

## 어류 양식장에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus*의 trimethoprim 내성

오은경\* · 유홍식 · 신순범 · 손광태<sup>1</sup> · 박큰바위<sup>1</sup> · 권지영<sup>1</sup> · 이태식<sup>2</sup> · 이희정  
 국립수산물과학원 식품안전연구과, <sup>1</sup>국립수산물과학원 남해수산연구소  
<sup>2</sup>국립수산물과학원 양식환경연구소

### Trimethoprim Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from the Fish Farm

Eun-Gyoung OH, Hong-Sik YU, Soon-Bum SHIN, Kwang-Tae SON<sup>1</sup>,  
 Kun-Bawui PARK<sup>1</sup>, Ji-Young KWON<sup>1</sup>, Tae-Seek LEE<sup>2</sup> and Hee-Jung LEE  
 Food Safety Research Team, NFRDI, Busan 619-705, Korea  
<sup>1</sup>South Sea Research Institute, NFRDI, Yeosu 556-823, Korea  
<sup>2</sup>Aquaculture Environment Research Center, NFRDI, Tongyeong 650-943, Korea

*Vibrio parahaemolyticus* species, which cause acute gastroenteritis in humans, were isolated from farmed fish and seawater and their antimicrobial-resistance pattern and factor were investigated. They exhibited the highest resistance to ampicillin (88.9%), followed by trimethoprim (51.9%) and rifampin (22.2%). The relatively high resistance to trimethoprim was unexpected because trimethoprim was not commonly used in fish farming in Korea. R plasmid related resistance was identified by the treatment of novobiocin (7 ug/mL) and it was named as pVPBW1. A putative trimethoprim resistance gene in 2.0 kb fragment of pVPBW1 was also confirmed.

Key words: Antimicrobial resistance, R plasmid, trimethoprim, *Vibrio parahaemolyticus*

#### 서 론

*Vibrio parahaemolyticus*는 기수지역을 중심으로 전 세계적으로 널리 분포하는 호염성 세균이다. 이 세균의 식중독 관련성은 1950년 일본에서 최초로 밝혀졌고, 주로 하절기에 오염된 수산물의 생식이나 불충분한 가열 후 섭취 시에 발생하는 위장염의 주요 원인이 되고 있으며 일본의 경우 수산물과 관련된 위장염의 70%, 우리나라의 경우는 약 30%가 *V. parahaemolyticus*에 의한 것으로 보고되고 있다(Ham et al., 2002; Deepanjali et al., 2005).

한편 *V. parahaemolyticus*와 같은 해양상재세균과 육상유래 세균들이 어류 양식환경에 노출되는 경우 어류 질병예방 및 치료의 목적으로 사용되는 수산용 항생제에 직간접적으로 노출되어 항생제 내성을 획득하거나, 수평전이에 의해 다른 균으로부터 항생제 내성인자를 획득할 가능성이 있다. Bell et al. (1988)과 Smith (1994)는 양식장에서 사용하는 여러 항생제에 대한 내성균의 출현을 보고하였으며, Glenn et al. (2000)은 이들 항생제 내성균들이 가지고 있는 내성인자들은 사람의 질병을 유발하는 세균에 전이될 수 있는데 이때 양식어류가 매개체 역할을 할 수 있다고 보고하였다. 따라서 수산용 항생제 사용에 의한 내성균 발생의 위해평가에는 어류질병 세균뿐 아니라 인체질병세균도 포함되어야 할 것

로 여겨지고 있다.

이러한 위해평가를 위한 정보수집을 위해 우리나라 남해안 연안에서 어류양식업이 성행하고 있는 부산, 거제, 통영, 완도, 제주 등 6개 지역의 어류양식장의 양식 주요 대상어종인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 조피볼락 (*Sebastes schlegelii*), 농어 (*Lateolabrax japonicus*) 등 어류 3종과 사육용수에서 분리된 해양상재세균 및 육상유래 세균의 항생제 내성 경향을 조사하던 중 수산용으로 사용량이 많지 않은 trimethoprim에 대하여 높은 내성을 나타내는 *V. parahaemolyticus*가 발견되었다.

