

해수 및 수산물에서 분리한 *Vibrio vulnificus*의 병원성 유전자 및 항균제 내성

박권삼* · 조의동 · 김희대¹

군산대학교 식품생명공학전공, ¹충북도립대학교 바이오생명의약과

Profiles of Virulence Genes and Antimicrobial Resistance of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated from Seawater and Fisheries

Kwon-Sam Park*, Eui-Dong Cho and Hee-Dai Kim¹

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea

¹Department of Biotechnology and Biomedicine, Chungbuk Provincial College, Cheongju 28160, Korea

We isolated 28 *Vibrio vulnificus* strains from seawater and fisheries and investigated the positive rate of eight virulence genes. Additionally, we evaluated the susceptibility of these strains to 25 antimicrobials. The positive rates of *fur*, *vvhA*, *tcp*, *rtxA*, *vcgC*, *viuB*, *vvp*, and *acfA* were 100, 92.9, 92.9, 67.9, 64.3, 25.0, 14.3, and 7.1%, respectively. A disk diffusion susceptibility test revealed that, all the investigated strains had the highest resistance to amoxicillin and oxacillin, followed by that to streptomycin (96.4%), cefoxitin (92.9%), clindamycin (82.1%), amikacin (67.9%), vancomycin (46.4%), nalidixic acid (7.1%), penicillin G (7.1%), and ampicillin (3.6%). Moreover, they were susceptible to 10 other antimicrobials, including cefotaxime, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, and rifampicin. Notably, amoxicillin, oxacillin, and streptomycin had average minimum inhibitory concentrations of 132.6, 603.4, and 23.1 µg/mL against *V. vulnificus*, respectively. These observations provide new insights regarding the necessity for sanitation of commercial fisheries and can potentially, help reduce the risk posed by fisheries contaminated with bacteria resistant to antimicrobials.

Key words: Antimicrobial resistance, Minimum inhibitory concentration, *Vibrio vulnificus*, Virulence gene

서론

비브리오균은 *Vibrionaceae*과 *Vibrio*속의 그람 음성 무포자 간균으로 담수, 기수 및 해수에서 검출되며 *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. holisae* 등 12종은 사람 또는 어류에 질병을 유발하는 병원성 비브리오균으로 보고되어 있다(Balows et al., 1991; Thompson et al., 2004; Baker-Austin et al., 2018). 병원성 비브리오균에 의한 감염질환은 전세계적으로 발생하고 있으며 우리나라에서는 콜레라균(*V. cholerae*), 비브리오패혈증균(*V. vulnificus*) 및 장염비브리오균(*V. parahaemolyticus*)은 감염병의 예방 및 관리에 관한 법률에 근거하여 각각 제2급감염병, 제3급감염병 및 식중독세균으로 지정하여 관리하고 있다(KDCA, 2021; MFDS,

2021).

*V. vulnificus*는 수온이 9°C에서 31°C 사이의 해수 및 기수에서 주로 검출되는데 수온이 18°C 이상에서는 활발하게 증식하지만 10°C 이하의 수온에서는 측정 불가능한 수준으로 감소하며(Kaspar and Tamplin, 1993), 염분농도가 15-25 psu (practical salinity unit) 사이의 물에서는 잘 증식하지만 30 psu 이상이 되면 이 균의 농도는 현저히 감소한다고 보고되어 있다(Motes et al., 1998). *V. vulnificus*에 의한 감염은 이 균에 오염된 조개류 및 어류 등의 해산물 섭취에 의한 경구 감염 또는 피부 상처를 통한 창상 감염이며, 증상은 발열, 오한, 복통, 설사 및 피부 병변 등이며 간질환자, 당뇨병, 만성신부전증환자 또는 기저질환자가 이 균에 감염되면 사망률은 50% 이상인 것으로 보고되어 있다(Brauns et al., 1991; Jones and Oliver, 2009; Mat-

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

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



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0918>

Korean J Fish Aquat Sci 54(6), 918-926, December 2021

Received 26 August 2021; Revised 7 October 2021; Accepted 8 October 2021

저자 직위: 박권삼(교수), 조의동(대학원생), 김희대(교수)

sumoto et al., 2010; Oliver, 2015). *V. vulnificus*의 주요 병원성 유전자는 hemolysin gene (*vhA*), RTX toxin gene (*rtxA*), siderophore-encoding gene (*viuB*), virulence-correlated gene (*vcgC*), ferric uptake regulator gene (*fur*), metalloprotease gene (*vvp*), toxin co-regulated pilus gene (*tcp*) 및 accessory colonization factor protein gene (*acfA*) 등이 있으며, 병원성은 여러 인자의 복합 작용에 의한 것으로 알려져 있다(Bogard and Oliver, 2007; Jones and Oliver, 2009; Oliver, 2015; Baker-Austin and Oliver, 2018; Li et al., 2019; Pettis and Mukerji, 2020; Yuan et al., 2020).

질병관리청의 통계에 의하면 2011년부터 2019년까지 최근 9년간 국내에서 발생한 *V. vulnificus*에 의한 환자는 총 460명으로 8월과 9월에 65.2%의 환자가 발생하였으며 사망자는 217명으로 사망률은 47.2%이었다(KDCA, 2021).

