

2022년

---

# 인천연안 해양환경 항생제 내성균 실태조사

2022. 12.

# 인천연안 해양환경 항생제 내성균 실태조사

- ◇ 항생제 내성균은 사람-동물-환경-식품 등에서 발생하여 확산, 전파하므로 다양한 분야의 통합적인 연구와 대응이 필요함
- ◇ 해양환경 내성균 추적조사로 내성균 간 연관성을 파악하고 내성균의 출현과 확산을 감시하고자 함

## I 추진배경

- 항생제 내성의 가장 큰 쟁점은 인체가 항생제 복용시 70%는 우리 몸을 통해 폐수로 배출되며, 농장, 동물에 처리된 항생제도 유출과 홍수를 통해 수계환경으로 들어감
- 더욱이 수계환경의 항생제 내성균 오염은 다양한 세균에 내성유전자를 혼합하고 교환할 수 있기 때문에 내성 세균의 확산에 중요한 요소로 작용
- 우리원은 국가항생제관리를 위한 용역사업으로 사람, 농산물, 축산 분야에 대한 자료를 구축하였고, '21년에는 서식지별 야생조류 조사로 다양한 환경에 노출기회가 많은 조류에서 높은 내성률을 확인
- 올해는 인천연안 해양환경(해수, 갯벌) 항생제 내성균 추적조사로 오염실태를 파악하고 연관성을 확인하고자 함

## II 추진계획

- 대 상 : 인천연안 해수 및 갯벌 100건
- 항생제 및 대상균주 선정 범위
  - (항 생 제) 기 우리원 수행 사람-채소-가축 감시 결과와 비교평가 가능한 광범위  $\beta$ -lactamase계(ESBL), Colistin 선정, 지표세균 조사
  - (대상 균주)
    - 지표 세균<sup>1)</sup> : *E. coli*, *K. pneumoniae*
    - 병원성세균 : *V. vulnificus*, *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*

1) 지표세균 : 식품, 환경에서 분변오염과 병원성세균 오염을 탐지하고 추정하는데 사용되는 세균 유형

## \* 비브리오균(Vibrio) ?

우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로도 중요한 수인성 식품매개질환의 원인균으로 해수, 갯벌, 어패류에서 주로 분리된다. 현재까지 확인된 비브리오균은 총 77종으로 이중 12종이 임상적으로 중요한 인체 감염형으로 보고되어 있으며, *V. vulnificus*, *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, 및 *V. alginolyticus* 에 의한 감염이 주로 보고된다.

○ 조사지점 : 인천연안(소래포구, 연안부두), 강화연안(4지점)



<인천연안>

A. 소래포구

B. 연안부두

<강화연안>

1. 선두포구

2. 동막리

3. 흥왕리

4. 장화리

○ 검사방법

- 대상균주 선별

- (지표 세균) 증균배지(TSB) 배양 후 Chromagar COL-APSE, Chromagar ESBL 배지에 접종하여 증식한 *E. coli*, *K. pneumoniae* 선별
- (병원성세균) 증균배지(APW) 배양 후 Chromagar Vibrio, mCPC 배지에 접종하여 비브리오균 4종 선별

- 지표세균 유전자 분석

- 항생제별 내성유전자 검사 : PCR 후 염기서열 분석
  - ※  $\beta$ -lactamase계(ESBL) : TEM, SHV, CTXM-1, 2, 9, Group, Colistin : mcr-1, mcr-2
- MLST(Multilocus sequence typing) : 세균 대사에 관여하는 주요 항존유전자 (Housekeeping gene)를 증폭, 염기서열 분석 후 sequence types(ST) 확인으로 내성 세균간 연관성분석
  - ※ *E. coli* MLST : 7개의 housekeeping 유전자 *adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*를 PCR로 증폭하고 염기서열을 분석하여 *E. coli* MLST database (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) 와 비교 sequence type 확인

※ *K. pneumoniae* MLST : 7개의 housekeeping 유전자 *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*를 PCR로 증폭하고 염기서열을 분석하여 *K. pneumoniae* MLST database(<https://bigsdbs.pasteur.fr/>) 와 비교 sequence type 확인

- 항생제 감수성 검사

• 지표세균 10계열 15종

1. **Quinolone 계** : Ciprofloxacin(CIP), Nalidixic Acid(NAL)
2. **Carbapenem 계** : Imipenem(IMI)
3. **Penicillin 계** : Ampicillin(AMP)
4. **Tetracycline 계** : Tetracycline(TET)
5. **Aminoglycoside 계** : Gentamicin(GEN), Amikacin(AMI)
6. **Cephalosporin 계** : Cefoxitin(FOX), Ceftazidime(TAZ), Cefotaxime(FOT), Ceftriaxone(AXO)
7. **Polypeptide 계** : Colistin(COL)
8. **Chloramphenicol 계** : Chloramphenicol(CHL)
9. **Macrolide 계** : Azithromycin(AZI)
10. **Sulfonamide 계** : Trimethoprim/Sulfamethoxazole(SXT)