Trimethoprim은 합성 항균항생제로 dihydrofolate를 tetrahydrofolate로 환원시키는 dihydrofolate reductase (DHFR, *dfr*)에 길항작용을 하는데, 동물세포에는 영향을 미치지 않고, 세균에만 선택적으로 작용하므로 1962년부터 세균 감염의 치료에 사용되어왔다. 그리고 sulfonamide와 병합하면 상승작용이 있으므로 이를 이용한 병합요법이 호흡기, 피부, 장내질환 및 요로감염 등의 치료에 널리 이용되고 있다(Huovinen, 2001; Navia et al., 2004). 현재까지 알려진 trimethoprim에 대한 항균제 내성의 기전은 주로 efflux pump에 의한 투과 제한, 표적효소의 조절 변화 등이 있으나, 가장 일반적인 내성 획득의 기전은 *dfr*-유전자에 의한 감수성 유전자의 치환이다. *dfr*-유전자는 plasmid, transposon 및 integron과 같은 수평전파가 가능한 DNA 구조에 포함되어 있으며 현재까지 보고된 *dfr*-유전

\*Corresponding author: ohdagu@nfrdi.go.kr

자는 2005년에 보고된 *dfrA20*을 포함하여 25개 정도이다 (Warren et al., 1999; Kehrenberg and Schwarz, 2005). *V. cholerae* O-1/O139 혹은 non-O1/O139의 trimethoprim의 내성 기전에 관해서는 많은 연구보고가 있으나 (Waldor et al., 1996; Dalsgaard et al., 2000; Thungapathra et al., 2002), *V. parahaemolyticus*의 trimethoprim 내성기전에 대한 연구는 거의 전무한 실정으로 항생제 내성균의 관리를 위하여 보다 체계적인 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 trimethoprim에 내성을 나타내는 *V. parahaemolyticus*의 내성기전을 구명함으로써 수산용 항생제의 사용과 내성균 발생과의 상관관계 평가에 필요한 자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험균주

실험에 사용한 균주는 2005년 우리나라 남해안의 어류양식업이 성행하고 있는 부산, 거제, 통영, 여수, 완도, 제주 등 6개 지역의 어류양식장에서 채취한 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*), 농어 (*Lateolabrax japonicus*) 등 어류 3종과 사육용수로부터 분리·동정된 *V. parahaemolyticus* 27균주를 대상으로 ampicillin 등 8종의 항생제에 대한 감수성을 조사하였다. 그리고 trimethoprim에 대하여 내성을 나타내는 균주에 대해서는 최소발육억제 농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하였으며 MIC값이 1,024 ug/mL 이상인 균주에 대해서는 curing을 통해 plasmid 보유 여부를 조사하였다.

### 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 Goldstein and Acar (1991)의 디스크 확산법을 응용하여 사용하였다. 즉, 분리된 각 균주는 Muller Hinton broth (Merck, Germany)에서 35°C, 18-24시간 배양한 다음 균주 배양액 농도를 McFarland No. 0.5로 희석 조정하였다. 각각 희석된 균액을 두께가 약 4 mm가 되도록 미리 준비한 Muller Hinton agar (MHA; Merck, Germany) 평판에 도말하였다. 도말한 MHA 평판을 5분간 방치한 후 항생제 디스크를 dispenser를 이용하여 배지 상에 고착시켰다. 사용한 항생제 디스크는 ampicillin (10 ug/disk), chloramphenicol (5 ug/disk), nalidixic acid (30 ug/disk), rifampin (5 ug/disk), streptomycin (10 ug/disk), tetracycline (5 ug/disk), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25 ug/disk), trimethoprim (5 ug/disk) 등 8종으로 BBL (Becton Dickinson, USA)사 제품을 사용하였다. 항생제 디스크가 고착된 MHA 평판은 35°C, 16-18시간 배양한 다음 균의 억제대 (inhibition zone)의 크기를 calipers로 측정하여 감수성 유무를 판별하였다.

