

인천지역 해양환경에서 분리된 비브리오패혈증균의 분포 및 항생제 내성 양상

황경화†, 오보영, 공용우, 이제만, 고종명, 김용희
인천광역시보건환경연구원

Distribution and Antibiotic Resistance of *Vibrio vulnificus* isolated in Incheon Coastal Area

Kyoung Wha Hwang¹⁾, Bo Young Oh, Young Woo Gong, Jae-Mann Lee, Jong-Myoung
Go, Yong Hee Kim

Incheon Institute of Health & Environment, Shinheung-dong 18-4, Jung-gu, Incheon 400-102, Korea

ABSTRACT

We investigated the distribution and drug susceptibility test of *V. vulnificus* isolated from environmental sources in Incheon. In this survey, total 4,302 samples were obtained from different sites of the Incheon coastal area during the periods from march 2004 to November 2006. Among the 4,302 samples, 310 strains were isolated. The isolation rates of *Vibrio vulnificus* from fish, shellfish, estuarine water and sediment were 6.7%, 4.7%, 12.4% and 23.2%, respectively. The highest isolation rate was 14.6% in September and in spite of low temperature the isolation rate was 5.1% in November. The highest rate of antibiotic resistance was observed against streptomycin(15.3%), cefazolin(8.5%), cephalothin(8.3%), amikacin(8.3%), cefoxitin(6.7%) and nalidixic acid(6.7%). Seventeen percent of isolates were observed to be resistant to two or more of the antibiotics tested.

Keywords: *Vibrio vulnificus*, distribution, antibiotic resistance

1) Corresponding author: Incheon Institute of Health & Environment
Tel: 82-32-440-5587, Fax: 82-32-440-5589
E-mail: hkwha@naver.com

I. 서론

비브리오균은 Vibrionaceae과, Vibrio속으로 77종이 있으며, 이 중 12종이 사람에게 병원체로 작용하며 임상검체에서 분리되고 있다. *V. vulnificus*는 강 하구나 바닷물에 살고 있는 호염성의 그람음성간균으로서, Hollis¹⁾에 의해 처음 동정 보고된 후 1979년 Farmer²⁾에 의해 처음으로 명명되었다. *V. vulnificus*에 의한 인체감염은 주로 2가지 임상형태로 발생하는데, 오염된 어패류를 생식하였을 때 발생하는 원발성 패혈증과 해수 또는 갯벌에 상처가 노출되었을 때 발생하는 창상감염이 있다.³⁾ 국내에서의 감염은 주로 원발성 패혈증의 형태로서 1979년 전남지방에서 처음 보고 되었으며,⁴⁾ 균 동정에 의한 확진 예는 1982년에 보고되었다.⁵⁾ 이후 계속적으로 국내 해안에서 *V. vulnificus*가 분리되고 있으며 현재까지 매년 사망자가 나타나고 있어 하절기의 중요한 보건 및 사회문제로 대두되고 있다.⁶⁾ 원발성 패혈증은 폐저성 궤양, 쇼크, 장기기능부전을 유발하며 치명률은 62-72%이다. 그리고 상처를 통한 창상 감염은 상처 부위에 수포 및 괴사를 발생시키며 치명율이 25-50%로 알려져 있다.^{7),8)} *V. vulnificus*에 감염되면 간 질환이 있는 사람이 간 질환이 없는 사람에 비해 사망할 확률이 2.7배나 높은 것으로 보고되고 있다.⁸⁾ 그 외, 당뇨병, 관절염, 결핵 등 만성질환이 있는 환자에서도 발생하여 만성병을 가진 사람들은 어패류를 생식하거나 바닷물과 접촉할 때 주의를 기울여야 한다.