기후 온난화로 인한 한반도의 아열대화가 빠르게 진행되고 있으며 연근해 해양환경의 변화도 가속화됨에 따라 병원성 비브리오균에 의한 식중독 사고 및 감염병 발생 가능성은 점차 높아지고 있는 실정이다. 따라서 병원성 비브리오균에 의한 식중독 사고 및 감염병 질환을 억제하기 위해서는 유통 수산물의 위생적인 취급 및 유통에 대한 체계적인 감시가 절실히 요구되고 있는 실정이다.

본 연구는 *V. vulnificus*의 관리 및 질병 예방을 위한 기초자료를 제공하기 위하여 해수 및 수산물에서 분리한 *V. vulnificus*의 병원성 유전자 분포 및 항균제 내성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

실험에 사용한 *V. vulnificus*는 2018년 4월부터 2018년 11월까지 전북 곰소만 및 변산 해역(Cho and Park, 2019) 8개 정점의 표층 해수(Fig. 1)에서 분리한 5균주와 2018년 6월부터 2018년 11월까지 군산시 해망동 소재의 군산수산물센터에서 시판되고 있는 총 41건 수산물(전어 10건, 바지락 5건, 백합 5건, 소라 5건, 가자미 4건, 갈치 4건, 주꾸미 4건, 멧게 2건 및 꼬시래기 2건)에서 분리한 23균주를 포함한 28균주 및 병원성 유전자 유무를 판정하기 위하여 *V. vulnificus* KCCM 41665 균주를 사용하였다. 항균제 감수성 정도 관리에는 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 균주를 사용하였다.

*V. vulnificus*의 분리 및 동정

해수 및 수산물에서 *V. vulnificus*의 분리 및 동정은 다음과 같이 실시하였다. 시료 25-30 g에 9배량의 phosphate buffered saline (PBS; 140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4)을 가하고 2분간 균질화 후 10 mL를 2% NaCl이 첨가된 double strength alkaline peptone water (APW;



Fig. 1. Location of sampling stations in Gomsobay and Byeonsan area, the west coast of Korea, from April 2018 to November 2018.

pH 8.5) 10 mL에 접종하였으며, 해수는 10 mL double strength alkaline peptone water (APW; pH 8.5)에 10 mL를 접종하여 35±1.0°C에서 16-18시간 배양하였다. 배양액은 thiosulfate-citrate-bile salts (TCBS) agar (Difco, Detroit, MI, USA)에 백금이로 접종 후 35±1.0°C에서 18-24시간 배양하였다. TCBS 배지에서 *V. vulnificus*로 추정되는 전형적인 2-3 mm 크기의 청록색 집락을 순수 분리하여 VV2055918 유전자(Kim et al., 2015)의 존재 유무를 PCR assay로 확인하여 *V. vulnificus*로 동정하였다. PCR assay를 위한 주형 DNA 준비는 배양액 1 mL를 eppendorf tube (AXYGEN Inc., Union City, CA, USA)에 취한 후 10,770 g에서 2분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 여기에 멸균 증류수 100 µL을 가하여 현탁 후 100°C에서 10분 열처리하고 얼음에서 2분간 식힌 후 10,770 g에서 1분간 원심분리하여 상층액을 PCR assay를 위한 template DNA로 사용하였다. PCR 조건은 94°C 5분간 1회 열 변성 후 94°C 30초, 64°C 30초 및 72°C 30초를 한 단위로 하여 25회 반복 후 72°C에서 10분간 1회 추가로 DNA를 증폭하였다(Kim et al., 2015). PCR은 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며 PCR product 10 µL를 1.5% agarose gel에 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4; Marne-la-Vallée, France)사 Gel-Doc system으로 DNA 증폭 여부를 확인하였다. 동정이 완료된 *V. vulnificus*는 최종 농도 15%가 되도록 멸균된 글리세린을 첨가하여 cryovial storage box (Simport, Belleil QC, Canada)에 넣어 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 유전자 증폭을 위한 각종 효소는 Takara (Otsu, Japan)사의 제품을 사용하였으며, 용혈능 시험은 Sheep blood agar plate (ASAN Pharm Co., Ltd., Hwasung, Korea)에 시험 균주를 접종하여 35±1.0°C에서 18시간 배양 후 투명환의 형성 여부로 용혈능을 확인하였다.

병원성 유전자의 분석

*V. vulnificus*의 8종 병원성 유전자의 분석에 사용한 primers의 염기서열, 증폭 DNA 크기 및 annealing 온도 등은 Table 1에 나타내었으며, primers는 Bioneer (Daejeon, Korea)사에 의뢰 합성하였다. 사용한 template DNA는 동정에 사용한 것과 동일한 것을 사용하였으며, PCR 조건에서 증폭 산물이 1.0 kb 이상인 *vvp* 및 *tcp* 유전자의 extension 시간은 120초간 실시하였으며, 기타 유전자의 extension 시간은 30초간 실시하였다. PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Vilber Lourmat (Bio-Paint ST4, Marne-la-Vallée, France)사 Gel-Doc system으로 확인하였다.

