

면역.병원미생물 분야

인천지역에서 분리된 비브리오 패혈증균의 특성

오보영\*, 김정희, 공용우, 제갈승, 김혜영, 이미연, 황경화, 고연자, 이제만, 고종명,  
김용희

인천보건환경연구원 질병조사과

-running title; 비브리오 패혈증

\* To whom correspondence should be addressed.

인천시 중구 신흥2가 18-4번지 인천보건환경연구원 질병조사과

Tel: 032-440-5582 , Fax: 032-440-5589

E-mail: byoh2002@empal.com

2006년도 인천지역 해양환경에서 분리된 *V. vulnificus*에 대한 생화학적, 분자생물학적 특성 및 항생제 감수성 결과를 알아보았다. 본 실험에 사용된 균주는 총 233주로 해수, 갯벌, 어패류, 수족관수에서 분리되었다. API 20E kit 실험결과 15개 profile로 분류되었으며, 모든 균주가 ONPG와 Amygdalin 양성이었다. 209주를 대상으로 vvhA와 viuB 유전자 부위에 대해 PCR 실험결과 vvhA는 206주(98.6%) 양성, viuB는 110주(52.6%)가 양성이었으며, 특히 viuB 유전자 부위에 대한 PCR 결과는 해수, 어패류, 갯벌에서 분리한 균주의 48%, 48.5%, 61.1%가 양성인 것으로 나타났다. 시험균주 175주에 대해 항생제 감수성 실험 결과 Imipenem (100.0%), Sulfamethoxazole/trimethoprim (98.9%), Tetracycline, Ciprofloxacin (98.3%), Ampicillin/sulbactam (97.1%), Chloramphenicol (96.6%), Cefepime (94.9%), Ceftriaxone(94.8%)이 감수성을 나타내었고, 항생제 하나 또는 그 이상의 약제에 대해 내성을 나타낸 것은 56주(32%)로 해수28주(31.5%), 갯벌 21주(34.4%), 어패류 7주(29.2%)였다. *V. vulnificus* 233주에 대해 PFGE를 실시하여 dendrogram으로 분석한 결과 90%이상의 상동성 기준으로 126개의 유형으로 분리되었고, 58%이상의 상동성을 기준으로 13개의 유형으로 분류되었다. 유형 I는 104주(44.6%)로 가장 많은 균주들이 분포한 유형이었고 채취시기 대부분 유형 I에 가장 많은 균주들이 분포하였으나 10월과 6월에 채취한 검체는 유형 J에 16주(69.6%)와 13주(36.1%)로 가장 많은 균주들이 분포하였다. 7월에 채취한 검체에서 분리된 균주는 9개의 유형에 속하였고 8월은 8개 유형, 6월은 7개 유형, 9월은 6개 유형, 10월은 5개 유형, 3월은 1개 유형을 나타냈다.

**Key Words :** *V. vulnificus*, vvhA, viuB, antibiotic resistance, PFGE

비브리오패혈증의 원인균인 *Vibrio vulnificus*는 호염성균으로 하구나 연안의 바닷물, 해수, 갯벌, 각종 어패류 등에 서식하고 있다. *V. vulnificus*는 1976년 Hollis 등이 다른 *Vibrio* species와 구별되는 lactose positive *Vibrio*라고 명명하였으며, 1979년 Farmer는 이 균의 vibrio 속과의 유전적인 관계, 표현형의 유사성에 근거를 두고 “*V. vulnificus*”라고 명명하였다(3).

전 세계적으로 온대, 아열대, 열대 지방의 해수에서 균이 검출되고 있으며 환자 발생이 보고되고 있다. 우리나라에서는 모든 해안 지방과 섬의 해수나 어패류, 갯벌, 해양 생물에 널리 서식하고 있으며, 환자 발생율로 보면 갯벌이 많은 서해안과 남해안에 균의 밀도가 높은 것으로 보고되고 있다(4).

*V. vulnificus*에 의한 인체감염은 주로 2가지 임상형태로 발생하는데, 오염된 어패류를 생식하였을 때 발생하는 원발성 패혈증과 해수 또는 갯벌에 상처가 노출되었을 때 발생하는 창상감염이다. 국내에서의 감염은 주로 원발성 패혈증의 형태로서, 1979년 전남지방에서 처음보고 되었으며, 균 동정에 의한 확진 예는 1982년에 보고되었다. 비브리오패혈증은 국내의 B형 간염 바이러스에 의한 만성 간질환의 높은 유병률과 어패류를 생식하는 습관과 더불어 여름철에 발생하는 토착병으로 자리잡고 있다(6).

비브리오 패혈증은 병의 진행속도가 매우 빠르고 감수성 있는 항균제로 치료함에도 불구하고 전신증상이 나타난 후 평균 4.2일이면 사망률이 62-79%에 이르는 치명적 질환이므로 병의 초기에 진단하여 신속하게 치료해야 한다(6). *V. vulnificus*에 대해 감수성이 높은 항생제는 quinolone계 항균제, tetracycline, chloramphenicol이고, ampicillin과 3세대 cephalosporin계 항생제인 moxalactam, cefoperazone, cefomandole은 감수성이 낮은 항생제로 보고되고 있다(4).

*V. vulnificus*에 의한 원발성 패혈증은 발병 2일안에 사망률이 가장 높기 때문에 신속한 진단이 매우 중요하므로 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하여 cytotoxin-hemolysin 유전자를 확인해야한다(15). 이와 같이 확인된 유전자와 생화학적 시험으로 동정된 *V. vulnificus*균주를 대상으로 역학조사 목적으로 random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis(20), amplified fragment length polymorphism(10), pulsed field gel electrophoresis(PFGE, 14) 등이 이용되고 있다.

90%의 대다수의 환경균주는 실험실내 조건에서 독성 인자를 생산하며 *V. cholerae*나 *V. parahaemolyticus*는 임상균주와 환경 균주간에 독성이나 용혈소 생산 능력이 다르다고 보고되고 있다(4).

