

충청남도 해안지역의 비브리오 패혈증균 분포 및 분리주의 특성 분석

이현아 , 고영은 , 최지혜 , 이다연 , 여성순 , 박종진 , 이미영 , 최진하 , 박준혁* 

충청남도보건환경연구원

Distribution and Characterization of *Vibrio vulnificus* Isolated in Coastal Areas of Chungcheongnam-do Province

Hyunah Lee, Young-Eun Ko, Jihye Choi, Dayeon Lee, Seungsoon Yeo, Jongjin Park, Miyoung Lee, Jinha Choi, and Junhyuk Park*

Chungcheongnam-do Institute of Health and Environment Research

ABSTRACT

Background: *Vibrio vulnificus* has been frequently detected in seawater, fish, and shellfish mainly in the coastal areas of Chungcheongnam-do Province.

Objectives: This study was conducted to investigate the analyzed biochemical properties, genetic characteristics, and distribution of *Vibrio vulnificus* isolated from environmental sources in coastal areas of Chungcheongnam-do Province from 2019 to 2020.

Methods: A total of 1,510 samples were obtained from six different sites in Chungcheongnam-do Province. Isolated strains from the samples were identified by a VITEK 2 system and MALDI-TOF. Antibiotic susceptibility testing for 85 isolates was done by microdilution minimum inhibitory concentration methods, and 11 isolates were analyzed for 16s rRNA sequences in multiple alignments.

Results: Among the 1,510 samples taken during the investigation period, 306 strains were isolated and the detection rate of *V. vulnificus* was 20.3%. One hundred eighty-eight strains (24.6%) from seawater and 118 strains (15.8%) from mud flats were isolated. It was mainly detected in July (17.3%), August (36.5%), and September (28.8%), and the proportion was 82.0%. Based on the CLSI-recommended breakpoints, *V. vulnificus* isolates were all susceptible to amoxicillin/clavulanic acid, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole. However, nonsusceptible isolates to ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cefoxitin, imipenem, tetracycline and chloramphenicol were identified. In the analysis of the nucleotide sequences for 16s rRNA of *V. vulnificus* isolates, it was confirmed that mutations frequently occurred between nucleotide number 922 and 952, and 98.2% to 100% nucleotide identities between isolates was verified.

Conclusions: The results of this study can be used as a basic data for infection control and prevention of *Vibrio vulnificus* infection by describing the distribution and characteristics of *Vibrio vulnificus* strains isolated in coastal areas of Chungcheongnam-do Province.

Key words: 16s rRNA sequence, antibiotic susceptibility, Chungcheongnam-do coastal areas, *Vibrio vulnificus*

Received September 16, 2021

Revised October 18, 2021

Accepted October 19, 2021

Highlights:

- *Vibrio vulnificus* can cause a serious and fatal infection that is the leading cause of death.
- *Vibrio vulnificus* was isolated and detected from seawater and mud flats mainly in summer season.
- The isolates showed high susceptibility to antimicrobial agent including β -lactam and aminoglycoside antibiotics.
- This study is meaningful in providing basic data for the management and prevention of *Vibrio vulnificus* infection.

*Corresponding author:

Chungcheongnam-do Institute of Health and Environment Research, 8, Hongyegongwon-ro, Hongbuk-eup, Hongseong 32254, Republic of Korea
Tel: +82-41-635-6911
Fax: +82-41-635-7942
E-mail: junhyuk@korea.kr

I. 서론

최근 지구 온난화 등 기후 변화에 따라 해수 온도가 상승하여 비브리오균에 대한 주의가 요구되고 있다. 특히 해안지역을 중심으로 해수와 어패류 등에서 자주 검출되며, 어패류를 생식으로 즐기는 우리나라는 더욱 문제가 되고 있다. 병원성을 나타내는 대표적인 비브리오균은 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* 그리고 *Vibrio vulnificus*이다. *V. parahaemolyticus*는 제4급 감염병으로 표본검사가 필요한 장관감염증이고, *V. cholerae*의 경우, 제2급 감염병으로 발생 또는 유행 시 24시간 이내 신고 및 격리해야 하며, *V. vulnificus*는 제3급 감염병으로 발생 또는 유행 시 24시간 이내에 신고해야 한다. 이 세 가지 모두 법정 감염병으로서 국가에서 관리하고 있다.¹⁾