항균제 감수성 시험

시험 균주의 항균제 감수성은 Becton Dickinson (BBL Sensi-Disk, Sparks, MD, USA)사의 항균제 디스크 제품을 사용하여 Acar and Goldstein (1991)의 디스크확산법으로 시험하였다. LB broth (tryptone 1.0%, yeast-extract 0.5%, NaCl 3%)에 시험 균주를 접종하여 35±1.0°C에서 하룻밤 진탕 배양 후 균체는 PBS (140 mM NaCl, 5 mM anhydrous Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4)로 2회 세정하고 농도를 McFarland No. 0.5로 조정하여 두께 0.4 mm의 Mueller Hinton agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 평판에 멸균 유리봉으로 균을 접종하였다. 여기에 검사 항균제 디스크를 고착하여 35±2.0°C에서 16-18시간 배양 후 각 항균제에 의해 형성된 생육저지환의 크기를 측정하고 시험 균주의 항균제 감수성, 중간내성 및 내성의 정도는 Clinical and Laboratory Standards

Institute (CLSI, 2010)의 기준에 따라 판정하였다. 시험 항균제는 amikacin (30 µg), amoxicillin (25 µg), ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefuroxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cephalothin (30 µg), cephalosin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), nitrofurantoin (100 µg), norfloxacin (10 µg), oxacillin (1 µg), penicillin G (10 µg), rifampicin (5 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), ticarcillin (75 µg) 및 vancomycin (30 µg) 등 25종의 항균제 디스크를 사용하였다. Multiple antimicrobial resistance (MAR) index는 내성을 나타내는 항균제 수를 실험에 사용한 전체 항균제 수로 나눈 값으로 계산하였다.

최소발육억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)의 측정

최소발육억제농도를 측정하기 위한 항균제는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하여 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010)에 기초한 변법으로 측정하였다. 멸균된 Mueller Hinton broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 2,048 µg/mL에서 1 µg/mL 까지 절반씩 농도를 달리한 항균제를 첨가한 후 멸균된 소형 시험관에 각 농도의 항균제가 첨가된 배지를 2 mL씩 분주하였다. 여기에 식염이 3% 첨가된 LB broth에서 하룻밤 전 배양한 시험균액 3 µL을 접종하여 35±2.0°C에서 16-18시간 정지 배양 후 균 증식 여부는 육안으로 확인하여 최소발육억제농도를 측정하였다.

Table 1. Primers used in this study

| Gene | Sequence (5'-3') | Amplicon size (bp) | Annealing temperature (°C) | Reference |
|------------------|---|--------------------|----------------------------|------------------------|
| <i>VV2055918</i> | 5'-CAGCCGGACGTCGTCCATTTTG-3' 5'-ATGAGTAAGCGTCCGACGCGT-3' | 484 | 64 | Kim et al. (2015) |
| <i>vwhA</i> | 5'-TTCCAACCTCAAACCGAACTATGAC-3' 5'-ATTCCAGTCGATGCCAATACGTTG-3' | 205 | 65 | Brasher et al. (1998) |
| <i>viuB</i> | 5'-GGTTGGGCACTAAAGGCAGATATA-3' 5'-CGGCAGTGGACTAATACGCAGC-3' | 504 | 65 | Panicker et al. (2004) |
| <i>vcgC</i> | 5'-AGCTGCCGATAGCGATCT-3' 5'-CGCTTAGGATGATCGGTG-3' | 278 | 56 | Rosche et al. (2005) |
| <i>rtxA</i> | 5'-TCGAATACCACAGCCGTAGC-3' 5'-CACCATTAACGCGAGAGCAT-3' | 470 | 58 | Yoon et al. (2020) |
| <i>fur</i> | 5'-CGGAATTCATGTCAGACAATAACCAAG-3' 5'-CCGCTCGAGTTAGTTCTTACGTTTATGT-3' | 450 | 55 | Li et al. (2019) |
| <i>acfA</i> | 5'-ACACTTCTTGCGTTACTTG-3' 5'-ACTTGCTTGGCTTTGATT-3' | 320 | 55 | Li et al. (2019) |
| <i>vvp</i> | 5'-CGGATCCATGAAACACAACCAACGT-3' 5'-CCGCTCGAGTCAATATTGAAGCTTTA-3' | 1,830 | 55 | Li et al. (2019) |
| <i>tcp</i> | 5'-CCTTCTCGTCCCTTTATG-3' 5'-CTTCCGAACCTTTATTGC-3' | 1,069 | 55 | Li et al. (2019) |

결과 및 고찰

해수 및 수산물에서 *V. vulnificus*의 분리 및 동정

2018년 4월부터 11월까지 전라북도 곰소만과 변산 해역의 8개 정점에서 매월 1회 총 64건의 표층 해수에서 10균주의 *V. vulnificus*를 분리하였다(Cho and Park, 2019). 곰소만 및 변산 해역의 표층 해수에서 *V. vulnificus*는 3.6-23 MPN/100 mL의 수준에서 검출되었으며(검출율은 20.3%), 7월에서 10월 사이의 수온이 20°C 이상의 해수에서 검출되었다(Cho and Park, 2019). 또한 수산물은 2018년 6월부터 11월까지 군산수산물센터에서 구입한 10건 전어에서 28균주, 4건 가자미에서 6균주, 4건 갈치에서 2균주, 5건 바지락에서 6균주, 5건 백합에서 4균주, 5건 소라에서 7균주, 2건 멍게에서 2균주, 4건 주꾸미에서 3균주, 2건 꼬시래기에서 3균주 등 총 41건 시판 수산물에서 61균주의 *V. vulnificus*를 분리하였다. 동일 시료에서 분리한 *V. vulnificus*는 8종 병원성 유전자의 보유성 결과에 따라 보유성이 동일한 경우에는 1균주만을 선택하고 나머지 균주는 배제하여 전어 유래 12균주, 해수 유래 5균주, 바지락, 갈치 및 백합 유래 각 2균주, 가자미, 소라, 꼬시래기, 멍게 및 주꾸미 유래 각 1균주씩 총 28균주를 최종선별하여 추후 실험에 사용하였다.