• 비브리오균 9계열 13종

1. **Quinolone 계** : Ciprofloxacin(CIP), Nalidixic Acid(NAL)
2. **Carbapenem 계** : Meropenem(MERO)
3. **Penicillin 계** : Amoxicillin/clavulanic acid 2:1 ratio(AUG2), Ampicillin(AMP)
4. **Tetracycline 계** : Tetracycline(TET)
5. **Aminoglycoside 계** : Gentamicin(GEN)
6. **Cephalosporin 계** : Cefoxitin(FOX), Ceftazidime(TAZ), Cefepime(FEP)
7. **Chloramphenicol 계** : Chloramphenicol(CHL)
8. **Aminoglycoside 계** : Streptomycin(STR)
9. **Sulfonamide 계** : Trimethoprim/Sulfamethoxazole(SXT)

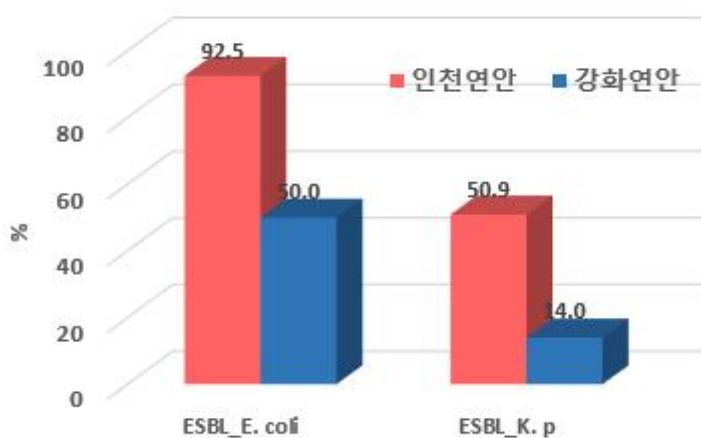
### III 추진실적

#### 1. 지표세균 항생제 내성균 현황

##### ○ 지점별 항생제 내성균 검출 건수

구 분	검사 건수	EC		KP		검출 건수
		Colistin	ESBL	Colistin	ESBL	
계	103	0	74 (71.8%)	0	34 (33.0%)	108
인천연안 (소래·연안)	53	0	49 (92.5%)	0	27 (50.9%)	76
강화연안	50	0	25 (50.0%)	0	7 (14.0%)	32

지점별 항생제 내성균 검출률(%)



- 총 103건 검사, EC-ESBL 74건 검출, KP-ESBL 34건 검출, Colistin 불검출

- 인천연안은 강화연안 보다 생활 반경 근거리에 있어 오염 환경에 많이 노출되어 항생제 내성률이 높음

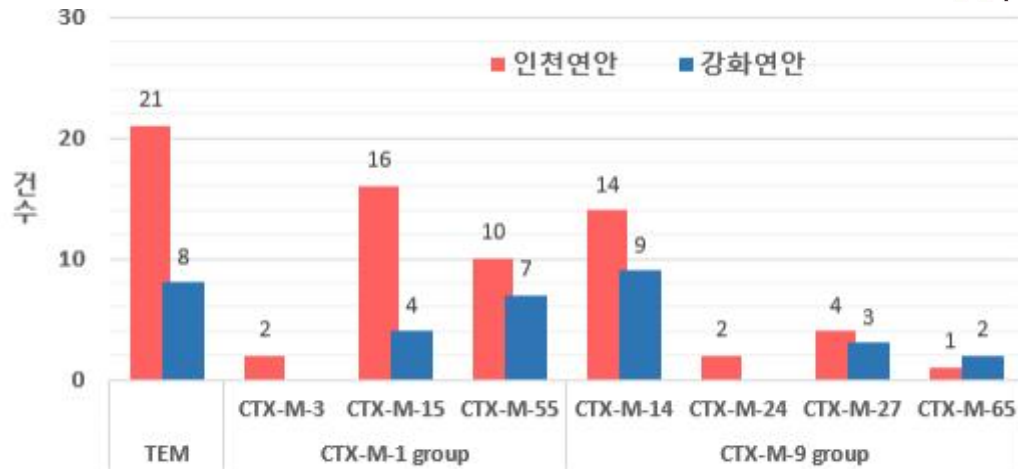
##### ○ ESBL 내성유전자 분석

- (*E. coli*)

구 분	균주	TEM	CTX-M-1 group			CTX-M-9 group			
			CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-55	CTX-M-14	CTX-M-24	CTX-M-27	CTX-M-65
계	74	29	2	20	17	23	2	7	3
인천연안	49	21	2	16	10	14	2	4	1
강화연안	25	8	-	4	7	9	-	3	2
검출률(%)		39.2	2.7	27.0	23.0	31.1	2.7	9.5	4.1