본 연구에서는 2006년에 인천지역 해양환경에서 분리한 *V. vulnificus* 233주를 대상으로 API 20E 동정키트 결과와 vvhA 및 viuB 유전자 검출을 위한 PCR(중합효소연쇄반응) 결과를 비교분석하였고, 대상균주의 항생제 감수성 결과와 PFGE 유전자형을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 대상균주

실험균주는 2006년 1월부터 12월까지 비브리오 유행 예측사업을 통해 인천지역 해양환경가검물로부터 분리된 균주 233주를 대상으로 하였다. 확인동정을 위한 실험방법으로 선택배지는 Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose(TCBS, Difco, USA) 한천배지를 사용하여 녹색의 집락(sucrose 비분해)을 확인한 후 1% NaCl이 첨가된 Nutrient 한천배지(NA, Difco, USA)에 계대하였다.

### API 20E 키트에 의한 동정

NA상의 단독 콜로니를 생리식염수에 McFarland No. 0.5로 현탁한 후 API 20E kit(Biomérieux, France)의 well에 각각 분주하고 37℃에서 20시간 배양 후 API 20E kit manual에 따라 결과를 확인하였다.

### vvhA 및 viuB 유전자의 PCR 검사

생화학적으로 확인 동정된 균주를 대상으로 cytolysin-hemolysin 유전자(vvhA)와 siderophore receptor 생성에 관여하는 viuB 유전자 부위에 대한 PCR을 실시하였다(7). 사용한 primer는 Table1과 같고, PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 변성하고 94℃ 1분, 58℃ 1분, 72℃ 1분간 30회 반복한 후 72℃에서 5분간 확장하여 4℃에 정치한 다음 전기영동으로 증폭산물을 확인하였다. 대조균주로 *V. vulnificus* ATCC 27562를 사용하였다.

### 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)의 방법에 따라 표준 디스크 확산법을 실시하였다. NA에 순수배양된 *V. vulnificus* 집락을 멸균 MHB(Muller Hinton Broth, Difco, USA)에 McFarland No. 0.5가 되도록 현탁하였다. 면봉으로 균액을 묻혀 MHA(Muller Hinton Agar, Difco, USA) 배지 표면에 골고루 바른 다음 실온에 10분간 방치한 후 항생제 disc(BBL, Becton Dickinson)를 올려 놓았다. 37℃에서 24시간 배양한 후 억제환의 크기를 mm 단위로 측정하여 NCCLS 기준에 따라 판정하였다. 본 실험에 사용한 항생제 디스크는 Table3 과 같이 총 21종을 사용하였으며, 정도관리 균주로 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

### PFGE에 의한 유전자형 검사

PFGE는 Pulse-Net PFGE(Pulse-Net Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.)와 김 등의 방법(1,17)을 사용하였다. 먼저 시험균주를 NA배지(1% NaCl)에 접종하여 37℃에서 18~24시간 배양한 다음 2~3ml의 cell suspension TE buffer(100mM Tris, 100mM EDTA, pH7.5)에 넣고, Vitek 탁도계를 이용하여 15~17%로 균체를 현탁하였다. 현탁액 200μl에 proteinase K(20mg/ml stock solution) 10μl를 넣고, 미리 준비해 둔 1.2% plug용 agarose(Seakem Gold agarose, FMC Bio Product) 200μl와 혼합한 후 plug mold(BIO-RAD, USA)에 넣고 굳혔다. 제조된 plug는 ES buffer(0.5M EDTA, pH9.0; 1% sodium-lauroyl-sarcosine) 1.5ml와 40μl의 proteinase K(20mg/ml stock solution)을 첨가하여 55℃에서 1시간 동안 반응시켰고, 반응이 종료된 plug는 멸균증류수로 1회, plug wash TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.5)로 4회 세척한 후 제한효소 처리를 하였다. 각 plug는 세척한 후 제한효소용 완충용액(NEB,

England) 10 $\mu$ l, 제한효소 NotI (NEB, England) 3 $\mu$ l (30unit), BSA(New England Biolabs, England) 1 $\mu$ l, 멸균 증류수 86  $\mu$ l를 넣고 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Molecular weight marker로 사용한 *Salmonella* serovar *Braenderup* ATCC BAA-664는 제한효소 NotI 대신 XbaI(NEB, England) 1.5 $\mu$ l(30U)를 넣어 처리하였다. 제한효소 반응이 끝나면 반응용액을 제거한 plug에 plug wash TE buffer를 가하였으며, agar plug 절편을 겔 성형용 콤의 끝부위에 올려놓은 다음 건조시켰다. 절편의 건조가 끝나면 콤을 설치하고, 1% agarose 용액을 부어서 겔을 완성하였다. 겔을 전기영동 셀에 넣고 CHEF II Mapper PFGE system(BIO-RAD, USA)를 이용하여 적정조건(gradient 6.0V/cm, included angle 120°, initial time 4.16초, final time 40초)에 맞추고 14℃에서 18시간 전기영동 하였으며, EtBr(0.5 $\mu$ g/ml)로 염색하였다. PFGE 결과는 BioNumeric software(core-Bio)를 이용 dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 비교분석하였다.

## 결 과

### API 20E kit 반응 결과

233주의 *V. vulnificus*를 API 20E kit로 실험하여 ONPG, Arginine dehydrolase, Lysine decarboxylase, Ornithine decarboxylase, glucose, amygdalin 이용 결과에 따라 15개의 API profile 그룹으로 분류하였다. 그 중 해수는 11개의 profile 그룹으로 나뉘었고, 갯벌은 10개, 어패류는 6개, 수족관수는 2개로 분류되었다. 환경가검물별 API 20E profile을 살펴보면 1046105 74주(31.8%), 5146105 73주(31.3%), 5046105 39주(16.7%)순으로 나타나나 다양한 생화학적 성상을 보였다. ONPG와 amygdalin은 100%양성을 나타내었다(Table 2).