최소발육억제 농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

MIC 측정은 미국 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2004)에 준하여 실시하였다. 우선 96 wells plate에 각 농도별 trimethoprim (0-1,024 ug/mL)이 첨가된 MHB 180 uL을 분주하고 균 배양액을 20 uL 접종하여 35°C, 18시간 배양한 후 흡광도 (600 nm)를 측정하여 증식이 일어나지 않은 최소농도를 MIC값으로 결정하였다.

### Curing

Curing 실험에는 novobiocin (NB; Sigma, USA)과 sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma, USA)을 사용하였다. Novobiocin 및 SDS에 대한 MIC 값을 사전에 결정한 후 실험 시에 tryptic soy broth (TSB; Merck, Germany)에 첨가하였다. Curing 실험은 균주를 tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 35°C, 4시간 배양한 후 새로운 TSB에 1% 균배양액과 NB 및 SDS를 첨가하여 37°C, 18시간 배양하고 나서 trimethoprim (512 ug/mL)을 첨가한 thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar (Merck, Germany) 평판과 trimethoprim을 첨가하지 않은 TCBS agar 평판에 접종 후 균수를 비교하여 curing 시킨 균주를 확보하였다. 확보한 균주는 항생제 감수성 시험을 실시하여 항생제 내성 소실여부를 확인하였다.

### Plasmid 분리

Plasmid 분리는 Birnboim and Doly (1979)의 방법을 사용하였다. 즉, 균주를 35°C, 18시간 배양한 후 1.5 mL 취하여 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 모으고, 100 uL의 TEG (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) 완충용액을 넣어 계 현탁시킨 후 200 uL의 lysis (0.2 N NaOH, 1% SDS) 완충용액을 첨가하고 냉각시킨 다음 150 uL의 3 M sodium acetate (pH 4.8)을 첨가 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 여기에 동량의 PCI (Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol)을 첨가한 뒤 잘 혼합하고 원심분리하여 얻어진 상층액으로부터 plasmid를 회수하였다.

Plasmid의 확인을 위한 전기영동은 0.8% agarose gel에 1 uL의 6×loading buffer (Bioneer, Korea)와 분리한 plasmid 5 uL를 혼합하여 실시하였다. 100 volt에서 1시간 동안 전개시키고 ethidium bromide (EtBr; Sigma-aldrich, USA; 0.5 uL/mL) 용액으로 20분간 염색하여 transilluminator (High performance ultraviolet transilluminator, USA)에서 확인하였다.

### pVPBW1의 클로닝 및 특성 조사

Curing 및 plasmid 분리로 확인된 plasmid인 pVPBW1를 pUC118 vector에 클로닝하기 위하여 pVPBW1를 *Hind*III, *Eco*RI, *Sal*I 그리고 *Pst*I (Roche, Switzerland)으로 처리하였으며 pUC118는 동일한 제한효소로 처리하여 사용하였다. 처리된 단편들은 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 사용하여 연결하였으며  $CaCl_2$ 법 (Maniatis et al., 1982)으로 처리된 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환시켜 pVPBW1의 특성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리균주의 항생제 내성경향

어류양식장에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 27균주에 대한 항생제 감수성 시험결과를 Table 1에 나타내었다. 분리균주는 제 1세대 항생제인 penicillin 계열의 ampicillin에 대해 88.9%로 가장 높은 내성율을 나타내었는데, 이 결과는 Son et al. (2005)이 2004년 남해안 주요 어류양식장에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 194균주 중 97.9%가 ampicillin에 높은 내성을 보였다는 보고 및 Heo et al. (2002)가 경남 일부 지역의 양식어류에서 분리한 *Vibrio*속 62균주 중 90% 이상이 ampicillin에 내성을 나타내었다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