· TEM(n=29), CTX-M-14(n=23), CTX-M-15(n=20), CTX-M-55(n=17건), CTX-M-27(n=7), CTX-M-65(n=3), CTX-M-3(n=2), CTX-M-24(n=2) 순으로 확인

· SHV, CTX-M-2 Group 유전자는 검출되지 않음



- (*K. pneumoniae*)

구 분	균주	TEM	SHV	CTX-M-1 group				CTX-M-9 group
				CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-55	CTX-M-216	CTX-M-14
계	34	17	30	1	23	1	1	7
인천연안	27	16	24	1	17	1	1	6
강화연안	7	1	6		6			1
검출률(%)		<u>50.0</u>	<u>88.2</u>	2.9	<u>67.6</u>	2.9	2.9	<u>20.6</u>

• SHV(n=30), TEM(n=17), CTX-M-15(n=23), CTX-M-14(n=7), CTX-M-3(n=1), CTX-M-55(n=1) CTX-M-216(n=1) 확인

• CTX-M-2 Group 유전자는 검출되지 않음

⇒ 인천연안 및 강화연안에서 분리된 내성유전자형은 인간뿐만 아니라 가축, 야생조류에서도 주로 발견되는 유전자형으로 확인됨

## ○ MLST 분석현황

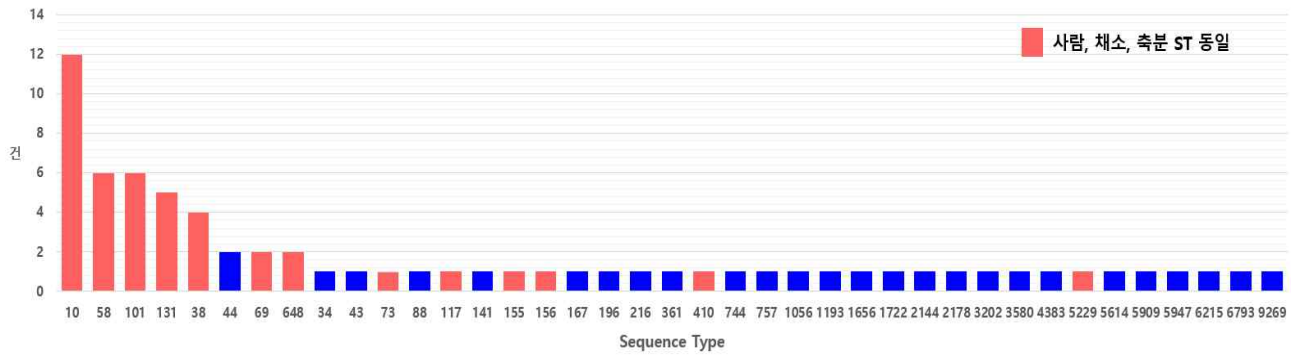
- (EC-ESBL)

• ST10(n=12), ST58, ST101(n=6), ST131(n=5), ST38(n=4), ST44(n=2) 등 39개 타입 유전자형 확인

• 가장 많이 확인된 ST10은 사람과 연관된 주요 장외감염 병원성 대장균 계열로 우리원 연구사업 결과 가장 많이 확인된 타입이며, 인천연안에서만 확인되었음

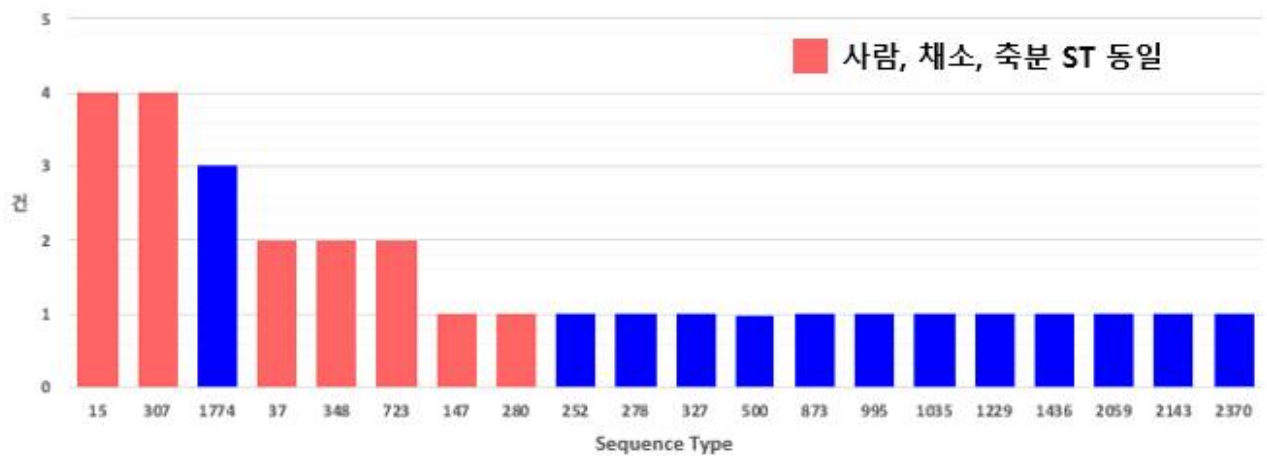
• ST10, ST38, ST58, ST69, ST73, ST101, ST117, ST131, ST155, ST156, ST410, ST648, ST5229 총 13개 타입은 사람, 채소, 축분에서 분리된 ST과 동일함