### vvhA 및 viuB 유전자의 PCR 검사 결과

vvhA와 viuB 유전자 부위에 대한 PCR 실험결과 209주 중 206주(98.6%)가 505 bp(vvhA)에서 밴드를 보였고, 110주(52.6%)는 205bp(viuB)에서 밴드를 나타내었다. vvhA 음성인 3주는 viuB도 음성이었다. viuB 유전자 부위에 대한 PCR 양성 결과는 해수와 어패류는 각각 49주(48%), 16주(48.5%)인 반면 갯벌은 44주(61.1%)였다(Table 2).

### 항생제 감수성

시험균주 175주에 대해 항생제 감수성 실험을 한 결과 가장 높은 감수성을 보인 항생제는 Imipenem(100.0%)이었으며 Sulfamethoxazole/trimethoprim (98.9%), Tetracycline, Ciprofloxacin (98.3%), Ampicillin/sulbactam (97.1%), Chloramphenicol (96.6%), Cefepime (94.9%), Ceftriaxone(94.8%) 순으로 나타났다. 중등도 내성은 Cefazolin(46.3%)이 가장 높았으며 Cefoxitin (41.7%), Streptomycin (37.7%), Kanamycin (28.6%), Cephalothine (16.0%) 순이었다. 가장 높은 내성을 보인 항생제는 Aminoglycosides계인 Streptomycin(14.9%)이었고, 1세대 Cephalosporin 계인 Cefazolin(11.4%), 2세대 Cephalosporin 계인 Cefoxitin(9.7%), 1세대 Quinolones 계인 Nalidixic acid(6.2%)순으로 내성을 보였다(Table 3). 항생제 하나 또는 그 이상의 약제에 대해 내성을 나타낸 것은 56주(32%)로 이중에서 해수에서 분리된 균주는 28주(31.5%), 갯벌은 21주(34.4%), 어패류는 7주(29.2%)였다(Table 4).

### PFGE에 의한 유전자형

*V. vulnificus* 233주의 염색체 DNA를 NotI 제한효소로 절단하여 PFGE를 실시한 바, 78.2 ~ 1135 kb 사이에서 20개의 DNA 분절이 관찰되었으며, 이 결과를 dendrogram으로 분석하였다(Fig. 1). 90% 이상의 상동성을 기준으로 PFGE pattern을 분류한 결과 모두 126개의 유형으로 분리되었고, 58%이상의 상동성을 기준으로 13개의 유형(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M)으로 분류하였다. 유형 I가 104주(44.6%)로 가장 많은 균주들이 분포한 유형이었고 유형 H는 33주(14.2%), 유형 J는 24주(10.3%), 유형 D는 19주(8.2%), 유형 C는 11주(4.7%) 순이었다. 대부분 유형 I에 가장 많은 균주들이 분포하였으나 10월과 6월에 채취한 검체에서 분리된 균주는 16주(69.6%), 13주(36.1%)가 유형 J에 속하였다. 한편 7월에

채취한 검체에서 분리된 균주는 9개의 유형에 속하였고 8월은 8개 유형, 6월은 7개 유형, 9월은 6개 유형, 10월은 5개 유형, 3월은 1개 유형을 나타냈다.

## 고 찰

*V. vulnificus*는 호염성균으로 어패류를 포함한 광범위한 해양환경이나, 연안해수에서 증식하고 있다. *V. vulnificus*의 생물형은 두가지형으로 생물형 1은 indole과 ornithine decarboxylase를 생산하고, 다양한 lipopolysaccharide(LPS) 형을 나타내며, 사람에게 질병을 유발시킨다. 생물형 2는 indole과 ornithine decarboxylase를 생산하지 않고, 공통적인 LPS 형태를 나타내어 serovar E로 표시하고, 주로 뱀장어에게 원인균으로 작용하며, 사람에게는 기회감염원의 가능성으로 보고되고 있다(23). 본 실험은 2006년 3월부터 10월 사이 인천지역 강화도와 연안 일대의 해수 및 갯벌, 어패류에서 분리된 *V. vulnificus* 233주에 대해 API 20E kit의 검사를 실시하였다. 그 결과 대부분 indole 양성반응을 나타내어 생물형 1으로 추정하였고, ONPG와 amygdalin 결과는 100%양성이므로 API 20E kit를 이용하여 *V. vulnificus* 동정 시 ONPG 시험과 amygdalin 시험을 실시하면 *V. vulnificus* 동정율을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 또한 API 20E profile을 살펴보면 1046105(31.8%)와 5146105 (31.3%)가 비슷한 비율로 나왔으나 5146105(55.8%), 5147105(12.8%)가 주로 나타난 2002년 전북지역에서 분리한 *V. vulnificus*에 대한 연구결과(5) 및 2001년 전국 해안에서 분리한 *V. vulnificus*에 대한 연구결과인(9) 5146105(61.9%), 5142105(12.3%)와 차이가 있었다. 이는 지역적 특성과 분리시기의 차이로 인해 발생한 결과로 생각된다.