1990년대 초반까지 항생제 내성균의 선택과 확산이 주로 병원에서만 문제된다고 생각하였다.⁹⁾ 그러나, 항생제 사용 영역이 점차 확대되어 환자치료 뿐만 아니라 농업 및 산업분야에서 가축이나 채소 등의 질병예방과 치료, 그리고 생산성 향상과 경제적인 목적으로 사용되면서 이로 인해 내성균이 지역사회에 광범위하게 출현하게 되었다.¹⁰⁾ 또한, 항생제 사용의 증가로 도시하수에서의 농도가 증가하여 수생 환경중에 있는 세균에 상당한 영향을 주게 될 것으로 보인다.¹¹⁾ 최근에서야 환경으로 유입된 의약품질이 생태계와 인체에 영향을 미칠 수 있다는 우려가 제기되고 있으며,¹²⁾ 다제 내성균의 증가와 신종 내성균의 출현등 내성 확산 방지를 위해서 체계적이고 지속적인 감시와 내성관련연구가 활성화 되어야 한다.¹³⁾ 비브리오 패혈증은 병의 진행속도가 매우 빠르고 감수성 있는 항균제로 치료함에도 불구하고 전신증상이 나타난 후 평균 4.2 62-79% | 이르는 치명적 질환이므로 병의 초기에 진단하여 신속하게 치료해야 한다.¹⁴⁾ *V. vulnificus*에 대해 감수성이 높은 항생제는 quinolone , tetracycline, chloramphenicol , ampicillin 3 cephalosporin | 항생제인 moxalactam, cefoperazone, cefomandole : 감수성이 낮은 항생제로 보고되고 있다.¹⁵⁾

본 연구에서는 2004년-2006년의 인천지역 해양환경에서 분리한 *V. vulnificus* 310주를 대상으로 *V. vulnificus*의 분포를 살펴보고, 대상균주의 항생제 감수성 시험을 통하여 내성 정도를 파악하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 대상균주의 분리

2004년 3월부터 2006년 11월까지 인천연안지역을 3개 지역으로 구분하고, 이를 다시 16 개소 지점으로 나누어 어류, 조개류, 해수 및 갯벌에서 총 4,302건의 가검물을 채취하였다.

각각의 채취지점은 Fig. 1에 나타내었다. *V. vulnificus* 확인동정을 위한 실험방법으로 선택 배지는 Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose(TCBS, Difco, USA) 한천배지를 사용하여 녹색의 집락(sucrose) , *V. vulnificus* 가 의심되는 군주에 대해서 1% NaCl Nutrient (NA, Difco, USA) .

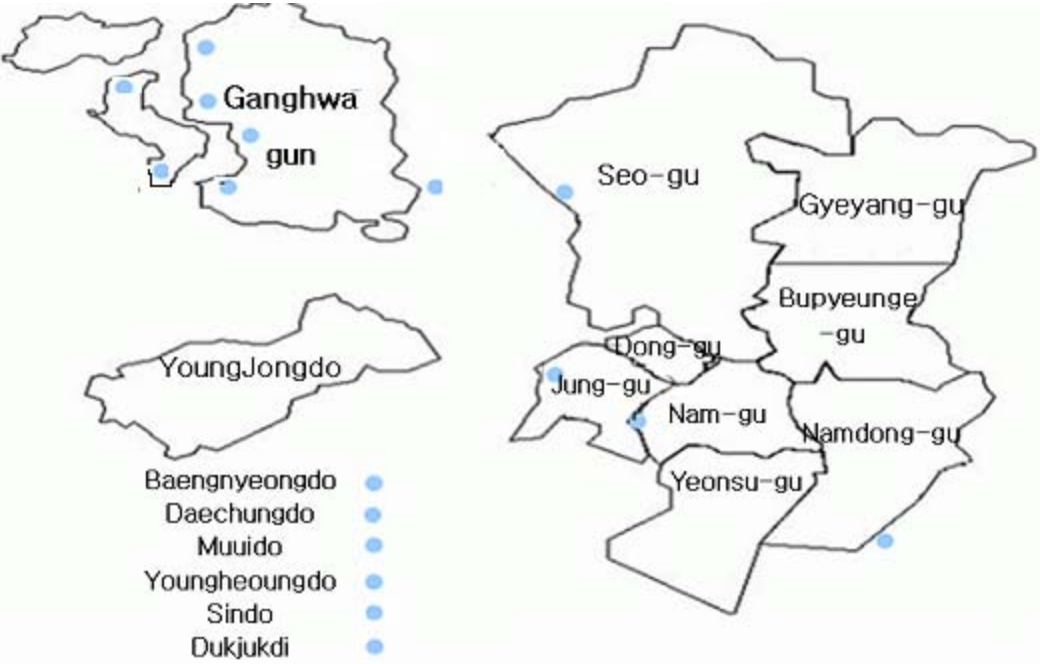


Fig.1. Sampling sites for the isolation of *V. vulnificus* in Incheon coastal area.