• 사람-채소-축분 유래 항생제 내성균 해양환경에 광범위하게 확인됨



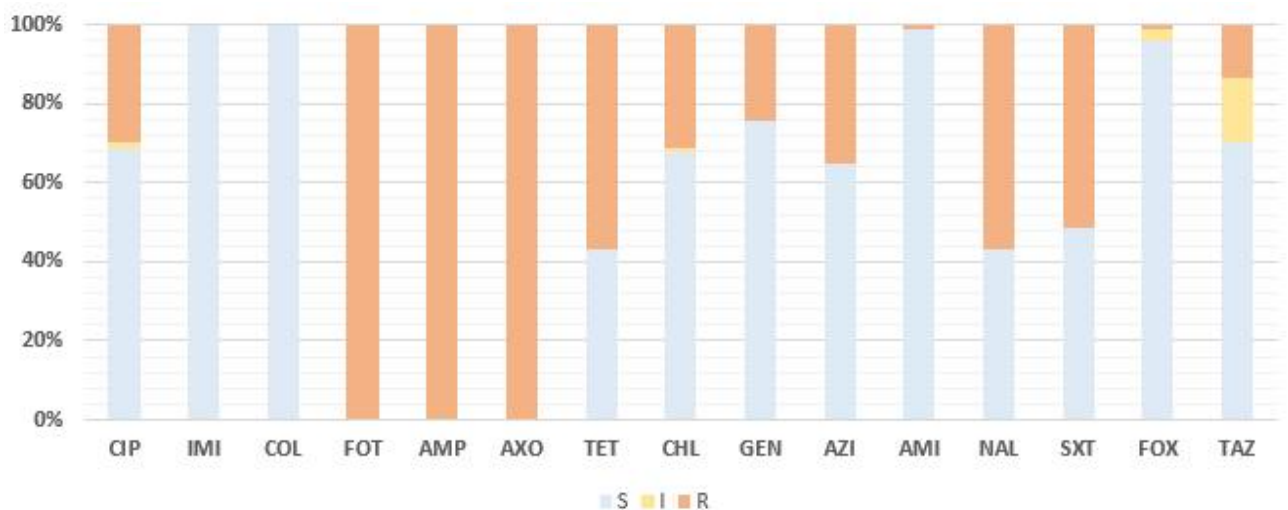
– (KP-ESBL)

- ST15(n=4), ST307(n=4), ST1774(n=3) 등 20개 타입 유전자형 확인
- ST307은 2017년 국내 신생아 집중치료실에서 발생한 타입이며, 인천연안에서만 확인되었음
- ST15, ST307, ST37, ST348, ST723, ST147, ST280 총 7개 타입은 사람, 채소, 축분에서 분리된 ST과 동일함



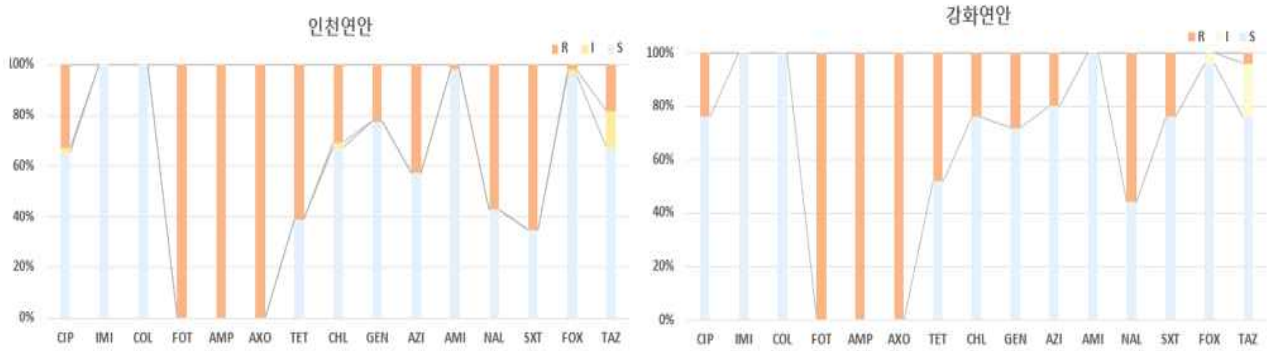
○ 항생제 감수성 검사

– (EC-ESBL)

