibrio cholerae. Infect Immun* 70:4735-4742, 2002
 - 34) Nishibuchi M, Kaper JB: *1995. Thermostable direct hemolysin gene of Vibrio parahaemolyticus: a virulence gene acquired a marine bacterium. Infect Immun* 63:2093-2099, 1995