2. 생화학적 동정시험 및 Multiplex PCR 검사

Ewing¹⁶⁾의 방법과 Bergey's manual of systematic bacteriology¹⁷⁾에 따라 각종 생화학 시험을 실시하였고 추가로 시판용인 API 20E kit(bioMeriux, France)를 사용하여 *V. vulnificus*로 최종확인, 동정을 하였다. 또한, 확인 동정된 군주를 대상으로 cytolysin- hemolysin 유전자(vvhA) + siderophore receptor viuB 유전자 부위에 대한 polymerase chain reaction(PCR) + 실시하였다(Table 1).¹⁸⁾ 사용한 primer Table 1 , PCR 반응 조건은 94℃ 5 94℃ ↓ , 58℃ ↓ , 72℃ ↓ 30 72℃ |서 5 4℃ .

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used in this study.

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Amplification size (bp)
vvhA	vvh F	TTCCAAC TTCAAACCGAACTATGAC	205
	vvh R	ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG	
viuB	viuB F	GGTTGGGCACTAAAGGCAGATATA	505
	viub R	CGGCAGTGGACTAATACGCAGC	

3. 항생제 감수성 시험

항생제에 대한 감수성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 방법에 따라 디스크 확산법으로 실시하였다.¹⁹⁾ Nutrient Agar | 순수배양된 *V.vulnificus* 집락을 멸균 MHB(Muller Hinton Broth, Difco, USA) McFarland No. 0.5 면봉으로 균액을 묻혀 MHA(Muller Hinton Agar, Difco, USA) 배지 표면에 골고루 바른 다음 실온에 10 disc(BBL, Becton Dickinson) . Plate 를 37℃ 24 |간 배양한 후 억제환의 크기를 mm 단위로 측정하여 CLSI 기준에 따라 판정하였다.²⁰⁾ 본 실험에 사용한 항생제 디스크는 Table 4 21 .

III. 결과 및 고찰

1. 생화학적 특성 및 Multiplex PCR 결과

Ortho-nitro-phenyl-galactoside (ONPG), gelatinase, amygdaline, oxidase에 모든 균 이 양성 반응을 보였으며, lysine decarboxylase 76.7%, ornithin decarboxylase 45.5%, Indole 98.3%, glucose 98.3%, mannitol 91.7%가 양성을 보였다. 또한, arginine dehydrolase, citrate, urease, Inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose에는 모든 균이 음성반응 보였다(Table 3). API 20E |서 *V.vulnificus* 양성으로 나타난 모든 균주에 대해서 *uvhA*와 *viuB* 유전자 부위에 대한 multiplex PCR 205bp (*uvhA*) |서 밴드를 보였고, 50.0% 505bp (*viuB*) |서 밴드를 나타내었다 (Fig. 2).

Table 2. Biochemical characteristics of *V. vulnificus* isolated from Incheon coastal

Biochemical tests	Result (%)
Ortho-nitro-phenyl-galactoside(ONPG)	+ ^a (100.0)
Arginine dehydrolase(ADH)	- ^b (100.0)
Lysine decarboxylase(LDC)	+ (76.7)
Omithine decarboxylase(ODC)	+ (45.0)
Citrate(CIT)	- (100.0)
H ₂ S	- (100.0)
Urease(URE)	- (100.0)
Tryptophane deaminase (TDA)	- (100.0)
Indole(IND)	+ (98.3)
acetoin production(VP)	+ (6.7)
Gelatinase(GEL)	+ (100.0)
Glucose(GLE)	+ (98.3)
Mannitol(MAN)	+ (91.7)
Inositol(INO)	- (100.0)
Sorbitol(SOR)	- (100.0)
Rhamnose(RHA)	- (100.0)
Saccharose(SAC)	- (100.0)
Melibiose(MEL)	- (100.0)
Amygdaline(AMY)	+ (100.0)
Arabinose(ARA)	- (98.3)
Oxidase(OX)	+ (100.0)

^a: positive reaction, ^b: negative reaction.