병원성에 관여하는 독성인자는 단일인자에 의한 것이 아니라 여러 인자들이 복합적으로 작용한다. 여러 병원성인자 중 cytolsin-hemolysin(vvhA)은 외독소인 세포독소이며 숙주의 세포막내로 들어가 세포를 용원시키는 독소이다. 적혈구가 세포막과 괴독소의 활성도를 측정하는데 편리한 세포형이기 때문에 막붕괴 효소를 용혈소(hemolysin)라고도 부른다. 많은 세균들은 철이 결핍된 환경에서 저분자량의 철 착화제인 siderophore를 생산, 철-siderophore 복합체를 형성하여 세균내로 운반하여 철을 이용한다. *V. vulnificus*는 siderophore-Hydroxamate 형, phenolate형 그리고 Vulnibactin이라고 하는 새로운 형의 siderophore를 생산한다(4). Hill 등은 굴에 인위적으로 *V. vulnificus*를 오염시킨 후 cytolsin-hemolysin 유전자 부위를 PCR 방법으로 검출하였고(13), Eiji 등은 해양환경가검물에서 분리된 원인균을 대상으로 Hill 등의 PCR 방법과 API 20E 및 DNA-DNA hybridization을 서로 비교하여 PCR 방법이 해양환경가검물에서의 *V. vulnificus* 동정에 유용하다고 보고했다(11). 소 등도 PCR에 의한 cytolsin(vvh) 유전자 시험을 검출하기 어려운 *V. vulnificus* 균주에 이용할 수 있다고 보고하였다(5). 또한 Gitika 등은 병원성 *V. vulnificus*를 검출하기 위해 siderophore receptor 생성에 관여하는 viuB 유전자와 vvhA 유전자를 동시에 검출하는 multiplexed real-time PCR 방법을 사용하였다(12). Panicker 등은 임상균주가 환경분리 균주보다 viuB 유전자가 양성일 확률이 높다고 보고하였다(19). 본 실험에서 생화학적으로 *V. vulnificus*로 확인 동정된 209주에 대해 PCR을 실시하였을 때 206주(98.6%)가 vvhA 양성으로 확인되어 해양가검물에 대해 *V. vulnificus* 동정시 이 유전자를 타겟으로 이용할 수 있음을 확인 하였고, viuB 유전자 양성주는 모두 vvhA 양성으로 해수(48.0%)와 어패류(48.5%)보다 갯벌(61.1%)에 viuB 양성 균주가 많이 분포하는 것으로 나타났다.

*V. vulnificus*에 대한 원판확산법에 의한 항생제 감수성 검사에서 98-100%의 감수성을 보인 항생제는 cloramphenicol, ampicillin, tetracycline 등으로 나타났다. 비브리오 패혈증 치료에는 tetracycline계 항생제의 투여가 권장되고 있으며 Sanford 등은 tetracycline과 cephalosporin의 복합사용을 권장하였고 Chuang 등은 *V. vulnificus* 감염치료에 cefotaxim과 minocline의 복합사용이 특히 중증환자에 상승효과가 있다고 하였다(4). 그러나 류 등에 의하면 *V. vulnificus*에 대한 최저발육억제농도와 최저살균농도를 액체희석법으로 측정한 결과 ciprofloxacin이 가장 우수하다고 보고 하였다(2). 한편 양등은 임상검체에서 분리된 균주에 대한 항균제 감수성 결과 colistin을 제외한 대부분의 시험 항균제에 감수성을

보인다고 보고하였다(6). 본 실험에서는 분리된 균주 대부분이 사용 항생제에 감수성이 높은 것으로 나타났으며, 1세대와 2세대 cephalosporin계인 Cefazolin(42.3%) 및 Cefoxitin(48.6%)과 Aminoglycosides계인 Streptomycin(47.4%)에 비교적 낮은 감수성을 보였다. *V. vulnificus* 감염 치료제로 권장되는 tetracycline(98.3%), chloramphenicol(96.6%), ciprofloxacin(98.3%) 등의 경우 높은 감수성을 보여 치료제로 사용가능함을 확인하였다.

최근에는 역학조사 방법으로 분자생물학적 기법을 이용한 유전형 검사가 주로 시행된다. 그 중 PFGE 방법은 균전체 DNA의 유전자 형태를 모두 비교할 수 있어서 일반적인 전기영동을 이용한 제한효소 분석법과 비교했을 때 분별력과 재현성이 좋고 결과 해석도 용이하다(8). Mahalingam(16)과 Wong(24)는 *V. cholerae*와 *V. parahaemolyticus* O3:K6에 대해 PFGE 방법으로 실험했을 때 분별력과 재현성 있는 결과를 얻었다. 반면에 Tamplin 등은 임상과 환경에서 분리된 *V. vulnificus*에 대해 PFGE와 ribotype을 실시하였을 때 ribotype이 지역의 유전적 특성을 나타내는 반면 PFGE는 다양한 유형과 변이를 확인할 수 있는 방법으로 *V. vulnificus*의 유전자는 종내 다양성이 높음을 확인하였고, 이는 *V. vulnificus* 균주가 유전적으로 이질적인 환경균주가 많기 때문인 것으로 추정하였다(21). Meilan 등은 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA) PCR로 해수와 굴 등에서 분리한 *V. vulnificus* 208주에 대해 23% 상동성으로 11개의 유형으로 분류하였고 지역적 시기적 차이를 찾을 수 없었고 다만 3월이 다른 월에 비해 상대적으로 종 다양성이 적게 나타났다고 보고하였다. *V. vulnificus*의 종내다양성이 채취장소나 동정원(source of isolation)과 관계없이 나타난 이유로 채취장소의 환경조건 유사, 해수의 흐름에 따른 세균의 이동 및 굴의 여과섭식 시 해수와 굴사이 균 교환 등으로 추정하였다(18). 본 연구에서는 강화도와 인천연안에서 분리한 *V. vulnificus* 233주에 대해 PFGE 분석을 한 결과 90% 이상의 상동성을 기준으로 126개의 유형으로 분리되었고, 58%이상의 상동성을 기준으로 13개의 유형으로 분류하였다. 유형 I가 104주(44.6%)로 가장 많은 균주들이 분포한 유형이었고 채취시기 대부분 유형 I에 가장 많은 균주들이 분포하였으나 10월과 6월에 채취한 검체는 유형 J에 16주(69.6%) 13주(36.1%)로 가장 많은 균주들이 분포하여 채취시기와 균주사이에 유전적 상관관계가 있음을 추정할 수 있었다. 월별 채취 분리 균주의 유형분포를 살펴보면 8월과 7월은 각각 8개 유형, 9개 유형을 나타내는 반면, 5월과 3월은 3개, 1개 유형으로 나타나 다른 채집월에 비해 동절기 이후 3월에 분리된 *V. vulnificus*가 상대적으로 DNA 유형이 적었다는 Meilan 등(18)의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 환경 검체별, 지역적인 유전적 상관관계는 얻을 수 없었다.