비브리오균은 *Vibrionaceae*과, *Vibrio* 속으로 분류되고 알려진 77종 중 12종이 사람에게 병원성을 보이며 임상에서 분리되고 있다. 이 중 병원성이 상대적으로 높은 *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139, *V. vulnificus*가 중요하게 여겨진다.²⁾ 패혈증의 원인인 *V. vulnificus*는 해양환경 어디서나 존재하여 상처 있는 사람이 오염된 해수에 노출되었을 때 감염될 수 있고, 덜 익은 어패류나 비가열 채소류 등의 음식과도 연관되어 있다.²⁻⁵⁾ 국내에서는 해마다 약 50여명이 *V. vulnificus*에 감염되어 증상이 발현되며, 여름철에 간 질환자나 알콜중독자와 같은 고위험군 환자들에게 주로 발생한다. 일반적으로 상처 감염증, 패혈증 등이 유발되며 오한, 발열, 설사, 복통, 하지 통증 등의 다양한 증상을 일으키며 심할 경우 사망할 수 있다.⁶⁾ 비브리오 패혈증은 다른 식중독과 비교하여 발생 건수가 많지 않지만 발생 시 치명률이 높아 감염예방 및 감염 관리를 위한 지속적인 모니터링이 필요하다.

연중 비브리오 패혈증 감염 첫 환자는 일반적으로 5월경에 처음 발생하는데, 2020년에는 1월에도 환자가 발생했으며 겨

울철에도 *V. vulnificus*가 꾸준히 분리되어 계절과 상관없는 비브리오 감염예방이 필요하다.⁷⁾ 비브리오 패혈증은 진행 속도가 매우 빨라 관련 항생제로 적용함에도 전신증상 후 평균 4.2일이면 사망률이 62~79%에 이르는 치명적 질환이다.⁸⁾ *V. vulnificus* 감염증의 치료에서 신속한 항생제 투여가 환자의 생존과 예후에 매우 중요하다.⁶⁾ 현재 *V. vulnificus*를 포함하는 일반적인 *Vibrio* 속의 세균은 대부분의 항생제에 감수성이 있지만, 어류 양식 생산에서 감염을 통제하기 위한 항생제의 오용으로 인해 다제 내성균의 출현 가능성이 높아짐에 따라 항생제 내성 관련 연구가 필요하다.⁹⁾

충청남도는 15개 시군 중 6개가 지리적으로 해안에 위치하여 타지역에 비해 비브리오균에 노출될 수 있는 기회가 많아 병원성 *V. vulnificus*에 대한 상시 감시와 지속적인 연구가 요구된다. 본 연구에서는 2019년부터 2020년까지 충청남도 해안 12개 지점을 선정하여 4월~11월 사이 매주 1회씩 해수와 갯벌을 채취하여, 분리된 *V. vulnificus*의 항생제 내성과 유전학적 특성을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 검체 채취

검체 채취는 2019년부터 2020년까지 2년 동안 해수 온도가 올라가는 4월부터 11월까지 8개월간 매주 1회씩 실시하였다. 채취장소는 해안을 포함하고 있는 충청남도 시군 중 보령, 서산, 당진, 서천, 홍성, 태안지역을 대상으로 각기 다른 2곳 총 12지점을 선정하였다(Fig. 1, Table 1). 해수는 내륙에 인접한 위치의 수심 1 m 이내 표층에서 1 L를 채취하였고, 갯벌은 외부 오염을 방지한 상태로 약 50 g을 무균병에 채취하였다.

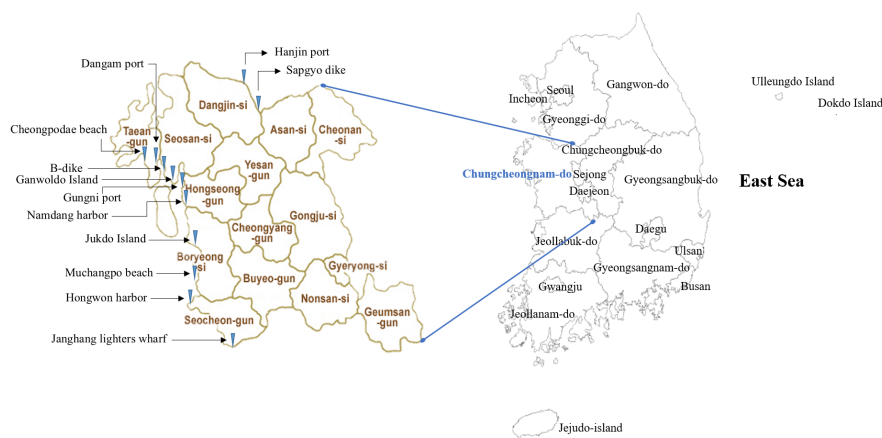


Fig. 1. Sampling sites for the monitoring of *Vibrio vulnificus* in Chungcheongnam-do coastal area