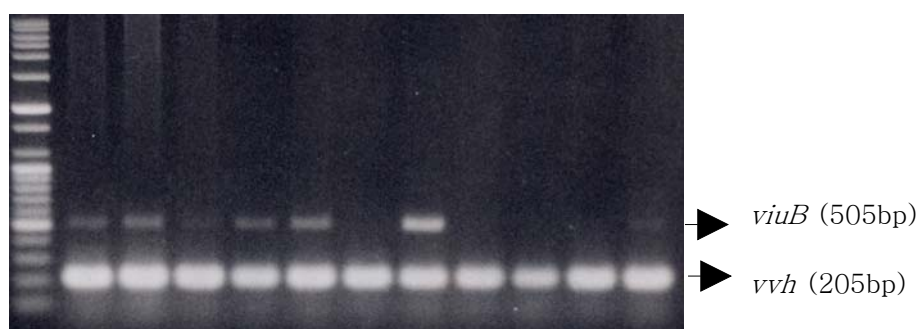


Fig. 2. PCR amplification of *vvh* and *viuB* gene.

2. 시료별 *V. vulnificus*의 분포

2003년 3월부터 2006년 11월까지 인천지역 자연환경 가검물 4,302건 중에서 분리된 *V. vulnificus* 균주는 310주로 7.2%의 분리률을 보였다(Table 3). 이를 가검물 종류별로 구분하여 살펴보면, 갯벌에서 59주(23.2%)로 가장 많이 분리되었으며, 해수 98주(12.4%), 생선류 5주(6.7%), 조개류 148주(4.7%)가 분리되었다. 다른 지역의 *V. vulnificus* 분리율과 비교해보면, 인천지역은 7.2%로 전남해안지역 26.2%²¹⁾, 부산과 경남일대의 해안지역 10.0%⁶⁾보다는 분리율이 낮았으며, 경북 동해안 지역의 분리율 3.4%⁸⁾ 보다는 높은 것으로 나타났다.

본 연구결과, 갯벌에서 분리된 *V. vulnificus* 310주 중 갯벌에서 59주로 가장 많이 분리되었는데 갯벌환경이 *V. vulnificus*에 의한 인체 감염을 유발할 수 있다는 점에서 이들균에 대한 적절한 대책이 필요하다. 실제, 서해안은 갯벌이 잘 발달되어 있고 해산물 채취와 같은 갯벌에서의 활동으로 인한 *V. vulnificus*에 노출될 기회가 다른지역 보다 많다. 실제 환자 발생이 많이 지역은 갯벌이 많은 서해안과 남해안으로 이들 지역이 *V. vulnificus*의 밀도가 높은 것으로 보고되고 있다. 그러므로, 갯벌 퇴적물에 대한 *V. vulnificus*의 신속한 검출과 상시 모니터링 체계 확립이 요구될 것으로 보인다.

Table 3. Isolation rates of *V. vulnificus* in Incheon coastal area

Specimen	No. of sample	No. of isolated (%)
Shellfishes	3,181	148 (4.7)
Fishes	75	5 (6.7)
Estuarine water	792	98 (12.4)
Sediment	254	59 (23.2)
Total	4,302	310 (7.2)

* Number of positive/number of sample.

3. 월별 *V. vulnificus*의 분포

해수의 3년간 월평균온도와 관련하여 *V. vulnificus*의 분포를 살펴보면 해수온도가 평균 6.6℃인 3월부터 분리되기 시작하여 해수온도가 올라갈수록 분리율이 증가하다가 평균온도가 22.9℃인 9월의 분리율이 14.6%로 가장 높았으며, 해수온도가 평균 10.2℃인 11월 하순에도 *V. vulnificus*의 분리율이 5.1% 되었다(Fig.3). 일반적으로 *V. vulnificus*의 생존에 중요한 영향을 미치는 환경인자는 온도가 염도로 알려져 있다. 그러나, 본 연구결과 평균온도가 6.6℃인 3월부터, 평균 온도가 10.2℃인 11월에도 *V. vulnificus*가 분리되어 저온에서도 *V. vulnificus*가 생존하고 있는 것으로 나타났다. 이는 해수온도가 17℃이하인 3월과 4월에는 *V. vulnificus*가 분리되지 않았다는 연구²¹⁾와 20℃가 넘어서는 7월초에 균이 검출되기 시작하여 10℃이하가 되는 10월 중순 이후에는 균이 검출되지 않았다고 한 결과²²⁾와는 다른 결과를 나타내었다.