한편 folate pathway inhibitor 항생제인 trimethoprim에 대해서는 51.9%의 내성율을 나타내었는데, 이는 청돔 (*Sparus sarba*) 양식장에서 분리한 *Vibrio*속 균주 중 76.5%가 trimethoprim에 대해 내성을 나타낸 연구결과 (Li et al., 1999) 및 보리새우 양식장에서 분리한 *Vibrio*속 균주 중 6.3%만이 trimethoprim에 내성을 나타내었다는 보고 (Roque et al., 2001)를 참고하면 trimethoprim에 내성이 그 분리원에 따라 다소 차이가 있는 것으로 여겨진다. 이러한 사실을 고려하여 내성인자 전파경로 연구와 더불어 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다. 그 외 nalidixic acid, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, sulfamethoxazole/trimethoprim, rifampin에 대해서는 7.4-22.2% 범위의 내성율을 나타내었다.

### 최소발육억제 농도 (MIC) 측정결과

Trimethoprim에 대한 MIC를 조사한 결과 27균주 중 5균주에서 trimethoprim에 대해 1,024 ug/mL 이상, 1균주에서 32 ug/mL, 2균주에서 16 ug/mL, 그 외 19균주는 모두 8 ug/mL 이하의 값을 나타내었으며 대부분의 균주가 trimethoprim에 대하여 중간내성 (intermediate)을 나타내어 디스크 확산법에 의한 항생제 감수성 시험결과와는 다소 차이가 나타났다 (결과 미제시). 시험 균주 중 trimethoprim에 대한 MIC 값이 1,024 ug/mL 이상인 5균주에 대하여 plasmid 보유여부를 조사하였다.

### Curing에 따른 항생제 내성 변화

Trimethoprim에 내성을 가지고 있는 *V. parahaemolyticus*의

내성인자를 탐색하기 위하여 NB와 SDS를 사용하여 curing을 실시하였다. Curing을 실시하기에 앞서 NB와 SDS에 대해 MIC 값을 조사한 결과, NB는 7 ug/mL, SDS는 300 ug/mL에서 세균증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, curing 실험 시에는 그 이상의 농도를 배지에 첨가하였다. Trimethoprim에 대한 MIC 값이 높은 5균주를 대상으로 curing을 실시한 결과, SDS의 경우에는 300 ug/mL를 처리하여 trimethoprim을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 배양하였을 때 균수 차이를 확인할 수 없었으며, 균을 택하여 항생제 감수성 시험 및 MIC 값을 조사한 결과에서도 항생제 내성 변화를 관찰할 수 없었다.

그러나 NB를 7 ug/mL를 처리하여 trimethoprim을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 배양하였을 때 5균주 중 1균주 (*V. parahaemolyticus* 050919)에서만 뚜렷한 균수 차이가 나타났으며 항생제 감수성 시험 및 MIC 값 조사에서 curing된 균주에 한해서만 trimethoprim 내성이 소실된 것을 확인할 수 있었다 (Table 2).

*V. parahaemolyticus* 050919균주의 trimethoprim 내성이 curing 실시 후 그 내성이 소실된 것으로 보아 *V. parahaemolyticus* 050919균주가 가지고 있던 plasmid가 소실된 것으로 여겨졌다. 즉, 이동성인자 (mobile element)인 plasmid에 trimethoprim 내성인자가 존재할 가능성이 높을 것으로 추정되었다. Charpentier et al. (1995)은 trimethoprim에 대해 1,024 ug/mL 이상의 MIC 값을 가지는 *Listeria monocytogenes* BM4293로부터 trimethoprim 내성에 관여하는 plasmid인 pIP823를, Kehrenberg and Schwarz (2005)와 Dalsgaard et al. (2000)은 각각 *Pasteurella multocida*와 *V. cholerae* O1으로부터 pCCK154와 conjugative plasmid를 분리하여 보고하였는데 이들 모두 plasmid 내에 trimethoprim 내성에 관여하는 유전자가 존재한다고 보고하였다.