*V. vulnificus*의 병원성 유전자 분석

해수 및 수산물에서 분리한 28균주 *V. vulnificus*에 대한 8종 병원성 유전자(*vvhA*, *viuB*, *vcgC*, *rtxA*, *fur*, *acfA*, *vvp* 및 *tcp*)의 존재 유무는 PCR assay로 분석하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 분석결과, 28균주 *V. vulnificus*는 1종에서 7종의 병원성 유전자 보유까지 총 10개 그룹으로 분류되었다. 5종의 병원성 유전자(*vvhA*, *vcgC*, *rtxA*, *fur* 및 *tcp*)를 보유하고 있는 type 6이 11균주(39.3%)로 가장 높은 빈도를 나타내

며, 6종의 병원성 유전자(*vvhA*, *viuB*, *vcgC*, *rtxA*, *fur* 및 *tcp*)를 보유하고 있는 type 9는 5균주(17.9%)로 다음이었다. 가장 많은 병원성 유전자를 보유하는 균주는 7종의 병원성 유전자(*vvhA*, *viuB*, *vcgC*, *rtxA*, *fur*, *acfA* 및 *tcp*)를 보유하는 type 10의 1균주(3.6%)였다. 병원성 유전자별 보유율은 *fur* (100%), *vvhA* (92.9%), *tcp* (92.9%), *rtxA* (67.9%), *vcgC* (64.3%), *viuB* (25.0%), *vvp* (14.3%) 및 *acfA* (7.1%)로 확인되었다. 해수와 수산물을 분리하여 병원성 유전자의 보유율을 정리해 보면 *vvhA*와 *tcp* 유전자의 경우, 수산물 유래 모든 균주는 양성인 반면 해수 유래 균주는 3균주에서 양성이었다. *rtxA*와 *vcgC* 유전자는 수산물 유래 16균주 및 15균주에서 양성인 반면 해수 유래 균주는 3균주에서 공히 양성이었다. *viuB*, *vvp* 및 *acfA* 유전자는 수산물 유래 6균주, 4균주 및 2균주에서 양성인 반면 해수 유래 균주는 1균주에서만 *viuB* 유전자를 보유하고 있으나 *vvp*와 *acfA* 유전자는 모든 균주에서 음성이었다. 결과적으로 해수 및 수산물에서 분리한 28균주 *V. vulnificus*의 주요 병원성 유전자는 *fur*, *vvhA*, *tcp*, *rtxA* 및 *vcgC*인 것으로 확인되었으며 해수보다는 수산물 유래 균주에서 병원성 유전자의 보유성이 대체로 높게 나타났다. 인천지역 해양환경에서 분리한 209균주 *V. vulnificus*를 대상으로 병원성 유전자인 *vvhA* 및 *viuB*의 존재유무를 PCR로 검토한 결과, *vvhA*는 206균주(98.6%) 및 *viuB*는 110균주(52.6%)가 양성이었다는 보고가 있으며(Oh et al., 2007), 우리나라 전국 연안의 145개소 정점의 해수에서 분리한 *V. vulnificus*는 2017년도와 2018년도에 각각 15.82% 및 21.81% 비율로 검출되었으며, 병원성 유전자 *vvhA*의 검출율은 13.17% 및 19.40%이었다는 보고가 있다(Lee et al., 2019). 전라남도 지역의 어류, 횡집 수족관수 및 환자에서 분리한 23균주 *V. vulnificus*에 대한 독소 유전자(*rtxA*, *viuB* 및 *vvhA*)를 PCR과 real-time PCR로 분석한 결과, *viuB*와 *vvhA* 유전자는 100% 양성을 나타내었으며, *rtxA* 유전자는 19균주(82.6%)에

Table 2. Virulence gene patterns of *V. vulnificus* strains isolated from seawater and fisheries

| Virulence type | No. of strains | Virulence gene | | | | | | | |
|--------------------|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|------------|------------|
| | | <i>vvhA</i> | <i>viuB</i> | <i>vcgC</i> | <i>rtxA</i> | <i>fur</i> | <i>acfA</i> | <i>vvp</i> | <i>tcp</i> |
| 1 | 2 | - ¹ | - | - | - | + ² | - | - | - |
| 2 | 2 | + | - | - | - | + | - | - | + |
| 3 | 1 | + | - | - | + | + | - | - | + |
| 4 | 1 | + | - | - | - | + | + | - | + |
| 5 | 3 | + | - | - | - | + | - | + | + |
| 6 | 11 | + | - | + | + | + | - | - | + |
| 7 | 1 | + | - | - | + | + | - | + | + |
| 8 | 1 | + | + | + | - | + | - | - | + |
| 9 | 5 | + | + | + | + | + | - | - | + |
| 10 | 1 | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Detection rate (%) | | 92.9 | 25.0 | 64.3 | 67.9 | 100.0 | 7.1 | 14.3 | 92.9 |

¹ -, negative. ²+, positive.

서 양성이었다는 결과도 있다(Yoon et al., 2020). 본 연구 결과와 기존의 연구결과에서 *V. vulnificus*의 병원성 유전자의 보유성에 차이가 나는 이유는 분리원, 분리시기 및 분리장소 등이 다르기 때문인 것으로 판단된다. 또한 28균주 *V. vulnificus*의 용혈능 시험에서 26균주는 균체 주위에 β -용혈능을 나타내지만 해수에서 분리한 *vvhA* 미보유 2균주는 α -용혈능을 나타내었다(결과 미제시).