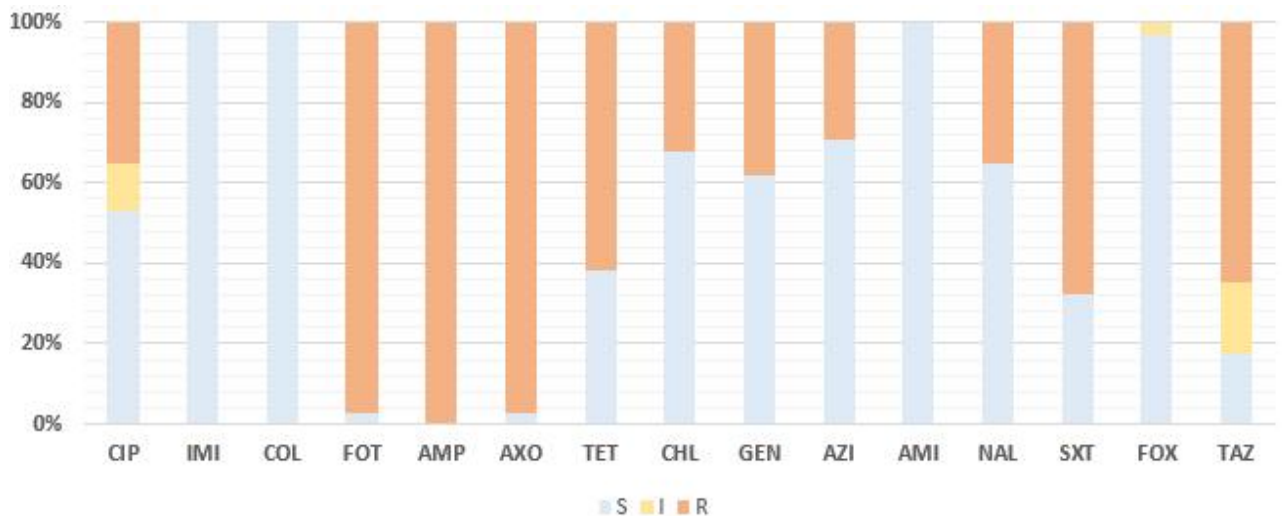




- Cefotaxim, Ampicillin, Ceftriaxone(100%), Tetracycline, Nalidixic Acid(56.8%), Trimethoprim/Sulfamethoxazole(51.4%) 순으로 내성 확인
- Imipenem, Colistin(100%), Amikacin(98.6%), Cefoxitin(95.9%) 감수성 확인
- (EC-ESBL) 인천연안 & 강화연안 ⇒ 내성률 분포 유사



- (KP-ESBL)



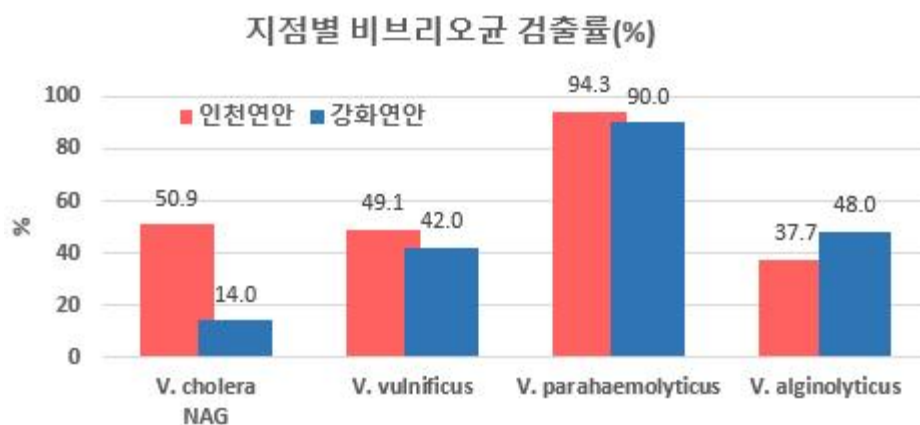
- Ampicillin(100%), Cefotaxim, Ceftriaxone(97.1%), Trimethoprim/Sulfamethoxazole(67.6%), Ceftazidime(64.7%), Tetracycline(61.8%) 순으로 내성 확인
- Imipenem, Colistin, Amikacin 100% 감수성 확인