## 참 고 문 헌

1. 김석호, 정혜숙, 김준영, 이복권. 2006. PFGE Standardization and Molecular Epidemiological Study of *Vibrio vulnificus*. May 3 ~ 4. Daegu. Korea. 156
2. 류필열, 최정인, 이준행. *Vibrio vulnificus*에 대한 quinolone계 항균제의 살균효과. 대한미생물학회지 27, 449-456.
3. 박근태, 박민정, 정초록, 송춘복, 이제희, 여인규, 전유진, 허문수. 2004. 국내 연안에서 분리한 *Vibrio vulnificus*의 특성. 생명과학회지 14, 986-990.
4. 박석돈. 1996. 비브리오 불니피쿠스 감염증. 고려의학, 서울.
5. 소향아. 2005. *Vibrio vulnificus*의 혈청형과 DNA 분자형 및 항균제 감수성에 관한 연구. 전주대학교 대학원. 박사학위논문
6. 양성진, 신종희, 조덕, 기승정, 신명근, 서순팔, 양동욱. 2005. Microscan과 Vitek II 시스템을 이용한 *Vibrio vulnificus*의 동정. 대한 진단검사의학회지. 25, 33-38.

7. 질병관리본부. 2005. 감염병실험실진단
8. 최윤미, 배직현. 1998. Pulsed-field Electrophoresis를 이용한 *Salmonella typhi* 염색체 유전자의 다양성 분석, 대한임상병리학회. 18, 343-351.
9. 황규잠, 주영인, 이영희, 이광준, 배송미, 김기상. 2003. 2001년 국내 해양환경에서 분리된 *Vibrio vulnificus*의 생화학적 특성 및 항생제 감수성 패턴. J. Bacteriol. and Virol. 33, 285-291.
10. Arias, C. R., L. Verdonck, J. Swings, E. Garay, and R. Aznar. 1997. Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2600-2606.
11. Eiji, A., S. Haruo, K. Junjiro, S. Hironshi, T. Takumi, E. Kan, and D. Yoshiaki. 1997. Evaluation of the polymerase chain reaction method for identification of *Vibrio vulnificus* isolated from marine environments. J. Food Protection 60, 81-83.
12. Gitika Panicker, C. L. Michael, Vickery, and Asim K. Bej. 2004. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. Can. J. Microbiol. 50, 911-922.
13. Hill, W.E., S. P. Keasler, M. W. Trucksess, P. Fneg, C. A. Kaysmer, and K. A. Laampel. 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. Appl. Environ. Microbiol. 57, 707-711.
14. Hin-chung, Wong, Chen Shau-Yan, Chen Meng-Yi, James D. Oliver, Lien-I Hor, and Wen-Cherng Tasi. 2004. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated from Taiwan and the United States. Appl. Environ. Microbiol. 9, 5153-5158.
15. Lee, S. E., S. L. Kim, S. J. Kim, H. S. Kim., J. H. Shin, S. H. Choi, S. S. Chung, and J. H. Rhee. 1998. Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. J. Clin. Microbiol. 36, 2887-2892.
16. Mahalingam, S., Cheong Y. M., S. Kan, R.M. Yassin, J. Vadivelu, and T. Pang. 1994. Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 32, 2975-2979.
17. Matushek, M.G., M.J.M. Bonten, and M. K. Hayden 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin Microbiol. 34, 2589-2600.
18. Meilan, Lin., Deborah A. Payne and John R. Schwarz. 2003. Intraspecific Diversity of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay Water and Oysters as Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3170-3175.
19. Panicker, G. M. C. Vickery and A. K. B. EJ. 2004. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. Can. J. Microbiol. 50, 911-922.
20. Ryang, D. W., S. W. Cho, M. G. Shin, J. H. Shin, and S. P. Suh. 1997. Molecular typing of *Vibrio vulnificus* isolates by random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 50, 113-12.
21. Sader, H. S., R J. Hollis, and M. A. Pfaller. 1995. The use of molecular tekhniques in the

epidemiology and control of infectious disease. Clin. Lab Med. 15, 407–431.

22. Tamplin, M. L., J. K. Jackson, C. Buchrieser, R. L. Murphree, K. M. Portier, V. G. Angar, L. G. Miller, and C. W. Kaspar. 1996. Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3572–3580.

23. Tison DL, Kelly. 1986. Virulence of *Vibrio vulnificus* strains from marine environments. Appl Environ Microbiol 51, 1004–1006.

24. Wong, H.C., S. H. Liu, T. K. Wang, C. L. Lee, C. S. Chiou, D. P. Liu, M. Nishibuchi, and B. K. Lee. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3981–3986.

#### **ABSTRACT: Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated in Incheon**

Bo Young Oh\*, Jung Hee Kim, Young Woo Gong, Seung Jegal, Hye Young Kim, Mi Yeon Lee, Kyoung Wha Hwang, Yeon Ja Koh, Jae Mann Lee, Jong Myoung Go, Yong Hee Kim.  
(Incheon Institute of Health and Environment, Sinheung-dong 18-4, Jung-gu, Incheon 400-102, Korea)

We performed the biochemical characteristics, molecular epidemiological analysis, and drug susceptibility test of *V. vulnificus* isolates from environmental sources in Incheon. For this study, 233 strains were isolated from seawater, sediment, shellfish. *V. vulnificus* isolates were divided into 15 biochemical groups, which were positive for ONPG and Amygdalin test. Among the 209 strains, 206(98.6%) strains and 110(52.6%) strains revealed positive for *vvhA* and *viuB* gene, and the *viuB* gene detection rates of *V. vulnificus* from seawater, shellfish and sediment were 48%, 48.5% and 61.6%, respectively. From disc diffusion test on 175 isolates, most of strains were sensitive to Imipenem (100.0%), Sulfamethoxazole/trimethoprim (98.9%), Tetracycline, Ciprofloxacin (98.3%), Ampicillin/sulbactam (97.1%), Chloramphenicol (96.6%), Cefepime (94.9%) and Ceftriaxone(94.8%), multi-drug resistance rates was 31.5% of seawater, 34.4% of sediment and 29.2% of shellfish. PFGE was performed on 233 *V. vulnificus* isolates with the objective of investigating the extent of genetic diversity of these isolates in our region. We could find that at least 126 different PFGE patterns were generated according by 90% of similarity and 13 patterns by 58% of similarity. The major cluster was type I(44.6%) during the most of the year, and type J was frequent pattern in June and October. There were 9 distinct PFGE types in July, 8 types in August, 7 types in June, 6 types in September, 5 types in October and 1 type in March.