한편 plasmid에 trimethoprim 내성인자를 가질 것으로 생각되는 *V. parahaemolyticus* 050919균주 외 4균주에 대해서는 그 내성기전에 관하여 추가 연구를 실시할 계획이다.

### plasmid의 분리

Plasmid 상에 trimethoprim 내성인자가 존재하는지 확인하기 위하여 *V. parahaemolyticus* 050919균주와 050919균주로부터 curing된 일부 균주들로부터 plasmid를 분리하였다 (Fig.

Table 1. The antimicrobial susceptibilities of 27 strains of isolated *V. parahaemolyticus*

Antimicrobial agents	Disc potency (ug)	No. of isolates (%)		
		Resistance	Intermediate	Susceptible
Ampicillin	10	24 (88.9)	2 (7.4)	1 (3.7)
Chloramphenicol	5	3 (11.1)	0 (0)	24 (88.9)
Nalidixic acid	30	2 (7.4)	0 (0)	25 (92.6)
Rifampin	5	6 (22.2)	9 (33.3)	12 (44.5)
Streptomycin	10	2 (7.4)	25 (92.6)	0 (0)
Tetracycline	5	2 (7.4)	0 (0)	25 (92.6)
Sulfamethoxazole / trimethoprim	23.75 / 1.25	4 (14.8)	0 (0)	23 (85.2)
Trimethoprim	5	14 (51.9)	7 (25.9)	6 (22.2)

Table 2. The antimicrobial susceptibilities and MICs of *V. parahaemolyticus* 050919 strain and curing strains (CS1-CS7)

Strain	MIC (ug/mL)									
	AM	C	NA	RA	S	TE	SXT	TMP	TMP	
<i>V. parahaemolyticus</i> 050919	AG*	30	AG	20	18	AG	AG	AG	>1,024	
CS1	AG	30	AG	22	18	AG	12	18	<8	
CS2	AG	28	10	20	18	AG	AG	AG	>1,024	
CS3	AG	30	AG	18	16	AG	14	20	<8	
CS4	AG	30	AG	18	18	AG	14	20	<8	
CS5	AG	28	AG	16	18	AG	14	20	<8	
CS6	AG	28	AG	18	18	AG	14	20	<8	
CS7	AG	28	AG	20	20	AG	12	20	<8	

\*AG, All growth; AM, Ampicillin; C, Chloramphenicol; NA, Nalidixic acid; RA, Rifampin; S, Streptomycin; TE, Tetracycline; SXT, Sulfamethoxazole / trimethoprenem; TMP, Trimethoprim.

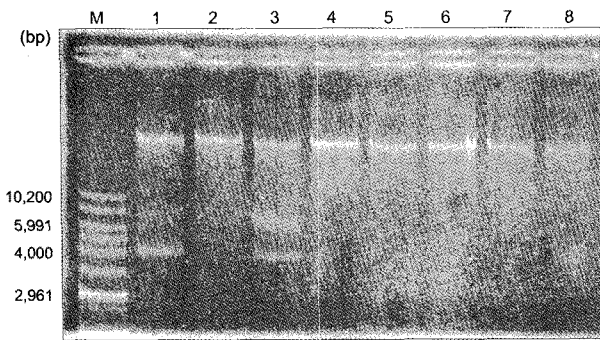


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of the isolated plasmid from *V. parahaemolyticus* 050919 and curing strains (CS1). M, 100 bp plus DNA Ladder; 1, *V. parahaemolyticus* 050919; 2, CS1; 3, CS2; 4, CS3; 5, CS4; 6, CS5; 7, CS6; 8, CS7.