Table 1. Sampling sites for the isolation of *Vibrio vulnificus* in Chungcheongnam-do coastal area

District	Site-1	Site-2
Boryeong	Muchangpo beach, Ungcheon-eup	Jukdo Island, Nampo-myeon
Seosan	Ganwoldo Island, Buseok-myeon	B-dike, Buseok-myeon
Dangjin	Sapgyo dike, Sinpyeong-myeon	Hanjin port, Songak-eup
Seocheon	Janghang lighters wharf, Janghang-eup	Hongwon harbor, Seo-myeon
Hongseong	Namdang harbor, Seobu-myeon	Gungni port, Seobu-myeon
Taeon	Cheongpodae beach, Nam-myeon	Dangam port, Nam-myeon

2. *V. vulnificus*의 분리 동정

2.1. 증균배양

해수를 0.45 μ M nitrocellulose 여과지(Whatman, Japan)를 사용하여 여과하고, 여과된 여과지를 20 mL의 2% NaCl이 포함된 Alkaline Peptone Water (APW, OXOID, UK)에 넣어 37°C에서 24시간 배양하고, 갯벌은 5 g 정도를 취해 9배 양의 2% NaCl 포함된 APW (OXOID, UK)에 넣어 해수와 동일한 방법으로 배양하였다.¹⁰⁾

2.2. 분리배양

2%의 NaCl이 포함된 APW (OXOID, UK)에서 증균된 배양액을 CHROMagar™ *Vibrio* (CHROMagar, France) 배지에 옮겨 3단 도말하여 37°C에서 24시간 1차 배양을 하고, 의심되는 단일집락을 선택하여 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-ToF, Bruker, Germany)로 분석하여 MBT Compass RUO Library version 9.0과 비교하여 선택 감별하여 배양하였다. 선택배지에서 확인된 특이 순수 집락을 기본 영양배지인 Tryptic Soy Agar (TSA, Becton Dickinson, USA)에 2% NaCl을 첨가한 배지에 계대배양 한 후 확인 검사를 실시하였다.¹⁰⁾

2.3. 확인시험

활성화된 균주를 GNI card에 0.5 McFarland로 희석하여 분주한 뒤 VITEK 2 system (bioMérieux Vitek, France)에서 신뢰도 90% 이상일 경우에 최종 균주로 판정하였다. 추가적으로 Real-time PCR을 실시하여 유전자 특성을 확인하고자 DNA 추출을 위해 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 μ L에 현탁 한 후 10분간 끓여 8,000 RPM으로 1분간 원심분리 후, 상층액을 주형으로 사용하였다. PowerCheck™ *Vibrio* Multiplex Real-time PCR Kit (Kogene biotech, Korea)에 추출 DNA 5 μ L를 첨가하여 ABI 7500 Fast real-time PCR (Thermo Fisher Scientific, USA)에 장착하고 95°C에서 10분 초기반응 후, 95°C 15초와 55°C 30초를 40회 반복하여 *V. vulnificus*에 대한 유전자 증폭을 확인하였다. 증폭된 유전자가 지수 로그그래프로

표시되고, 35 threshold cycle 이하 일 때, 양성으로 판단하였다.

3. 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 VITEK 2 (bioMérieux Vitek, France)의 AST-N169 패널을 사용하여 액체배지 미량희석법으로 시행하였으며, 각 항생제의 감수성 및 내성결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 기준에 따라 결과를 판정하였다.¹¹⁾ *V. vulnificus*로 동정된 균주를 영양배지에 24시간 배양한 후 0.45% NaCl 3 mL에 부유시켜 최종 탁도를 0.6 McFarland barium sulfate turbidity standard에 맞추고 진탕한 후, 현탁액 145 μ L를 패널에 로딩하여 분석하였다. 대상 항생제는 ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cefotetan, cefoxitin, ceftriaxone, imipenem, amikacin, gentamycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole의 15종을 사용하였다.