Table 1. Oligonucleotide primer sequences used in this study.

| Gene                                      | Primer | Sequence (5' → 3' )        | Amplification size (bp) |
|---|--------|----------------------------|-------------------------|
| vvhA<br>(cytolysin-hemolysin)             | vvh F  | TTCCAACCTTCAAACCGAACTATGAC | 205                     |
|   | vvh R  | ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG   |                         |
| viuB<br>(vulnibactin utilization protein) | viuB F | GGTTGGGCACTAAAGGCAGATATA   | 505                     |
|   | viub R | CGGCAGTGGACTAATACGCAGC     |                         |

Table 2. Biochemical characteristics of *V. vulnificus* isolated from environments.

| Test               |         | Seawater<br>(n=112) |         | Sediment<br>(n=83) |        | Shellfish<br>(n=36) |        | Other<br>(n=2) |         | Total (%) |        |
|--------------------|---------|---------------------|---------|--------------------|--------|---------------------|--------|----------------|---------|-----------|--------|
| API 20E<br>profile | 1046005 | 5                   | (4.5)   | 1                  | (1.2)  | 3                   | (8.3)  |                |         | 9         | (3.9)  |
|                    | 1046105 | 32                  | (28.6)  | 28                 | (33.7) | 13                  | (36.1) | 1              | (50.0)  | 74        | (31.8) |
|                    | 1146005 | 0                   | (0.0)   | 1                  | (1.2)  | 0                   | (0.0)  |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 1146105 | 10                  | (8.9)   | 6                  | (7.2)  | 2                   | (5.6)  |                |         | 18        | (7.7)  |
|                    | 1146115 | 0                   | (0.0)   | 1                  | (1.2 ) | 0                   | (0.0)  |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 1346105 | 1                   | (0.9)   | 0                  | (0.0)  | 0                   | (0.0)  |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 5006105 | 1                   | (0.9)   | 0                  | (0.0)  | 0                   | (0.0 ) |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 5044005 | 1                   | (0.9)   | 0                  | (0.0)  | 0                   | (0.0)  |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 5046105 | 24                  | (21.4)  | 9                  | (10.8) | 6                   | (16.7) |                |         | 39        | (16.7) |
|                    | 5047005 | 0                   | (0.0)   | 1                  | (1.2)  | 0                   | (0.0)  |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 5106105 | 0                   | (0.0)   | 0                  | (0.0)  | 1                   | (2.8)  |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 5146005 | 4                   | (3.6)   | 5                  | (6.0)  | 0                   | (0.0)  |                |         | 9         | (3.9)  |
|                    | 5146105 | 31                  | (27.7)  | 30                 | (36.1) | 11                  | (30.6) | 1              | (50.0)  | 73        | (31.3) |
|                    | 5147005 | 1                   | (0.9)   | 0                  | (0.0)  | 0                   | (0.0)  |                |         | 1         | (0.4)  |
|                    | 5147105 | 2                   | (1.8)   | 1                  | (1.2)  | 0                   | (0.0)  |                |         | 3         | (1.3)  |
| PCR<br>test        |         | 102                 |         | 72                 |        | 33                  |        | 2              |         | 209       |        |
|                    | vvhA    | 102                 | (100.0) | 71                 | (98.6) | 31                  | (93.9) | 2              | (100.0) | 206       | (98.6) |
|                    | viuB    | 49                  | (48.0)  | 44                 | (61.1) | 16                  | (48.5) | 1              | (50.0)  | 110       | (52.6) |

Table 3. Antimicrobial susceptibility of 175 *V. vulnificus* isolated from environments.

| Antimicrobial agent group                 | Antimicrobial agent                 | Disk content ( $\mu\text{g}$ ) | Percent of strains |      |      |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------|------|------|
|   |                                     |                                | S                  | I    | R    |
| Penicillins                               | Ampicillin (AM)                     | 10                             | 93.7               | 2.9  | 3.4  |
|   | Ticarcillin (TIC)                   | 75                             | 89.1               | 9.1  | 1.8  |
| $\beta$ -Lactamase inhibitors combination | Ampicillin/sulbactam (SAM)          | 10/10                          | 97.1               | 1.7  | 1.2  |
|   | Amoxicillin/calvulanic acid (AMC)   | 20/10                          | 93.7               | 5.1  | 1.2  |
| Cephalosporin                             |                                     |                                |                    |      |      |
| 1st generation                            | Cephalothin (CF)                    | 30                             | 78.3               | 16.0 | 5.7  |
|   | Cefazolin (CZ)                      | 30                             | 42.3               | 46.3 | 11.4 |
| 2nd generation                            | Cefoxitin (FOX)                     | 30                             | 48.6               | 41.7 | 9.7  |
|   | Cefotetan (CTT)                     | 30                             | 89.1               | 8.0  | 2.9  |
| 3rd generation                            | Ceftriaxone (CRO)                   | 30                             | 94.8               | 4.6  | 0.6  |
|   | Cefotaxime (CTX)                    | 30                             | 92.0               | 6.3  | 1.7  |
| 4th generation                            | Cefepime (FEP)                      | 30                             | 94.9               | 1.7  | 3.4  |
| Carbapenems                               | Imipenem (IPM)                      | 10                             | 100.0              | 0.0  | 0.0  |
| Aminoglycosides                           | Streptomycin (S)                    | 10                             | 47.4               | 37.7 | 14.9 |
|   | Kanamycin (K)                       | 30                             | 68.0               | 28.6 | 3.4  |
|   | Gentamicin (GM)                     | 10                             | 94.3               | 2.8  | 2.9  |
|   | Amikacin (AN)                       | 30                             | 86.3               | 8.0  | 5.7  |
| Quinolones                                |                                     |                                |                    |      |      |
| 1st generation                            | Nalidixic acid (NA)                 | 30                             | 90.9               | 2.9  | 6.2  |
| 2nd generation                            | Ciprofloxacin (CIP)                 | 5                              | 98.3               | 1.1  | 0.6  |
| Tetracyclines                             | Tetracycline (TE)                   | 30                             | 98.3               | 0.6  | 1.1  |
| Sulfonamid-trimethoprim                   | Sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT) | 1.25/23.75                     | 98.9               | 1.1  | 0.0  |
| Chloramphenicol                           | Chloramphenicol (C)                 | 30                             | 96.6               | 2.3  | 1.1  |