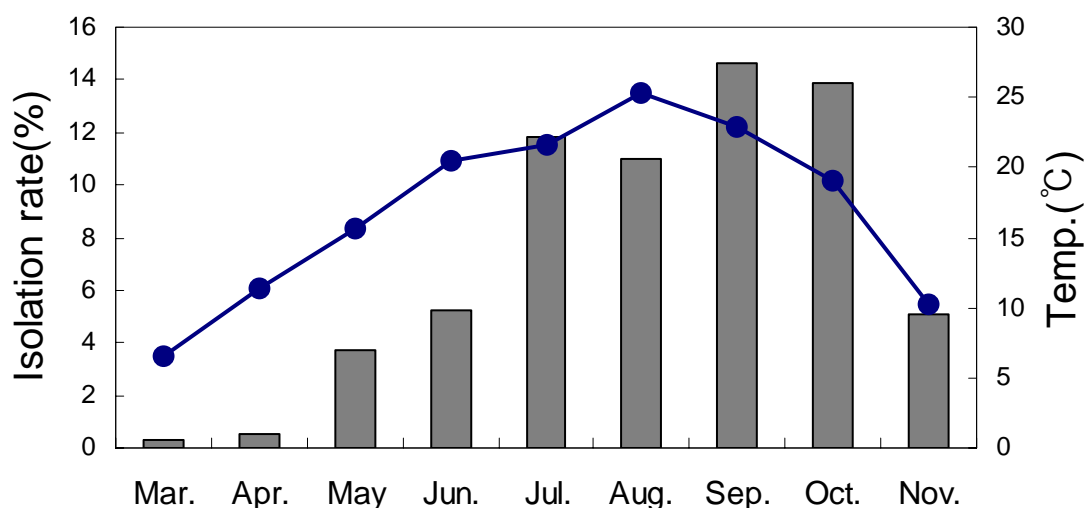


Fig.3. Correlation between isolation rates of *V. vulnificus* and mean temperatures of sea water in Incheon coastal area during the periods from Mar. 2004 to Nov. 2006

4. 항생제 감수성 검사

항생제 감수성 실험을 한 결과 가장 높은 감수성을 보인 항생제는 Ampicillin/sulbactam, Imipenem, Tetracycline, Sulfamethoxazole/trimethoprim 98.3% | 감수성을 보였다. Ciprofloxacin(95.0%), Chloramphenicol(95.6%), Ceftriaxone(94.8%), Gentamycin(94.9%) | 으로나타났다. Cefazolin(46.3%) Streptomycin(40.6%), Cefoxitin (36.6%), Kanamycin (30.0%), Cephalothine(16.7%) . Aminoglycosides | 인 Streptomycin(15.3%) , 1 Cephalosporin Cefazolin(8.5%), Cephalothin(8.3%), 2 | 대 Cephalosporin Cefoxitin(6.7%), 1 | 대 Quinolones Nalidixic acid(6.7%) | 으로나타났다.