4. 염기서열 분석 및 계통분석

채취 지점에 따라 대표적인 *V. vulnificus* 11 분리 균주를 대상으로 16s rRNA의 conventional PCR을 실시한 후 염기서열을 결정하여 계통분석을 실시하였다. 추출된 DNA를 Access RT-PCR system (Promega, USA)에 5 μ L씩 각 키트에 추가하고, 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 1492R (5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3') 프라이머를 포함시켜 Proflex-PCR system (Thermo-Fisher, USA)에서 96°C 3분 초기 변성 후 96°C 20초, 58°C 20초, 72°C 3분 조건으로 35회 반복 후 72°C 7분간 추가 반응하였다. QIAxcel (QIAGEN, Germany)을 이용하여 전기영동한 후 PCR에 의해 증폭된 1,465 bp의 밴드를 확인하였다. 염기서열 결정은 Bioneer (Korea)에 의뢰하여 분석하였고, 분석된 각 염기서열은 Editseq (DNASTAR, USA)에서 편집하였다. 이들은 보고되어 있는 국외 참조주들을 포함하여 Clustal-X (European Molecular Biology Laboratory, Germany)를 이용하여 다중정렬을 수행한 후, 정렬된 자료는 Megalign (DNASTAR, USA)을 이용하여 계통분석을 실시하였다.^{12,13)}

5. 자료 통계분석

월별, 지역별 등 비브리오 검출 통계 분석은 R Studio 3.5.1 for Windows를 사용하여 카이제곱 검정을 통해 p 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결과 및 고찰

2019년부터 2020년까지 충남지역에서 채취된 해수와 갯벌 검체 중 *V. vulnificus* 균의 분포를 조사한 결과, 총 1,510건 중 306건 분리되어 전체적으로 20.3%의 분리율을 보였다. 검체 별로는 해수에서 188주(24.6%), 갯벌에서 118주(15.8%)가 분리되었다(Table 2). 연도별로는 2019년은 130주(18.1%)가 검출되었고 2020년도는 176주(22.2%)로 분리율이 약 4.1% 정도 높아진 것으로 확인되었다(Table 2). 해수의 경우 2019년에 23.8%에서 2020년 25.3%의 분리율을 보여 약 1.5%가 증가되었고, 갯벌의 경우 2019년 12.0%에서 2020년 19.2%로 분리율이 약 7.2% 증가되었다. *V. vulnificus*균은 채취장소에 따라 해수와 갯벌의 분리율에 차이가 있으나 일관된 양상을 보이지

않았다. 2019년에 비해 2020년에 *V. vulnificus*의 검출이 현저하게 증가한 것은 충청남도 지역 평균 강수량이 2019년 913.2 mL에서 2020년 1,573 mL로 증가하였고, 이런 영향이 해수의 염도와 *V. vulnificus*의 생육에 영향을 주었을 것으로 추정된다. *V. vulnificus*의 생육은 온도, 염도, 탁도 그리고 pH 등 다양한 외부환경에 영향을 받는다고 보고되어 있다.^{2,14-16)} 또한 2020년에 충청남도 보건환경연구원에 도입된 MALDI-ToF (Bruker, Germany)의 활용으로 보다 많은 후보 균주를 스크리닝함으로써 결과적으로 많은 *V. vulnificus* 분리를 유도했을 가능성도 있다.

검체채취 장소 중 분리율이 가장 높은 곳은 서천군 장항읍 물양장이며, 122건 검사에 55건 검출되어 분리율이 45.1% 이었고, 가장 낮은 분리율을 보인 장소는 보령시 죽도로 128건 검사에 10건 검출되어 7.81%의 분리율을 보여 유의미한 차이를 보였다($\chi^2=41.55$, $p<0.001$) (Table 3). 나머지는 11.81~20.83%의 분리율을 나타내고 있었다. 그러나 이런 결과들은 검체 채취 장소의 지엽적인 특성에 따라 분리율의 차이가 나타날 수 있으므로 이를 일반화하여 특정 시군에서 *V. vulnificus*의 검출이 높다고 판단하는 것은 무리가 있을 것으로 생

Table 2. Distribution of *Vibrio vulnificus* according to sample types from 2019 to 2020

Sample type	2019		2020		Total	
	No. of sample	No. of isolation (%)	No. of sample	No. of isolation (%)	No. of sample	No. of isolation (%)
Sea water	369	88 (23.8)	396	100 (25.3)	765	188 (24.6)
Mud flat	351	42 (12.0)	395	76 (19.2)	746	118 (15.8)
Total	720	130 (18.1)	791	176 (22.2)	1,511	306 (20.3)