Table 4. Antimicrobial resistance patterns of *V. vulnificus* strains.

|       | Antimicrobial resistance             | Strains |     | (%)    |
|-------|--------------------------------------|---------|-----|--------|
| 11    | Am,Sam,Cf,Cz,Fep,Ctt,Ctx,C,Na,Te,Cro | 1       | 1   | (0.6)  |
| 10    | Am,An,Sam,Cf,Cz,Fep,Ctt,Tic,S,Fox    | 1       | 1   | (0.6)  |
| 9     | Am,An,Cz,Fep,Gm,Tic,S,Amc,Fox        | 1       | 2   | (1.1)  |
|       | Am,An,Cf,Cz,Ctt,Na,K,S,Fox           | 1       |     |        |
| 6     | An,Cf,Cz,Gm,S,Fox                    | 1       | 1   | (0.6)  |
| 5     | An,Cf,Cz,Ctt,Fox                     | 1       | 3   | (1.7)  |
|       | An,Cf,Cz,S,Fox                       | 1       |     |        |
|       | Cf,Cz,Gm,S,Fox                       | 1       |     |        |
| 4     | An,Na,S,Fox                          | 1       | 3   | (1.7)  |
|       | Cf,Cz,S,Fox                          | 1       |     |        |
|       | Cz,Na,S,Fox                          | 1       |     |        |
| 3     | Cf,Gm,Na                             | 1       | 5   | (2.9)  |
|       | Cz,S,Fox                             | 2       |     |        |
|       | Ctt,Na,K                             | 1       |     |        |
|       | C,Na,K                               | 1       |     |        |
| 2     | An,S                                 | 1       | 11  | (6.3)  |
|       | Cf,Gm                                | 1       |     |        |
|       | Cz,S                                 | 2       |     |        |
|       | Fep,S                                | 1       |     |        |
|       | Fep,Ctx                              | 1       |     |        |
|       | Ctx,Na                               | 1       |     |        |
|       | Cip,S                                | 1       |     |        |
|       | Te,S                                 | 1       |     |        |
|       | K,S                                  | 1       |     |        |
|       | S,Amc                                | 1       |     |        |
| 1     | Am                                   | 2       | 29  | (16.6) |
|       | An                                   | 2       |     |        |
|       | Cz                                   | 6       |     |        |
|       | Fep                                  | 1       |     |        |
|       | Na                                   | 3       |     |        |
|       | K                                    | 3       |     |        |
|       | S                                    | 7       |     |        |
|       | Fox                                  | 5       |     |        |
| 0     |                                      |         | 119 | (68.0) |
| Total |                                      |         | 175 | (100)  |

Table 5. Distribution of PFGE clusters for *V. vulnificus* isolates from environment.

| Sampling date<br>(month) | Distribution of <i>V. vulnificus</i> isolates in PFGE clusters <sup>a</sup> |       |        |        |        |        |       |        |         |        |       |       |       |       |        | No. of clusters |
|--------------------------|---|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------------|
|                          | A   | B     | C      | D      | E      | F      | G     | H      | I       | J      | K     | L     | M     | Total | (%)    |                 |
| Total                    | 2   | 1     | 11     | 19     | 9      | 12     | 7     | 33     | 104     | 24     | 3     | 5     | 3     | 233   | (100)  | 13              |
| (%)                      | (0.9)   | (0.4) | (4.7)  | (8.2)  | (3.9)  | (5.2)  | (3.0) | (14.2) | (44.6)  | (10.3) | (1.3) | (2.1) | (1.3) | (100) |        |                 |
| 3                        | 0   | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0      | 1       | 0      | 0     | 0     | 0     | 1     | (0.4)  | 1               |
| (%)                      | (0.0)   | (0.0) | (0.0)  | (0.0)  | (0.0)  | (0.0)  | (0.0) | (0.0)  | (100.0) | (0.0)  | (0.0) | (0.0) | (0.0) | (100) |        |                 |
| 5                        | 0   | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 2     | 0      | 16      | 6      | 0     | 0     | 0     | 24    | (10.3) | 3               |
| (%)                      | (0.0)   | (0.0) | (0.0)  | (0.0)  | (0.0)  | (0.0)  | (8.3) | (0.0)  | (66.7)  | (25.0) | (0.0) | (0.0) | (0.0) | (100) |        |                 |
| 6                        | 0   | 0     | 6      | 2      | 0      | 0      | 2     | 13     | 11      | 1      |       | 1     | 0     | 36    | (15.5) | 7               |
| (%)                      | (0.0)   | (0.0) | (16.7) | (5.6)  | (0.0)  | (0.0)  | (5.6) | (36.1) | (30.6)  | (2.8)  | (0.0) | (2.8) | (0.0) | (100) |        |                 |
| 7                        | 2   | 0     | 4      | 8      | 3      | 7      | 3     | 15     | 30      | 0      | 0     | 1     | 0     | 73    | (31.3) | 9               |
| (%)                      | (2.7)   | (0.0) | (5.5)  | (11.0) | (4.1)  | (9.6)  | (4.1) | (20.5) | (41.1)  | (0.0)  | (0.0) | (1.4) | (0.0) | (100) |        |                 |
| 8                        | 0   | 1     | 1      | 4      | 4      | 4      | 0     | 1      | 17      | 1      | 0     | 0     | 0     | 33    | (14.2) | 8               |
| (%)                      | (0.0)   | (3.0) | (3.0)  | (12.1) | (12.1) | (12.1) | (0.0) | (3.0)  | (51.5)  | (3.0)  | (0.0) | (0.0) | (0.0) | (100) |        |                 |
| 9                        | 0   | 0     | 0      | 5      | 2      | 0      | 0     | 0      | 28      | 0      | 3     | 2     | 3     | 43    | (18.5) | 6               |
| (%)                      | (0.0)   | (0.0) | (0.0)  | (11.6) | (4.7)  | (0.0)  | (0.0) | (0.0)  | (65.1)  | (0.0)  | (7.0) | (4.7) | (7.0) | (100) |        |                 |
| 10                       | 0   | 0     | 0      | 0      | 0      | 1      | 0     | 4      | 1       | 16     | 0     | 1     | 0     | 23    | (9.9)  | 5               |
| (%)                      | (0.0)   | (0.0) | (0.0)  | (0.0)  | (0.0)  | (4.3)  | (0.0) | (17.4) | (4.3)   | (69.6) | (0.0) | (4.3) | (0.0) | (100) |        |                 |