보였다(Table 4). 17.1% .
비브리오 패혈증 치료에는 tetracycline 1 항생제의 투여가 권장되고 있으며 Sanford tetracycline
과 cephalosporin Chuang 2은 *V. vulnificus* 감염치료에 cefotaxim
과 minocline .¹⁵⁾ 본 연구에서는 분
리된 균주 대부분이 사용 항생제에 감수성이 높은 것으로 나타났으며, 1 2 대 cephalosporin
제인 Cefazolin(42.3%) 및 Cefoxitin(36.6%) Aminoglycosides Streptomycin(40.6%) 1
비교적 낮은 감수성을 보였다. *V.vulnificus* 감염 치료제로 권장되는 tetracycline(98.3%),
chloramphenicol(95.0%), ciprofloxacin(95.3%) 등의 경우 높은 감수성을 보여 치료제로 사용
가능함을 확인하였다. 대장균의 경우 임상분리균주보다 환경분리균주에서 내성을 나타내는
항생제의 종류가 현저히 적었으며²³⁾, *V. parahaemolyticus*는 큰 차이가 없었다.¹³⁾ 반면, *V.*
*vulnificus*는 ampicillin, ticarcillin, cephalothin 12%, 10%, 2%
인 반면 임상분리균주는 3 .²⁴⁾ 본 연구결과
환경분리균주에서의 내성은 ampicillin 3.3%, ticarcillin 5.0%, cephalothin 8.3% 1는 차이가
있었다.
, 이로 인해 인체에 영향을 미칠 수 있다는 우려가 제기되고 있다. , 내성확산방지를
위해서는 내성세균이 분리된 환자들의 임상 역학적 자료 조사는 물론 항생제 내성 획득에
기여하는 위험요인에 대한 규명이 함께 이루어져야 할 것이다.

Table 4. Antibiotic susceptibility of *V. vulnificus* isolated from Incheon coastal area.

Antimicrobial agent group	Antimicrobial agent	Percentage		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
penicillins	ampicillin	3.3	5.0	91.7
	ticarcillin	5.0	10.0	85.0
β -lactams/ β -lactamase	ampicillin/sulbactam	1.7	0.0	98.3
inhibitors	amoxicillin/clavulanic acid	0.0	8.3	91.7
cephalosporins				
1st generation	cephalothin	8.3	16.7	75.0
	cefazolin	8.5	42.3	49.2
2nd generation	cefoxitin	6.7	36.6	56.7
	cefotetan	5.1	8.5	86.4
3rd generation	ceftriaxone	0.0	5.1	94.9
	cefotaxime	1.7	10.0	88.3
4th generation	cefepime	5.0	3.3	91.7
carbapenem	imipenem	1.7	0.0	98.3
aminoglycosides	streptomycin	15.3	40.6	44.1
	kanamycin	1.7	30.0	68.3
	gentamicin	0.0	5.1	94.9
	amikacin	8.3	6.7	85.0
quinolones				
1st generation	nalidixic acid	6.7	3.3	90.0
2nd generation	ciprofloxacin	1.7	3.3	95.0
others	tetracycline	1.7	0.0	98.3
	sulfamethoxazole/trimethoprim	0.0	1.7	98.3
	chloramphenicol	0.0	5.0	95.0

IV. 결 론

2004년 3월부터 2006년 11월까지 인천연안지역 해수, 갯벌, 생선류, 조개류 총 4,302건의 시료를 채취하여 검사한 결과 310주의 시료에서 *V. vulnificus*가 검출되었으며, 이들 분리균에 대한 시료별, 채취시기별 분포를 조사하였다. 또한, ampicillin, ticarcillin, ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, cefazolin, cefoxitin, cefotetan, ceftriaxone 등 총 21종류의 항생제 감수성 검사를 실시하였다.

1. 시료별로 *V. vulnificus* 분포를 보면, 분리된 31균주 가운데 갯벌에서 59주(23.2%)로 가장 많이 분리되었으며, 해수 98주(12.4%), 생선류 5주(6.7%), 조개류 148주(4.7%)가 분리되었다.

2. 시기별 *V. vulnificus*의 분포와 해수온도의 관계를 살펴보면 해수온도가 6.6℃ 이상인 3월부터 검출되기 시작하여 해수온도가 올라갈수록 검출률이 증가하다가 평균온도가 22.9℃인 9월이 검출률이 가장 높았으며, 평균수온이 10.2℃인 11월 하순까지 분리되었다.