*V. vulnificus*의 항균제 내성을 및 내성 양상 분석

해수 및 시판 수산물에서 분리한 28균주 *V. vulnificus*를 대상으로 25종의 항균제에 대한 내성 및 감수성 실험은 디스크 확산법으로 분석하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 실험에 사용한 28균주의 전부 또는 일부 균주는 25종 항균제 중 15종의 항균제에 내성을 보이며 내성율은 amoxicillin (100%), oxacillin (100%), streptomycin (96.4%), cefoxitin (92.9%), clindamycin (82.1%), amikacin (67.9%), vancomycin (46.4%),

nalidixic acid (7.1%), penicillin G (7.1%), ampicillin (3.6%), cephalothin (3.6%), cephazolin (3.6%), kanamycin (3.6%), norfloxacin (3.6%), 및 ticarcillin (3.6%) 순서였다. 그러나 cefotaxime, cefuroxime, ceftriaxone, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, nitrofurantoin, rifampicin 및 tetracycline 등 10종의 항균제에는 모든 균주가 감수성을 나타내었다. 분리원에 따른 내성 항균제의 수는 갈치 8.0종, 바지락 및 가자미는 7.0종, 전어는 6.7종, 소라, 꼬시래기 및 주꾸미는 6.0종, 해수 및 백합은 5.0종 및 멧게는 4.0종의 항균제에 내성을 나타내었다.

인천지역 해양환경에서 분리한 233균주 *V. vulnificus*를 대상으로 21종의 항균제에 대한 내성을 검토한 결과 streptomycin (14.9%), cefazolin (11.4%), cefoxitin (9.7%), nalidixic acid (6.2%), amikacin 및 cephalothin (5.7%)이며, imipenem과 sulfamethoxazole/trimethoprim에는 감수성을 나타낸다는 보고가 있으며(Oh et al., 2007), 우리나라 거제도 연안해역의 해

Table 3. Antimicrobial susceptibility and resistance of *V. vulnificus* strains isolated from seawater and fisheries

| Antimicrobials | Disc content (μ g) | No. of isolates | | |
|---------------------|----------------------------|-----------------|--------------|-------------|
| | | Resistant | Intermediate | Susceptible |
| Amikacin (AK) | 30 | 19 | 0 | 9 |
| Amoxicillin (AML) | 25 | 28 | 0 | 0 |
| Ampicillin (AMP) | 10 | 1 | 0 | 27 |
| Cefotaxime (CTX) | 30 | 0 | 2 | 26 |
| Cefoxitin (FOX) | 30 | 26 | 2 | 0 |
| Cefuroxime (CXM) | 30 | 0 | 0 | 28 |
| Ceftriaxone (CRO) | 30 | 0 | 0 | 28 |
| Cephalothin (KF) | 30 | 1 | 1 | 26 |
| Cephazolin (KZ) | 30 | 1 | 0 | 27 |
| Chloramphenicol (C) | 30 | 0 | 0 | 28 |
| Ciprofloxacin (CIP) | 5 | 0 | 0 | 28 |
| Clindamycin (CC) | 2 | 23 | 5 | 0 |
| Erythromycin (E) | 15 | 0 | 0 | 28 |
| Gentamicin (GN) | 10 | 0 | 0 | 28 |
| Kanamycin (K) | 30 | 1 | 21 | 6 |
| Nalidixic acid (NA) | 30 | 2 | 0 | 28 |
| Nitrofurantoin (F) | 100 | 0 | 1 | 27 |
| Norfloxacin (NOR) | 10 | 1 | 0 | 27 |
| Oxacillin (OX) | 1 | 28 | 0 | 0 |
| Penicillin G (P) | 10 | 2 | 0 | 26 |
| Rifampicin (RD) | 5 | 0 | 0 | 28 |
| Streptomycin (S) | 10 | 27 | 1 | 0 |
| Tetracycline (TE) | 30 | 0 | 1 | 27 |
| Ticarcillin (TIC) | 75 | 1 | 0 | 27 |
| Vancomycin (VA) | 30 | 13 | 11 | 4 |

수와 동물성 플랑크톤에서 분리한 16균주 *V. vulnificus*를 대상으로 실시한 19종의 항균제에 대한 내성은 piperacillin (6.3%), trimethoprim (6.3%) 및 rifampin (93.7%)이며, ampicillin을 포함한 16종의 항균제에는 모든 균주가 감수성이었다는 결과도 있다(Yang et al., 2017). 환자에서 분리한 18균주 *V. vulnificus*를 15종의 항균제를 대상으로 내성을 분석한 결과, cefoxitin에 18균주 중 17균주(94.4%)가 내성을 나타내지만 ampicillin, chloramphenicol 및 tetracycline 등 14종의 항균제에 대해서는 모든 균주가 감수성이었다는 결과도 있다(Yoon et al., 2020). 또한 말레이시아 양식장에서 분리한 52균주 *V. vulnificus*를 대상으로 7종의 항균제에 대한 내성을 검토한 결과 ampicillin (63.5%), penicillin (63.5%), bacitracin (55.8%), erythromycin (38.5%), streptomycin (28.8%), tetracycline (25.0%) 및 vancomycin (53.5%)의 결과도 있다(Amalina et al., 2019). 본 연구 결과와 기존의 연구결과에는 사용한 항균제 종류에서 약간의 차이가 있다는 점과 각종 항균제에 대한 *V. vulnificus*의 내성 및 감수성에서 차이가 있는데 이유는 분리원, 분리시기 및 분리장소 등이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