1). Trimethoprim 내성균주인 *V. parahaemolyticus* 050919균주로부터 약 6.5 kb 정도의 plasmid가 존재하는 것을 확인하였으나 curing 된 7균주 중 1균주를 제외하고는 plasmid가 소실된 것으로 나타났는데, 이는 항생제 감수성 시험 결과에서 알 수 있듯이 trimethoprim에 대해 내성을 부여하는 인자가 plasmid내에 존재함을 나타내는 것으로, 내성인자를 포함하고 있는 plasmid를 pVPBW1으로 명하였다 (Table 2).

pVPBW1의 특성

pVPBW1의 특성을 조사하기 위하여 먼저 제한효소인 *Hind*III, *Eco*R1, *Sal*I, *Pst*I을 사용하여 mapping을 실시하였다 (Fig. 2). 각각의 pVPBW1의 단편들의 특성을 알아보기 위하여 동일한 제한효소를 처리한 pUC118에 sub-cloning을 실시하였으며 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환 시킨 후 plasmid를 추출하여 각각의 plasmid 단편들이 존재하는지를 확인한 후 MIC 값을 조사하였다.

pVPBW1를 각각의 제한효소로 처리하여 pUC118에 sub-cloning한 형질 전환주의 MIC 값을 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. *Hind*III로 처리한 pUC118에 sub-cloning한 약 2.0 kb의 pVPBW1 단편이 포함되어 있는 DH5 $\alpha$ /pUVPBW20에서 trimethoprim에 대하여 1,024 ug/mL 이상의 MIC 값을 나타내

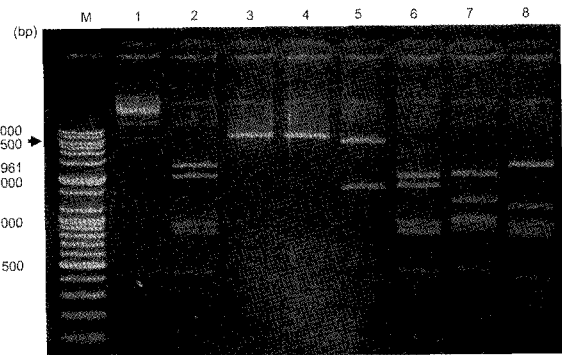


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of the restricted plasmid. M, 100 bp plus DNA Ladder; 1, pVPBW1; 2, *Hind*III; 3, *Eco*R1; 4, *Sal*I; 5, *Pst*I; 6, *Hind*III and *Eco*R1; 7, *Hind*III and *Sal*I; 8, *Hind*III and *Pst*I.

Table 3. MICs of trimethoprim for *V. parahaemolyticus* 050919 and sub-cloned strains

Strain	Trimethoprim (ug/mL)
<i>V. parahaemolyticus</i> 050919	$\geq 1024$
DH5 $\alpha$ / pVPBW1	$\geq 1024$
DH5 $\alpha$ / pUC118	<8
DH5 $\alpha$ / pUVPBW05	<8
DH5 $\alpha$ / pUVPBW08	<8
DH5 $\alpha$ / pUVPBW09	<8
DH5 $\alpha$ / pUVPBW20	$\geq 1024$
DH5 $\alpha$ / pUVPBW24	<8

었다. 그러나 다른 단편들로부터는 trimethoprim에 대한 MIC 값이 8 ug/mL 이하인 것으로 보아 trimethoprim 내성유전자는 약 2.0 kb의 단편 내에 존재하는 것으로 추정되었다 (Fig 3). Burdeska (1990)는 *Staphylococcus haemolyticus* MUR313에서 분리한 plasmid (pABU17, 3.8 kb)를 trimethoprim에 내성이 없는 *S. aureus* 113에 형질전환 시켰을 때 trimethoprim에 대한 내성이 1,024 ug/mL 이상의 MIC 값이 나타났다고 보고한 바 있다.