Table 3. Distribution of *Vibrio vulnificus* according to sampling sites

Sampling sites	2019		2020		Total		
	No. of sample	No. of isolation (%)	No. of sample	No. of isolation (%)	No. of sample	No. of isolation (%)	
Boryeong	Muchangpo beach	59	15 (25.4)	66	8 (12.1)	125	23 (18.4)
	Jukdo Island	62	3 (4.8)	66	7 (10.6)	128	10 (7.8)
Seosan	Ganwoldo Island	61	8 (13.1)	66	15 (22.7)	127	23 (18.1)
	B-dike	62	8 (12.9)	66	16 (24.2)	128	24 (18.8)
Dangjin	Sapgyo dike	60	26 (43.3)	66	24 (36.4)	126	50 (39.7)
	Hanjin port	55	12 (21.8)	65	13 (20.0)	120	25 (20.8)
Seocheon	Janghang lighters wharf	56	34 (60.7)	66	21 (31.8)	122	55 (45.1)
	Hongwon harbor	61	1 (1.6)	66	14 (21.2)	127	15 (11.8)
Hongseong	Namdang harbor	61	5 (8.2)	66	12 (18.2)	127	17 (13.4)
	Gungni port	62	5 (8.1)	66	13 (19.7)	128	18 (14.1)
Taeon	Cheongpodae beach	62	6 (9.7)	66	16 (24.2)	128	22 (17.2)
	Dangam port	59	7 (11.9)	66	17 (25.8)	125	24 (19.2)
Total		720	130 (18.1)	791	176 (22.3)	1,511	306 (20.3)

각된다. 그럼에도 불구하고 갯벌이 발달한 서해안은 우리나라 어패류의 중요 공급지이고, 국민소득이 증가함에 따라 해산물의 소비가 급증함에 따라 수산물의 안전한 관리가 무엇보다도 중요하다. 또한 비브리오 패혈증은 해수 및 갯벌의 노출로 인한 피부창상으로도 감염되므로, 관광지가 밀집되어 있는 해안가나 갯벌체험장 등 계절에 상관없는 상시 모니터링 체계 확립으로 예방 및 홍보가 필요한 상황이다.

*V. vulnificus*의 월별 분포를 보면 7월에서 10월 사이에 주로 검출되었는데, 8월에 정점을 보였다(Fig. 2). 2019년은 전체 검출의 31.2%, 2020년은 전체 검출의 40.5%가 8월에 집중되었다. 2년 전체를 보았을 때, 7월이 17.3%, 8월이 36.5%, 9월이 28.2%로 3개월 동안 차지하는 비중이 전체의 82.0%로 해수 온도가 높을수록 균의 활성도가 증가하기 때문으로 생각된다.