## 2. 병원성 비브리오균 검사 현황

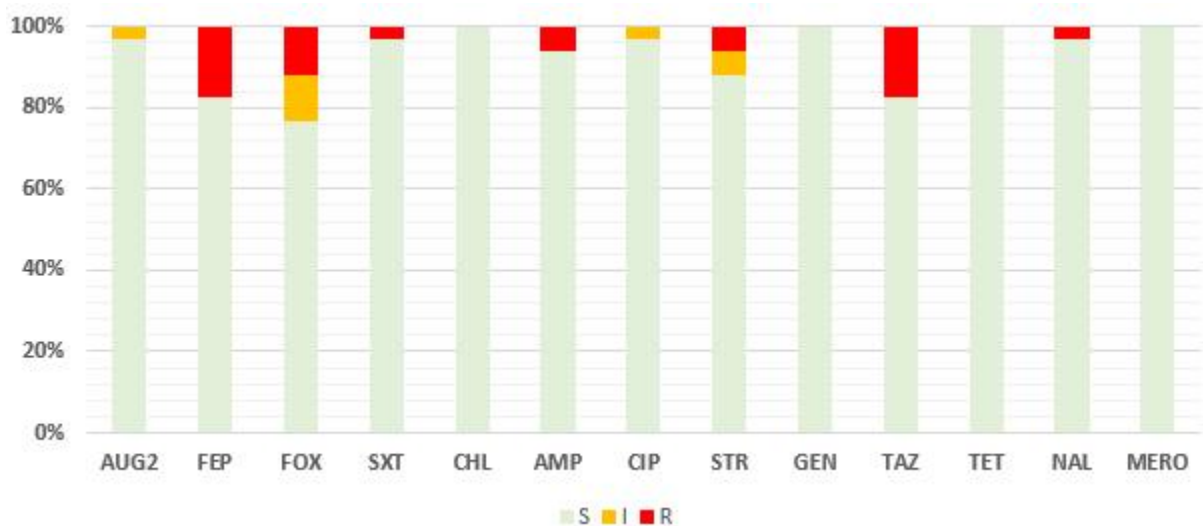
### ○ 비브리오균 분리현황

구 분	검사 건수	<i>V. cholera</i> NAG	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	분리 건수
계	103	34 (33.0%)	47 (45.6%)	95 (92.2%)	44 (42.7%)	220
인천연안 (소래·연안)	53	27 (50.9%)	26 (49.1%)	50 (94.3%)	20 (37.7%)	123
강화연안	50	7 (14.0%)	21 (42.0%)	45 (90.0%)	24 (48.0%)	97



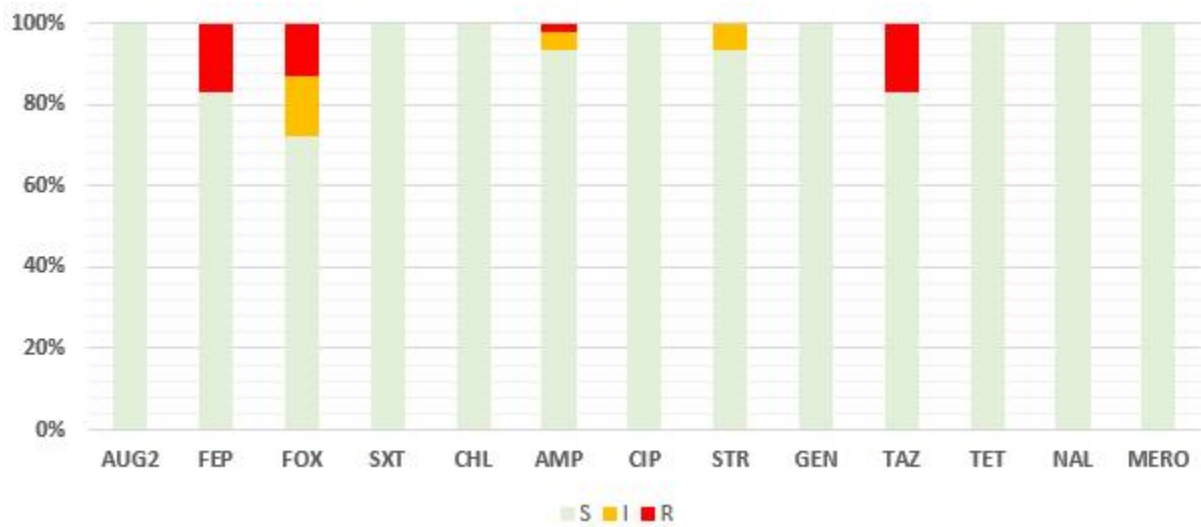
### ○ 항생제 감수성 검사

- *V. cholera* NAG (n=34)