Trimethoprim에 대한 내성유전자가 포함되어 있는 pVPBW1은 동종이나 이종의 다른 균주로부터 전달되어 *V. parahaemolyticus* 050919이 trimethoprim에 대한 내성을 획득한 것으

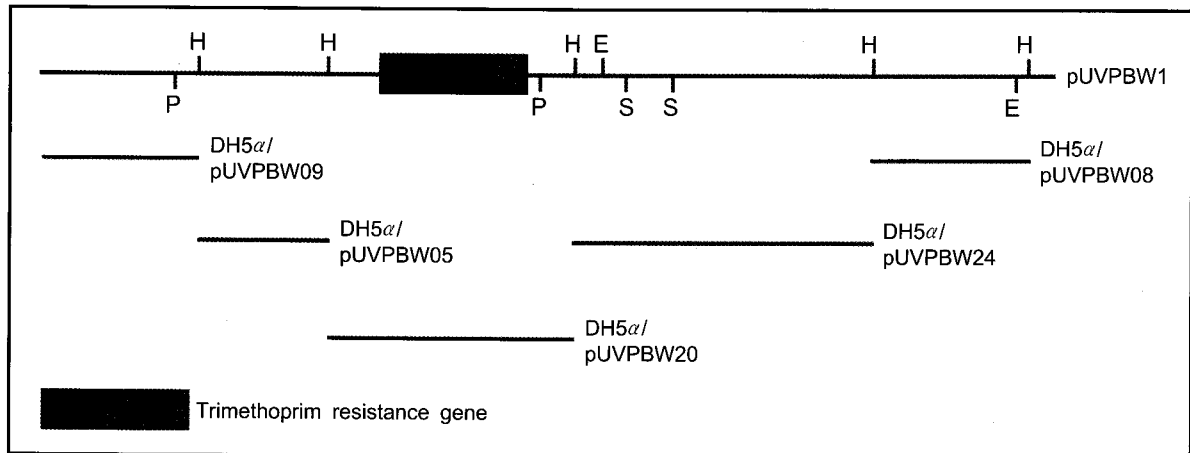


Fig. 3. Restriction map of the cloned fragments and location of trimethoprim resistance gene in pVPBW1. H, *Hind*III; E, *Eco*RI; S, *Sal*I; P, *Pst*I.

로 추정된다. 따라서 *V. parahaemolyticus* 균주가 어류양식 환경에서 지속적으로 항생제에 노출되거나, 사람, 가축 등의 분변과 같은 오염물질과 함께 육상에서 유입되는 항생제내성균들과의 접촉을 통하여 내성인자를 전달 받는 경우 다양한 항생제에 대한 내성을 획득할 가능성이 높을 것으로 생각된다. 해양상재세균이면서 식중독을 유발하는 *V. parahaemolyticus*와 같은 세균이 다양한 항생제에 대한 내성을 가지게 되는 경우, 인체에 감염되었을 때 치료용 항생제의 선택 폭이 좁아지게 되며 인체의 장관을 통과하면서 장내세균 등에 그 내성인자를 전달할 가능성이 높을 것으로 추정되어, 어업 생산성을 고려한 신중한 항생제의 사용과 육상유래 오염물질의 적극적인 유입차단이 이루어 질 수 있도록 국가차원의 체계적인 항생제 사용관리 및 내성균 관리 시스템의 정착이 절실하다고 사료된다.

## 사 사

이 연구는 식품의약품안전청 수산용 항생제 관리시스템 구축(06042항내모120) 사업에 의해 수행한 결과로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Bell, G.R., G.S. Traveler and C. Dworschak. 1988. Development in vitro and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Dis. Aquat. Org.*, 4, 19-25
- Bimboim, I.C. and J.A. Doly. 1979. rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Reser.*, 7, 1513-1523.
- Burdeska, A. 1990. Trimethoprim-resistance in staphylococci: genetic and biochemical characterisation of plasmid-encoded trimethoprim-resistant dihydrofolate reductases. Ph.D. Thesis. University of Basel, Switzerland.
- Charpentier, E., G. Gerbaud, C. Jacquet, J. Rocourt and P. Courvalin. 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J. Infect. Dif.*, 172, 277-281
- Dalsgaard, A., A. Forslund, A. Petersen, D.J. Brown, F. Dias, S. Monteiro, K. Molbak, P. Aaby, A. Rodrigues and A. Sandstrom. 2000. Class 1 integronborne, multiple-antibiotic resistance encoded by a 150-Kilobase conjugative plasmid in epidemic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Guinea-bissau. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3774-3779.
- Deepanjali, A., H.S. Kumar, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2005. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3275-3580.
- Elliot, E.L., C.A. Kaysner and M.L. Tamplin. 1982. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 7th ed. AOAC international, Arlington, 111-140.
- Glenn Rhodes, Geert Huys, Jean Swings, Patrick Mcgann, Maura Hiney, Peter Smith and Roger W. Pickup. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Appl. Environ. Microbiol.*, Sept., 3883-3890.
- Goldstein, F.W. and J. Acar. 1991. Testing *Staphylococcus aureus* for resistance to beta-lactams. *J. Antimicrob. chemother.*, 26, 269-278
- Ham, H.J., Y.H. JIn and Y.T. Jung. 2002. Distribution