V. vulnificus 분리주 중 재배양 된 85주를 선택하여 β -lactam 계열과 aminoglycoside 계열 등의 항생제에 대한 감수성 시험

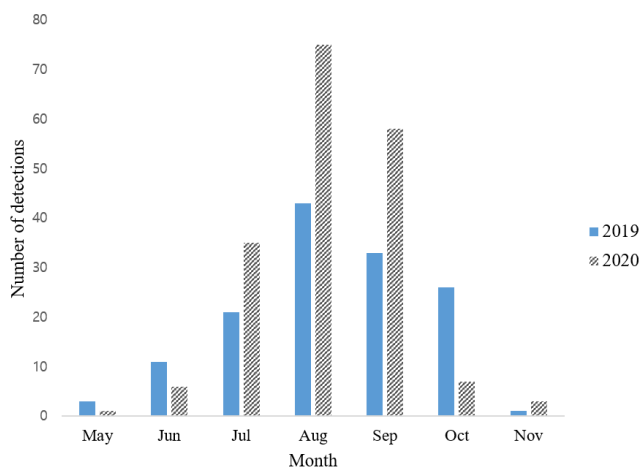


Fig. 2. Number of detections of *Vibrio vulnificus* per month

을 하였다. CLSI 판정 기준에 따르면 모든 균주가 amoxicillin/clavulanic acid, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole에 대해 감수성을 보였으나 ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftazidime, cefoxitin, imipenem, tetracycline, chloramphenicol에 대해서는 내성인 균주가 발견되었다(Table 4). Ampicillin에 대하여 분리된 85주 중 3주가 내성을, 3주가 중간내성을 보였다. 가장 많은 균주가 내성을 보인 항생제는 cefoxitin, ceftazidime, ampicillin 순으로 각각 균주의 85.5%, 6.0%, 3.5%가 내성이었다. 미국, 중국 그리고 이탈리아 등에서 분리된 균주의 ampicillin 내성에 대한 보고가 다수 존재하고, ceftazidime 내성균주도 중국에서 보고되어 있다.^{9,17)} 최근 미국에서 발표된 자료에서 약 5% 정도의 내성을 보인다고 보고되어 있다.¹⁷⁾ 본 연구에서는 cefoxitin에서 상대적으로 높은 내성을 보이는 것이 특징이었다. 이는 2014년에서 2015년 전남 지역 해수 및 갯벌에서 분리된 *V. vulnificus* 균주에 대한 항생제 내성 실험결과와 cefoxitin에 85.7% 내성을 나타내었다는 보고와 유사한 결과이다.¹⁸⁾ 두 가지 이상의 항생제에 내성을 보인 다제내성 균주는 4 균주(4.7%)이었고, 세부적으로는 ampicillin과 cefoxitin의 내성 3균주, cefoxitin과 ceftazidime의 내성이 1균주 이었다(data not shown). *V. vulnificus*에 효과적인 항생제는 3세대 cephalosporin (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), β -lactam combination (piperacillin-tazobactam), carbapenems (imipenem), tetracycline (minocycline, doxycycline), aminoglycoside (gentamicin, amikacin), fluoroquinolone (ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin)과 trimethoprim-sulfamethoxazole 과 chloramphenicol 등이 있다.^{6,9)} 3세대 cephalosporin과 tetracycline의 병합요법이 사망률을 감소시키고, cefotaxime과 ciprofloxacin의 병합요법이 생체의 감수성 검사에서 상승효과를 보인다.^{19,20)} 본 연구의 환경 분리균주에서 Aminoglycosides 계

Table 4. Antimicrobial susceptibility of isolated *Vibrio vulnificus* strains

Antimicrobial agent class	Antimicrobial agents	No. (%) of isolates with the following results		
		Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillin	Ampicillin	79 (92.9)	3 (3.5)	3 (3.5)
	β -lactam combination	Amoxicillin/clavulanic acid	85 (100)	0 (0.0)
Cephems	Ampicillin/sulbactam	84 (98.8)	1 (1.2)	0 (0.0)
	Cefazolin	68 (81.9)	10 (12.1)	5 (6.0)
Carbapenem	Cefoxitin	7 (8.4)	5 (6.0)	71 (85.5)
	Imipenem	84 (98.8)	1 (1.2)	0 (0.0)
Aminoglycoside	Amikacin	85 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Gentamicin	85 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
Quinolone	Ciprofloxacin	85 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
Tetracycline	Tetracycline	84 (98.8)	0 (0.0)	1 (1.2)
Phenicol	Chloramphenicol	83 (97.7)	1 (1.2)	1 (1.2)
Folate pathway antagonist	Trimethoprim/sulfamethoxazole	85 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)

열 항생제와 Tetracycline (98.82%) 등에서 높은 감수성을 보였고, *V. vulnificus* 감염증에 대한 권장 사용되는 항생제의 유효성을 확인하였다. 항생제 사용의 증가는 수생환경 중에 있는 세균의 내성에 영향을 주고 있으며, 이로 인해 인체에도 영향을 미칠 수 있다는 우려가 제기되고 있어, 환자들의 임상 역학 자료 조사 및 항생제 내성 획득에 기여하는 위험요인에 대한 규명 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

분리된 *V. vulnificus* 11 균주의 16s rRNA에 대한 1,465 bp의 염기서열을 결정하였다. 분석된 염기서열 중 922번부터 952번 사이에서 돌연변이가 다중으로 발생하고 있는 것으로 확인하였고, 나머지 부분은 산발적으로 돌연변이가 발생하였다 (Fig. 3). 결정된 염기서열 정보와 보고되어 있는 외국의 *V. vulnificus* 균 3개 주를 포함하여 다중정렬 후 계통분석을 실시한 결과, NBRC 103026 참조주와 당암포구 분리주 등 6개 균주와 염기서열이 동일한 것으로 확인되었고, 특별하게 남당항에서 분리된 분리균주는 다른 분리주에 달리 다른 클러스터에 포함되어 있었다(Fig. 3). 클러스터-A는 내부적으로 99.7~100%의 상동성을 보였고, 클러스터-A와 B 사이에는 98.2~99.2%의

상동성을 나타내었다(Fig. 4).