또한 내성을 나타내는 15종 항균제에 대한 실험에 사용한 28균주에 대한 항균제 내성 양상은 Table 4에 나타내었다. 항균제 내성 양상은 3종에서 13종까지 12종류의 다양한 조합의 내성 양상을 나타내고 있는데 amoxicillin-oxacillin-streptomycin 3종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 1균주(3.6%)이며 MAR index는 0.12로 확인되었다. Amoxicillin-clindamycin-cefoxitin-oxacillin 조합 및 amoxicillin-cefoxitin-oxacillin-streptomycin 조합의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 각 1

균주이며 MAR index는 0.16이었다. Amikacin-amoxicilline-clindamycin-oxacillin-streptomycin 조합, amikacin-amoxicilline-cefoxitin-oxacillin-streptomycin 조합 및 amoxicilline-clindamycin-cefoxitin-oxacillin-streptomycin 조합 5종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 1균주, 2균주 및 3균주이며 MAR index는 0.20이었다. 6종의 항균제 즉, amikacin-amoxicilline-clindamycin-cefoxitin-oxacillin-streptomycin 및 amoxicilline-clindamycin-cefoxitin-oxacillin-streptomycin-vancomycin 조합에는 6균주 및 2균주가 내성을 나타내었다. Amikacin-amoxicilline-clindamycin-cefoxitin-oxacillin-streptomycin-vancomycin 7종의 항균제에 내성을 나타내는 균주는 8균주(28.6%)로 가장 높은 내성 빈도를 나타내는 조합으로 확인되었다. Amikacin-amoxicilline-clindamycin-cefoxitin-nalidixic acid-oxacillin-streptomycin-vancomycin 및 amoxicilline-cefoxitin-cephalothin-cephazolin-oxacillin-penicillin G-streptomycin-vancomycin 조합은 각 1균주로 확인되었다. 가장 많은 항균제에 내성을 나타내는 1균주는 전어에서 분리한 균주로 amikacin-amoxicilline-ampicillin-clindamycin-cefoxitin-kanamycin-nalidixic acid-norfloracin-oxacillin-penicillin G-streptomycin-ticarcillin-vancomycin 13종 항균제에 내성을 나타내며 MAR index는 0.52로 확인되었다. 결과적으로 실험에 사용한 28균주 *V. vulnificus*는 평균 6.2종의 항균제에 내성을 갖고 있다는 점에서 다제내성의 심각성은 대두될 것으로 판단된다.

내성 항균제에 대한 *V. vulnificus*의 최소발육억제농도 측정 1균주라도 내성을 나타내는 15종 항균제에 대한 *V. vulnificus*

Table 4. Antimicrobial resistance patterns and multiple antimicrobial resistance (MAR) indices of *V. vulnificus* strains isolated from seawater and fisheries

| Antimicrobial resistant pattern | No. of resistant strains | MAR index |
|--|--------------------------|-----------|
| AML-OX-S | 1 | 0.12 |
| AML-CC-FOX-OX | 1 | 0.16 |
| AML-FOX-OX-S | 1 | 0.16 |
| AK-AML-CC-OX-S | 1 | 0.20 |
| AK-AML-FOX-OX-S | 2 | 0.20 |
| AML-CC-FOX-OX-S | 3 | 0.20 |
| AK-AML-CC-FOX-OX-S | 6 | 0.24 |
| AML-CC-FOX-OX-S-VA | 2 | 0.24 |
| AK-AML-CC-FOX-OX-S-VA | 8 | 0.28 |
| AK-AML-CC-FOX-NA-OX-S-VA | 1 | 0.32 |
| AML-FOX-KF-KZ-OX-P-S-VA | 1 | 0.32 |
| AK-AML-AMP-CC-FOX-K-NA-NOR-OX-P-S-TIC-VA | 1 | 0.52 |
| Total | 28 | |

AK, amikacin; AML, amoxicillin; AMP, ampicillin; CC, clindamycin; FOX, cefoxitin; K, kanamycin; KF, cephalothin; KZ, cephalozin; NA, nalidixic acid; NOR, norfloracin; OX, oxacillin; P, penicillin G; S, streptomycin; TIC, ticarcillin; VA, vancomycin; MAR, multiple antimicrobial resistance.