<sup>a</sup> Clusters obtained through UPGMA analysis of PFGE profiles of all 233 *V. vulnificus* strains, see Fig. 1.

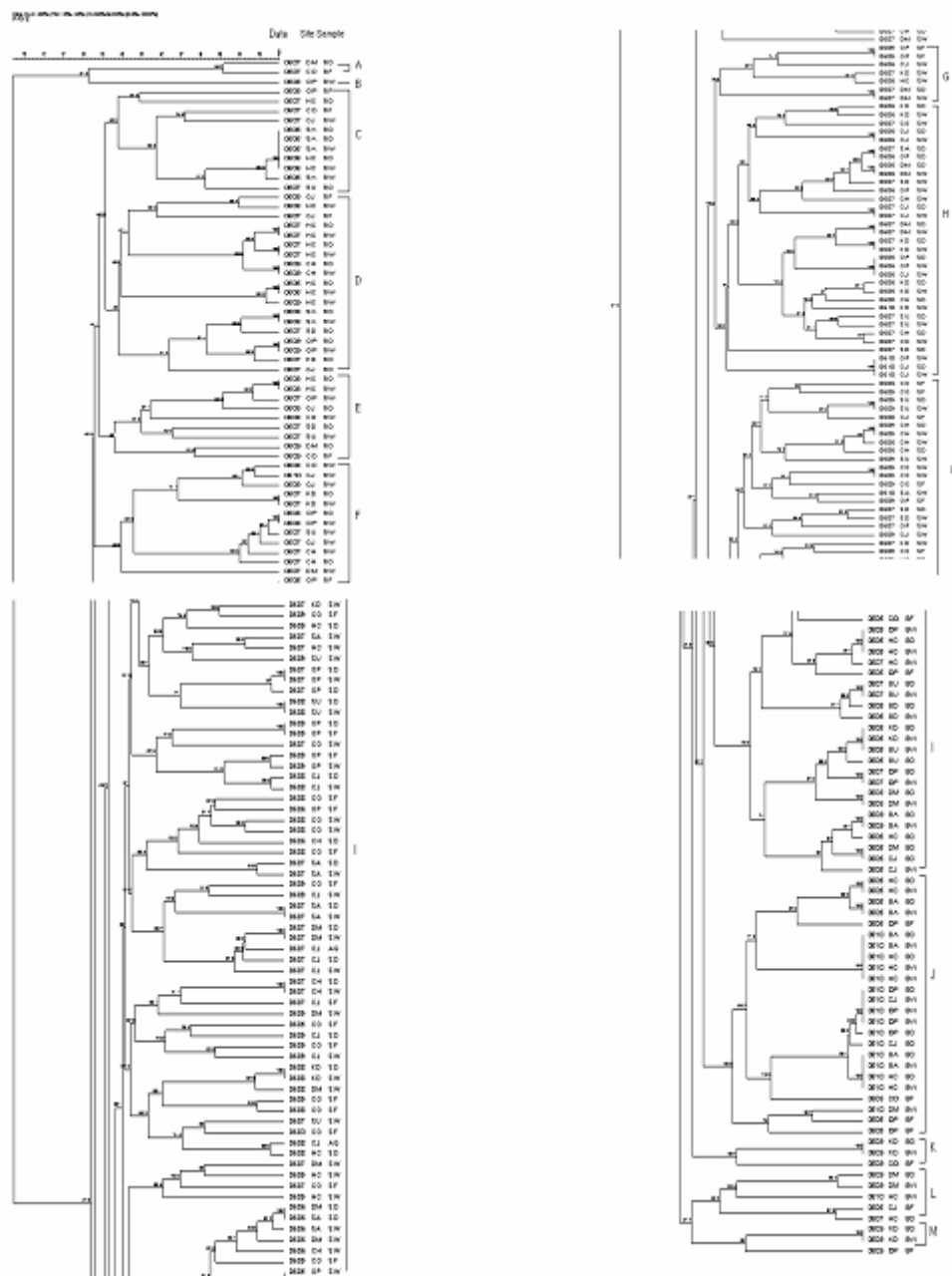


Fig. 1. UPGMA cluster analysis of PFGE profiles of 233 *V. vulnificus* strains isolated from environment. KD: Kodong, DM: Derrimi, SA: Samsanmyen, SD: SeoDo, SU: Sunsuri, OP: Ouipori, CH: Changhuri, CJ: Chojiri, HC: Hwangchungri, CO: coastal water, SW: Seawater, SD: Sediment, SF: Shellfish, AQ: Other.