IV. 결 론

2019년부터 2020년까지 충청남도 지역 해수와 갯벌 검체 총 1,510건 채취하여 분리된 306건의 *V. vulnificus* 균주에 대하여 분포 조사 및 항생제 감수성 시험과 16s rRNA 염기서열을 분석하였다. 조사기간 중 *V. vulnificus*의 분리율은 20.3%이었고, 해수 188주(24.6%)와 갯벌 118주(15.8%)가 분리되었다. *V. vulnificus*의 2019년 첫 분리는 5월 13일 당진 삼교방조제, 2020년은 5월 27일 서천 물양장이었으며, 이때의 수온은 각각 19.7°C, 21.1°C였다. 2년 동안 가장 높은 분리율을 보인 곳은 서천군 물양장이었고, 122건 검사에 55회 검출되어 45.1%이었다. 시기에 따라 7월 17.3%, 8월 36.5%, 9월 28.8%에 주로 이루어졌고, 그 비중은 82.0%이었다.

V. vulnificus 85주에 대한 항생제 감수성 시험에서 amoxicillin/clavulanic acid, amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole에 대해서는 모든 균주가 감

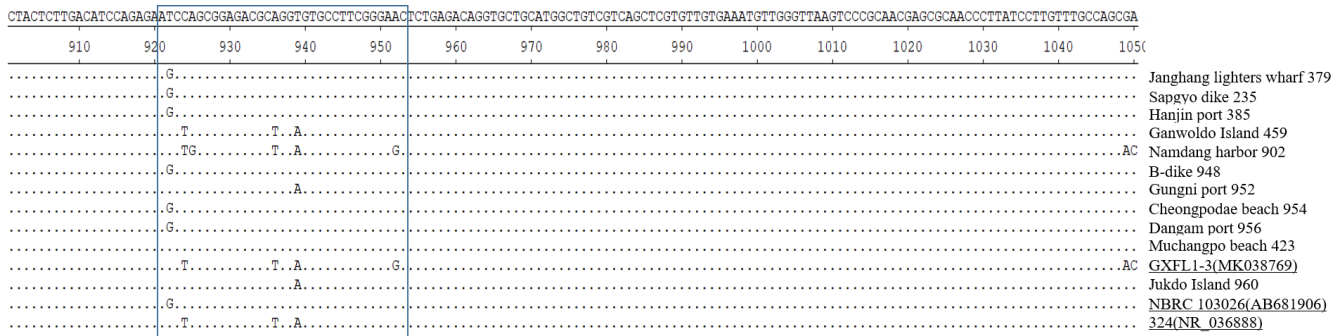


Fig. 3. Multiple alignment of nucleotide sequences with reference strains and *Vibrio vulnificus* isolates in this study. The mutation region is shown in the blue box. Name of reference strains was underlined.

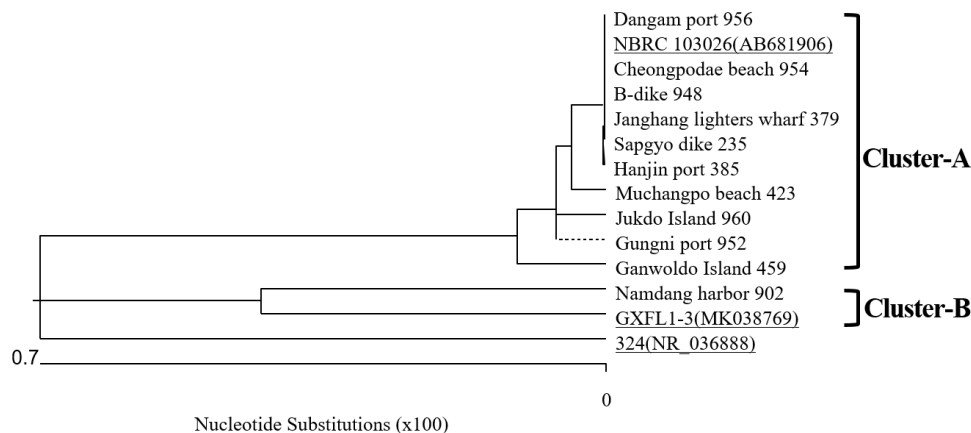


Fig. 4. Phylogenetic analysis of reference strains and *Vibrio vulnificus* isolates in this study. Name of reference strains were underlined.

수성을 보였으며, ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cefoxitin, imipenem, tetracycline, chloramphenicol에 대해서는 비감수성인 균주가 발견되었다. 가장 많은 균주가 내성을 보인 항생제는 cefoxitin (85.5%)였고, cefazolin (6.0%), ampicillin (3.5%) 순이었다. 두 가지 이상의 항생제에 내성을 보인 다제 내성 균주는 4균주(4.7%)이었다. 분리된 *V. vulnificus* 균주의 16s rRNA에 대한 1,465 bp의 염기서열을 분석한 결과 922번 부터 952번 사이에서 돌연변이가 빈번하게 발생하는 것을 확인하였고, 분리주들 사이에는 98.2~100%의 상동성을 나타내며 두 개의 클러스터로 구분되었다.