Table 5. Minimum inhibitory concentration of *V. vulnificus* strains isolated from seawater and fisheries

| Antimicrobials | µg/mL | | | | | | | | | | | |
|----------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| | <1 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1,024 |
| Amikacin | | | | | | 9 (32.1%) | 19 (67.9%) | | | | | |
| Amoxicillin | | | | | | | | 26 (92.9%) | | | | 2 (7.1%) |
| Ampicillin | 1 (3.6%) | | 25 (89.2%) | 1 (3.6%) | | | | | | | | 1 (3.6%) |
| Cefoxitin | | | | | | 2 (7.1%) | 26 (92.9%) | | | | | |
| Cephalothin | | | | 14 (50.0%) | 12 (42.8%) | 1 (3.6%) | | | 1 (3.6%) | | | |
| Cephazolin | | | | | | 27 (96.4%) | | | 1 (3.6%) | | | |
| Clindamycin | | | 5 (17.8%) | 4 (14.3%) | 8 (28.6%) | 11 (39.3%) | | | | | | |
| Kanamycin | | | | 6 (21.4%) | 21 (75.0%) | 1 (3.6%) | | | | | | |
| Nalidixic acid | 20 (71.4%) | 5 (17.9%) | | 1 (3.6%) | | | | | 2 (7.1%) | | | |
| Norfloxacin | 26 (92.8%) | | | 1 (3.6%) | | 1 (3.6%) | | | | | | |
| Oxacillin | | | | | | | | | | 6 (21.4%) | 14 (50.0%) | 8 (28.6%) |
| Penicillin G | | | 15 (53.5%) | 11 (39.3%) | | | | | 1 (3.6%) | 1 (3.6%) | | |
| Streptomycin | | | | | 1 (3.6%) | 14 (50.0%) | 13 (46.4%) | | | | | |
| Ticarcillin | | | | 6 (21.4%) | | 21 (75.0%) | | | | | 1 (3.6%) | |
| Vancomycin | | | | 4 (14.3%) | 11 (39.3%) | 10 (35.7%) | 2 (7.1%) | 1 (3.6%) | | | | |

의 최소발육억제농도를 측정된 결과는 Table 5에 나타내었다. Amikacin에 내성을 나타내는 19균주의 MIC는 32 µg/mL이며 나머지 9균주의 MIC는 16 µg/mL 수준으로 감수성을 나타내었다. Amoxicillin에 내성을 나타내는 26균주의 MIC는 64 µg/mL이었으나 2균주의 MIC는 1,024 µg/mL로 고도 내성을 나타내었다. Ampicillin에 내성을 나타내는 1균주의 MIC는 1,024 µg/mL로 고도 내성을 나타낸 반면 나머지 27균주의 MIC는 <1-4 µg/mL로 감수성을 나타내었다. Cefoxitin에 대해 32 µg/mL의 MIC를 나타내는 26균주는 내성을 나타낸 반면 16 µg/mL의 MIC를 나타내는 2균주는 감수성이었다. Cephalothin에 대해 128 µg/mL의 MIC를 나타내는 1균주는 내성인 반면 나머지 12균주는 4-16 µg/mL의 MIC를 나타내는 감수성이다. Cephazolin에 대해 128 µg/mL의 MIC를 나타내는 1균주는 내성인 반면 나머지는 균주의 MIC는 16 µg/mL로 감수성을 나타내었다. Clindamycin에 내성을 나타내는 23균주의 평균 MIC는

22.3 µg/mL이며 감수성을 나타내는 균주의 평균 MIC는 4 µg/mL으로 확인되었다. Kanamycin, nalidixic acid 및 norfloxacin에 내성을 나타내는 각 1균주의 MIC는 32, 128 및 16 µg/mL로 측정되었다. 또한, 28균주에서 내성을 나타내는 oxacillin은 256-1,028 µg/mL 범위이며, 평균 MIC는 603.4 µg/mL로 측정되어 매우 높은 MIC를 나타내었다. 2균주에서 내성을 나타내는 penicillin G에 대한 내성은 256-512 µg/mL 범위로 측정되었으며, 감수성 균주의 MIC는 2-4 µg/mL 수준이었다. 27균주에서 내성을 나타내는 streptomycin에 대한 내성은 16-32 µg/mL 범위로 평균 MIC는 23.7 µg/mL로 측정되었으며, 감수성 균주의 MIC는 8 µg/mL 수준이었다. 1균주에서 내성을 나타내는 ticarcillin에 대한 내성은 512 µg/mL이며 감수성 균주의 MIC는 8-16 µg/mL로 측정되었다. 13균주에서 내성을 나타내는 vancomycin에 대한 내성은 32-128 µg/mL이며 감수성 균주의 MIC는 8-16 µg/mL로 측정되었다. 결과적으로 해수 및 시판