- of *Vibrio haemolyticus* in fishery product, sold at Garak Wholesale Market and serological characteristics of isolated strains. *J. Fd. Hyg. Saety*, 17, 152-156.
- Heo, J.H., M.H. Hung, M.H. Cho, G.H. Kim, K.C. Lee, J.H. Kim and T.S. Jung. 2002. The study on fish disease with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyeognam. *J. Vet. Clin.*, 19, 19-22.
- Huovinen, P. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Clin. Infect. Dis.*, 32, 1608-1614.
- Janda, J.M., C. Powers, R.G. Bryant and S.L. Abbot. 1988. Current perspectives on the pidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clinical microbiology Reviews*, 1, 245-267.
- Jeong, H.D. and S.K. Chun. 2002. The utilization of antibiotics and the treatment of bacterial diseases in fish. *J. Fish. Pathol.*, 5, 37-48.
- Kehrenberg, C. and S. Schwarz. 2005. *dfrA20*, A novel trimethoprim resistance gene from *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 49, 414-417.
- Li, J., J. Yie, W. Fu, R.W. Foo, Y. Hu, N.Y. Woo and H. Xu. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured *Sparus sarba*. *Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.*, 39, 461-468.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. In: Cold Spring Habor Laboratory, 250-251
- Navia, M.M., J. Ruiz and J. Vila. 2004. Molecular characterization of the integrons in *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 48, 175-179.
- Oliver, J.D. 1989. *Vivrio vulnificus*. In: Foodborne Bacterial Pathogen. Doyle, M.P., ed., Marcel Dekker, inc., New York, 569-600.
- Petersen, A., J.S. Andersen, T. Kaewmak, T. Somsiri and A. Dalsgaard. 2002. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6036-6042.
- Roque, A., A. Molina-Aja, C. Bolan-Mejia and B. Gomez-Gil. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of *Vibrios* isolated from penaeid shtomps in North-western Mexico. *Int. Antimicrob. Agents.*, 17, 383-387.
- Smith, P., J. Donlon, R. Coyne and D.J. Cazabon. 1994. Fate of oxytetracycline in a fresh water fish farm: influence of effluent treatment systems. *Aquaculture*, 120, 319-325.
- Son, K.T., E.G. OH, T.S. Lee, H.J. Lee, P.H. Kim and J.H. Kim. 2005. Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginoliticus* from Fish Farms on the Southern Coast of Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 38, 365-371.
- Thungapathra, M., K. Amita, K. Sinha, S.R. Chaudhuri, P. Garg, T. Ramamurthy, G.B. Nair and A. Ghosh. 2002. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac* (6')-I b, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 46, 2948-2955.
- Waldor, M.K., H. Tschape and J.J. Mekalanos. 1996. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.*, 178, 4157-4165.
- Warren, J.W., E. Abrutyn, J.R. Hebel, J.R. Johnson, A.J. Schaeffer and W.E. Stamm. 1999. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute-bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clin. Infect. Dis.*, 29, 745-758.

---

2008년 8월 25일 접수

2008년 10월 13일 수리