본 연구 결과는 충청남도 해안지역의 *V. vulnificus*의 분포와 분리주의 특성을 기술함으로써 비브리오 패혈증의 감염 관리 및 예방을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 보건환경 연구 및 시책추진 지원의 유전자 분석 비용을 활용하였고, 2021년 충남도청 지식동아리 「4차 보건 혁명」 회원들이 “도정 발전 및 정책 아이디어 발굴에 기여할 수 있는 과제”의 일환으로 수행되었습니다.

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Kim YH, Kwon D, Lee DH. Reorganization of national notifiable infectious diseases classification system. *Public Health Wkly Rep.* 2020; 13(1): 2-7.
- Hwang KW, Gong YW, Oh BY, Lee JM, Go JM, Kim YH. Distribution and characteristic of growth of *Vibrio* spp. in Incheon coastal area. *J Environ Sanit Eng.* 2008; 23(3): 31-38.
- Jeong YI, Myung GE, Choi EJ, Soh SM, Park GJ, Son TJ. Distribution of pathogenic vibrios in the aquatic environment adjacent to coastal areas of South Korea and analysis of the environmental factors affecting their occurrence. *J Environ Health Sci.* 2018; 44(2): 133-142.
- Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, Heublein PC. Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *N Engl J Med.* 1979; 300(1): 1-5.
- Shapiro RL, Altekruze S, Hutwagner L, Bishop R, Hammond R, Wilson S, et al. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. *Vibrio Working Group. J Infect Dis.* 1998; 178(3): 752-759.
- Kim DM, Hong SJ. *Vibrio vulnificus* sepsis. *Korean J Med.* 2012; 82(6): 671-679.

- Ministry of Food and Drug Safety. Prediction System of *Vibrio Vulnificus*. Available: <http://vibrio.foodsafetykorea.go.kr/main> [accessed 15 March 2021].
- Yang SJ, Shin JH, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, et al. Identification of *Vibrio vulnificus* by the Microscan and the Vitek II systems. *Korean J Lab Med.* 2005; 25(1): 33-38.
- Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. *Food Microbiol.* 2016; 57: 128-134.
- Lee JM, Lee WJ, Kim MJ, Cho YS, Lee JS, Lee HJ, et al. Comparative evaluation of the VITEK 2 system and species-specific PCR methods for the detection of *Vibrio* species isolated from shrimp. *J Food Hyg Saf.* 2015; 30(3): 281-288.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed. Wayne: CLSI supplement M100; 2020.
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(9): 5107-5115.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(4): 406-425.
- Song JW, Jeong IH, Park SH, Yun SJ, Hur ES, Kim YS. Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from the west coastal area of Gyeonggi-do. *Korean J Microbiol.* 2021; 57(3): 197-203.
- Randa MA, Polz MF, Lim E. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(9): 5469-5476.
- Inoue Y, Miyasaka J, Ono T, Ihn H. The growth of *Vibrio vulnificus* and the habitat of infected patients in Kumamoto. *Biosci Trends.* 2007; 1(3): 134-139.
- Shaw KS, Rosenberg Goldstein RE, He X, Jacobs JM, Crump BC, Sapkota AR. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* recovered from recreational and commercial areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. *PLoS One.* 2014; 9(2): e89616.
- Yoon YH, Park S, Kim JY, Lee YJ, Jeon DY, Choi GC, et al. Prevalence of toxin genes and profiles of antibiotic resistance in *Vibrio vulnificus* isolates from fish, fish tanks, and patients. *J Food Hyg Saf.* 2020; 35(1): 6-12.
- Jung YS, Jung SI, Kang SJ, Jun CH, Park KH, Shin JH, et al. Clinical manifestations and prognostic factors in *Vibrio vulnificus* septicemia. *Korean J Med.* 2008; 74(3): 288-295.
- Liu JW, Lee IK, Tang HJ, Ko WC, Lee HC, Liu YC, et al. Prognostic factors and antibiotics in *Vibrio vulnificus* septicemia. *Arch Intern Med.* 2006; 166(19): 2117-2123.

〈저자정보〉

이현아(연구사), 고영은(연구사), 최지혜(연구사), 이다연(연구사), 여성순(연구사), 박종진(팀장), 이미영(부장), 최진하(원장), 박준혁(연구사)