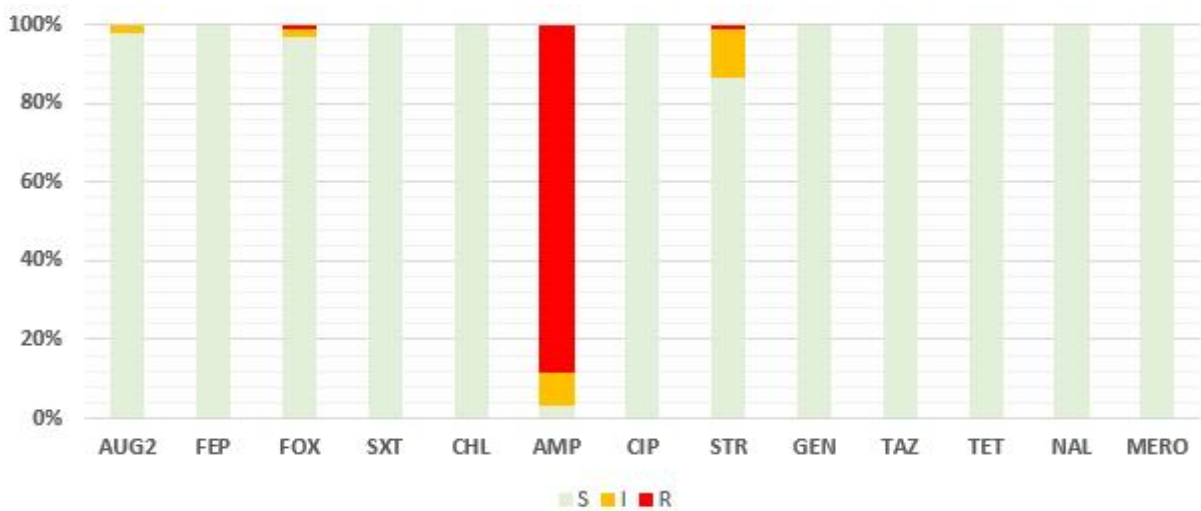
- Cefepime, Ceftazidime(17.6%), Cefoxitin(11.8%). Ampicillin, Streptomycin(5.9%) 순으로 내성
- Chloramphenicol, Gentamicin 외 2종의 항생제에 100% 감수성

- *V. vulnificus* (n=47)



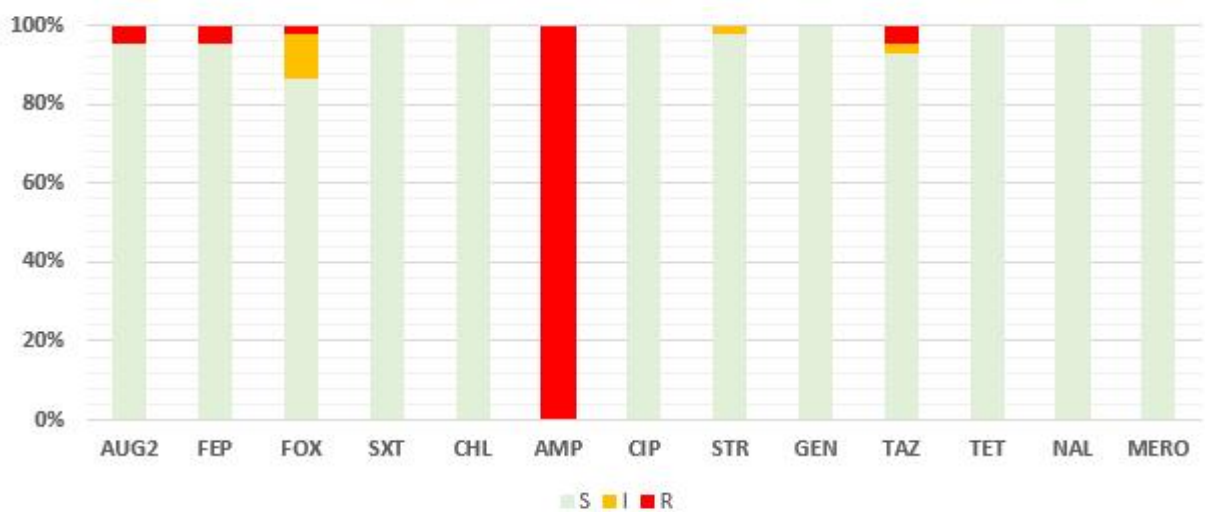
- Cefepime, Ceftazidime(17.0%), Cefoxitin(12.8%), Ampicillin(2.1%)에 내성
  - Amoxicillin/clavulanic acid, Chloramphenicol, Tetracycline 외 5종의 항생제에 100% 감수성
  - 비브리오 패혈증 치료 항생제\*에 대한 내성은 없는 것으로 확인
- \* chloramphenicol, tetracycline

- *V. parahaemolyticus* (n=95)



- Ampicillin(88.4%), Cefoxitin, Streptomycin(1.1%) 내성
- 13종 중 9종의 항생제에 100% 감수성

- *V. alginolyticus* (n=44)



- Ampicillin(100%), Amoxicillin/clavulanic acid, Cefepime, Ceftazidime(4.5%) 내성
- 13종 중 7종의 항생제에 100% 감수성

○ 패혈증균 및 장염비브리오균 병원성(독소유전자) 검사

- *V. vulnificus* (n=47)

구 분	검사 건수	Virulence gene		
		<i>glnA</i>	<i>rtxA</i>	<i>vwhA</i>
계	47	47 (100%)	17 (36.2%)	47 (100%)
인천연안 (소래·연안)	26	26 (100%)	10 (38.5%)	26 (100%)
강화연안	21	21 (100%)	7 (33.3%)	21 (100%)