3. Ampicillin/sulbactam, Imipenem, Tetracycline, Sulfamethoxazole/trimethoprim 98.3% | 감수성을 보였다. Ciprofloxacin(95.0%), Chloramphenicol(95.6%), Ceftriaxone(94.8%), Gentamycin(94.9%) :으로 나타났다. Cefazolin(46.3%) Streptomycin(40.6%), Cefoxitin (36.6%), Kanamycin (30.0%), Cephalothine(16.7%) . Aminoglycosides |인 Streptomycin(15.3%) , 1 Cephalosporin Cefazolin(8.5%), Cephalothin(8.3%), 2 |대 Cephalosporin Cefoxitin(6.7%), 1 |대 Quinolones Nalidixic acid(6.7%) :으로 내성을 보였다(Table 3). 17.1% .

참고문헌

1. Hollis, D. G., Weaver, R.E., Baker, C.N., Thronsberry C.: Halophilic, *Vibrio species* isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 3, 425-431, 1976.
2. Famer, J. J.: *Vibrio* ("Benecke") *Vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicaemia and the sea. *Lancet*, 2, 903, 1979.
3. Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., Heublein, P.C.: Disease caused by a marine vibrio. Clinical characteristics and epidemiology. *New England Journal of Medicine*, 300,1-5, 1979.
4. 국연근, 전인기, 김영표: Case for Diagnosis 3예. 대한피부과학회 제 32차 춘계학술대회초록집, 16, 1980.
5. 구정순, 김대원, 한규섭, 석종성, 박명희, 김상인: Lactose fermenting vibrio(*Vibrio vulnificus*) 패혈증 5예. 대한병리학회지, 16, 463-468, 1982.
6. Ju, J. W. K. S. Kim, S. J. Park, S. O. Yoon, and C.R.Jung: Identification of *V. vulnificus* infection in Pusan and Southern Sea of Korea in 1996 using API 20E Kit. *Journal of Korean Society for Microbiology*, 33, 187-94, 1998.
7. 박근태, 박민정, 정초록, 송춘복, 이제희등: 국내 연안에서 분리한 *Vibrio Vulnificus*의 특성. 대한의생명과학회, 14(6), 986-990, 2004.
8. 손진창, 박승우, 민경진: 경북 동해안 환경에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 및 *V. vulnificus*의 생태학적 및 항생제 감수성 특성. 한국환경위생학회지, 29, 2, 94-102, 2003.
9. Levy, S.B.: Factors impacting on the problems of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 25-30, 2002.
10. Sorensen, T.L., Monnet, D.: Control of antibiotic use in the community: the Danish experience. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21, 387-89, 2000.
11. Kummerer, K.: Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobiological Chemistry*, 52, 6-10, 2003.
12. 김명현, 박정임, 김영희, 최경호: 인체용 항생제의 우선관리대상 선정과 물환경 중 오염농도 추정. 한국환경보건학회지, 32, 5, 2006.
13. 이향, 오영희, 최성민, 박석기: 어패류에서 분리한 장염비브리오균의 분포 및 항균제 감수성. 한국보건환경학회지, 33(10), 16-20, 2007.
14. 양성진, , , , , : Microscan Vitek II 시스템을 이용한 *Vibrio vulnificus*의 동정. . 25, 33-38, 2005.
15. : , , , , , , 1996.
16. Ewing, W.H.: Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th, Elsevier Science Publishing Co., New York, 461-476, 1986.
17. Krieg, N. R. and Holt, J.G.: Bergeys's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, 498-506, 1984.
18. : , , , , , , 2005.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard-8th ed, M2-A8, 2003.

20. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility testing: fifteenth informational supplement, M100-S15, 2005.
21. 양호철, 홍석순, 김개환, 최상호, 정희중: 전남해안지역의 비브리오 패혈증균 분포. 산업미생물학회지, 27(1), 70-4, 1999.
22. O'Neill, K.R., S.H.Jones, and D.J.Grims: Seasonal incidence of *V. vulnificus* in the great bay estuary of New Hampshire and Maine. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3257-3262, 1992.
23. Yang-chih, S.D., Chao-Ling, L., Shu-she n, H. AND Jan-Yi, W.: Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from sashimi in the Thipei. *Journal Food and Drug Analysis*, 5, 225-232, 1997.
24. 최연화: 2005년 국내해양환경내 인체병원성비브리오균의 분포실태조사연구. 국내 해양 생태내 인체 병원성비브리오균의 분포실태 조사연구사업 workshop, 201-14, 2006.