수산물에서 분리한 28균주 *V. vulnificus*는 amoxicillin, ampicillin, cephalothin, cephalozin, nalidixic acid, oxacillin, penicillin G 및 ticarcillin 등의 항균제에 대해서는 MIC가 100.0 µg/mL 이상으로 높은 반면 amikacin, cefoxitin, clindamycin, kanamycin, norfloxacin, streptomycin 및 vancomycin 등의 항균제에 대한 MIC는 100.0 µg/mL 이하로 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다(Table 5). *V. vulnificus*의 내성 항균제에 대한 최소발육억제농도에 관한 기존의 연구결과가 없기 때문에 본 결과와 비교 설명하기에는 어려움이 있는 실정이다. 현재 *V. vulnificus* 감염 시 치료에는 cefotaxime, minocycline, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline 등의 항균제가 사용되고 있으나(Kim and Hong, 2012), 본 연구결과 모든 균주에서 MIC가 <1.0 µg/mL로 측정된 rifampicin 및 erythromycin도 *V. vulnificus*의 치료제로 유용할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2021년도 군산대학교 수산과학연구소 학술 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Acar JF and Goldstein FW. 1991. Disk susceptibility test. In: Antibiotics in laboratory medicine. Lorian V, ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, U.S.A., 17-52.
- Amalina NZ, Santha S, Zulperi D, Amal MNA, Yusof MT, Zamri-Saad M and Ina-Salwany MY. 2019. Prevalence, antimicrobial susceptibility and plasmid profiling of *Vibrio* spp. isolated from cultured groupers in peninsular Malaysia. BMC Microbiol 19, 251. <http://doi.org/10.1186/s12866-019-1624-2>.
- Baker-Austin C and Oliver JD. 2018. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. Environ Microbiol 20, 423-430. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.13955>.
- Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M, Ali A, Waldor MK, Qadri F and Martinez-Urtaza J. 2018. *Vibrio* spp. infections. Nat Rev Dis Primers 12, 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>.
- Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL and Shadomy HJ. 1991. Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington D.C., U.S.A., 384-395.
- Bogard RW and Oliver JD. 2007. Role of iron in human serum resistance of the clinical and environmental *Vibrio vulnificus* genotypes. Appl Environ Microbiol 73, 7501-7505. <https://doi.org/10.1128/AEM.01551-07>.
- Brasher CW, DePaola A, Jones DD and Bej AK. 1998. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. Curr Microbiol 37, 101-107. <https://doi.org/10.1007/s002849900346>.
- Brauns L, Hudson MC and Oliver JD. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. Appl Environ Microbiol 57, 2651-2655. <http://doi.org/10.1128/AEM.57.9.2651-2655.1991>.
- Cho ED and Park KS. 2019. Distribution of pathogenic *Vibrio* species in seawater in Gomso bay and Byeonsan, west coast of Korea. Korean J Fish Aquat Sci 52, 625-630. <http://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0625>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. M100-S20-U, CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- Jones MK and Oliver JD. 2009. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. Infect Immun 77, 1723-1733. <http://doi.org/10.1128/IAI.01046-08>.
- Kaspar CW and Tamplin ML. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. Appl Environ Microbiol 59, 2426-2429.
- KDCA (Korea Disease Control & Prevention Agency). 2021. Infectious disease portal. Retrieved from <http://www.kdca.go.kr/npt/biz/npp/ist/bass/bassDissStatsMain.do> on Aug 17, 2021.
- Kim DM and Hong SJ. 2012. *Vibrio vulnificus* sepsis. Korean J Med 82, 671-679. <https://doi.org/10.3904/kjm.2012.82.6.671>.
- Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, Kim ES and Kim HY. 2015. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. BMC Microbiol 15, 239. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0577-3>.
- Lee SH, Lee HJ, Myung GE, Choi EJ, Kim IA, Jeong YI, Park GJ and Soh SM. 2019. Distribution of pathogenic *Vibrio* species in the coastal seawater of South Korea (2017-2018). Osong Public Health Res Perspect 10, 337-342. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2019.10.6.03>.
- Li X, Zhou Y, Jiang Q, Yang H, Pi D, Liu X, Gao X, Chen N and Zhang X. 2019. Virulence properties of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased zoea of freshness shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. Microb Pathog 127, 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.002>.
- Matsumoto K, Ohshige K, Fujita N, Tomita Y, Mistumizo S, Nakashima M and Oishi H. 2010. Clinical features of *Vibrio vulnificus* infections in the coastal areas of the Ariake Sea, Japan. J Infect Chemother 16, 272-279. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0050-z>.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2021. Food poisoning statistics. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_grp=MENU_NEW02&menu_no=2786 on Aug 17, 2021.
- Motes ML, DePaola A, Cook DW, Veazey JE, Hunsucker JC, Garthright WE, Blodgett RJ and Chirtel SJ. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern gulf and Atlantic coast oysters (*Crassostrea virginica*). Appl Environ Microbiol 64, 1459-1465.

- Oh BY, Kim JH, Gong YW, Jegal S, Kim HY, Lee MY, Hwang KW, Koh YJ, Lee JM, Go JM and Kim YH. 2007. Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated in Incheon. Kor J Microbiol 43, 256-263.
- Oliver JD. 2015. The biology of *Vibrio vulnificus*. Microbiol Specrum 3, 1-10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0001-2014>.
- Panicker G, Call DR, Krug MJ and Bej AK. 2004. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. Appl Environ Microbiol 70, 7436-7444. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7436-7444.2004>.
- Pettis GS and Mukerji AS. 2020. Structure, function, and regulation of the essential virulence factor capsular polysaccharide of *Vibrio vulnificus*. Int J Mol Sci 21, 3259. <https://doi.org/10.3390/ijms21093259>.
- Rosche TM, Yano Y and Oliver JD. 2005. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. Microbiol Immunol 49, 381-389. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03731.x>.
- Thompson FL, Iida T and Swings J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. Microbiol Mol Biol Rev 68, 403-431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>.
- Yang JH, Mok JS, Jung YJ, Lee KJ, Kwon JY, Park K, Moon SY, Kwon SJ, Ryu AR and Lee TS. 2017. Distribution and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species associated with zooplankton in coastal area of Korea. Mar Poll Bull 125, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.054>.
- Yoon YH, Park S, Kim JY, Lee YJ, Jeon DY, Choi GC, Park JS and Kim JB. 2020. Prevalence of toxin genes and profiles of antibiotic resistance in *Vibrio vulnificus* isolates from fish, fish tanks, and patients. J Food Hyg Saf 35, 6-12. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.1.6>.
- Yuan Y, Feng Z and Wang J. 2020. *Vibrio vulnificus* hemolysin: biological activity, regulation of *vvhA* expression, and role in pathogenesis. Front Immunol 11, 599439. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599439>.