- 47개 균주에 대한 각 독소유전자의 검출결과, *glnA*와 *vwhA*는 47개 균주(100%)에서 검출되었고, *rtxA*는 17개 균주에서 36.2% 검출되었음
- *rtxA*는 비브리오 패혈증균의 독소 발현에 관여하는 주요 유전자로 알려져 있으며 본 연구에서는 *rtxA* 검출률이 36.2%로 나타났음
- 해양 환경에서 분리된 균주 모두 2개 이상의 독소유전자를 보유하고 있어 잠재적인 병원성을 가지고 있음을 유추할 수 있으므로 간질환자, 면역저하자 등 고위험군의 경우 해수를 통한 창상감염에 주의가 필요함

※ 비브리오패혈증 독소유전자 관련 자료

\* 어류, 수족관수 및 환자에서 분리된 *Vibrio vulnificus*의 독소유전자 분포 및 항생제 내성 (J. Food Hyg. Saf. 2020)

→ 패혈증 환자 18건 *rtxA*(100%), *vwhA* 어류, 수족관 모두 100% 보유

\* 경기 서해안에서 분리한 비브리오 패혈증균의 특성 연구 (Korea J. Microbiol, 2021)

- 해수 42건 중 17건 *rtxA*(40.5%), 갯벌 19건 중 9건 *rtxA*(47.4%), *glnA*, *whA* 100% 보유  
 \* 국내에서 분리된 비브리오 패혈증균의 유전학적 다양성 (주간 건강과 질병 제11권 제18호)  
 → *rtxA* 독소유전자 임상 분리 균주 25주 중 19주(76.0%), 해수 17주 중 13주(76.5%) 보유, *whA* 100% 보유

- *V. parahaemolyticus* (n=95)

구 분	검사 건수	Virulence gene		
		<i>tdh</i>	<i>toxR</i>	<i>trh</i>
계	95	0 (0.0%)	95 (100%)	1 (1.1%)
인천연안 (소래·연안)	50	0 (0.0%)	50 (100%)	1 (2.0%)
강화연안	45	0 (0.0%)	45 (100%)	0 (0.0%)

- 95개 균주에 대한 각 독소유전자 검출결과, *toxR*은 95개 균주(100%)에서 검출되었고, 소래포구 1균주에서만 *trh* 검출되었음
- 대부분의 임상 균주의 경우 *tdh* 또는 *trh* 독소를 보유하지만 본 연구에서 분리된 환경 균주에서는 해당 독소가 거의 검출되지 않았음

## IV

## 연구결과

- 인천연안 해양환경(해수, 갯벌)을 대상으로 인간의 생활반경과 인접한 연안(소래포구, 연안부두)지역과 비인접 강화연안을 선정하여,
  - 지표세균의 항생제 내성균 오염실태를 조사하고 연관성을 확인하였으며, 해양상재 비브리오균에 대한 감수성 조사와 독소유전자 검사를 수행하였음
- 지표세균 검사결과 콜리스틴 내성균은 검출되지 않았으나, ESBL 생성세균은 조사지점 전체에서 확인되었음
  - 인천연안 ESBL-EC 92.5%, ESBL-KP 50.9%, 강화연안 ESBL-EC 50.0%, ESBL-KP 14.0%로 인천연안에서 높게 검출
  - ESBL 내성유전자와 MLST 분석으로 사람-가축-야생조류와 동일한 유전자 형이 해양환경에 분포함을 확인하였음
- 항생제 감수성 조사로 분리균주 전체에서 Ampicillin 내성률(100%)을 확인하였으며, 국내 축·수산물으로 가장 많이 사용되어 지속적으로 노출된 것으로 보임
- 해양환경 상재 비브리오균 총 220균주를 분리하였으며, *V. cholera* NAG (n=34), *V. vulnificus* (n=47), *V. parahaemolyticus* (n=95), *V. alginolyticus* (n=44)를 대상으로 13종 항생제에 대한 감수성을 조사하였음
  - *V. cholera* NAG / *V. vulnificus* : Cefepime (17.6% / 17.0%), Ceftazidime (17.6% / 17.0%), Cefoxitin (11.8% / 12.8%), Ampicillin (5.9% / 2.1%) 내성 확인
  - *V. parahaemolyticus* / *V. alginolyticus* : Ampicillin (88.4% / 100%) 높은 내성 확인
  - 대부분의 항생제에 감수성을 갖고 있음
- 병원성 확인을 위한 독소유전자 *V. vulnificus* (*glnA*, *rtxA*, *vvhA*), *V. parahaemolyticus* (*tdh*, *toxR*, *trh*)을 조사하였고, *V. vulnificus*는 인체 감염균주와 독소 보유여부가 유사하였으나, *V. parahaemolyticus*는 분리균주 대부분이 종특이 유전자(*toxR*)만 검출되었음