pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 5, pp. 381~389 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.5.381

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

제주도에서 분리된 비브리오패혈증균의 독소 유전자 분포 및 항생제 내성

강은옥* · 조만재 · 허예슬 · 고은아
제주특별자치도 보건환경연구원

Prevalence of Toxin Genes and Antibiotic Resistance Profiles of *Vibrio vulnificus* strains isolated from Jeju Island

Eunok Kang*, Man Jae Cho, Ye-Seul Heo, Eun A Koh
Jeju Institute of Health and Environment, Jeju, Korea

(Received July 7, 2023/Revised September 19, 2023/Accepted September 22, 2023)

ABSTRACT - *Vibrio vulnificus*, the most fatal waterborne and foodborne pathogens of 50% fatality rate in the world, is common in seawater and occurs particularly in warmer months. In this study, we investigated the toxin genes using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), antibiotic resistance status using Vitek, and genetic characteristics using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of different *V. vulnificus* strains isolated from the Jeju Island seawater, distribution fishery products, and fish tanks. We examined a total of 487 samples and isolated a total of 46 strains (including overlapping strains) of *V. vulnificus*, 44 strains from seawater and 1 strain each from fishery products and fish tank. We detected toxin gene *vvh*A in all 46 strains and *rtx*A, *viu* in 8 strains (17.4%) and 9 strains (19.6%) strains, respectively. Antibiotic resistance tests indicated 100% resistance to cefoxitin antibiotics. The PFGE analysis of the 46 strains identified a total of 6 types showed 100% homology and the degree of similarity was 81.3–98.0%; however, there were no similarity between the regions and samples. These results indicate that *V. vulnificus* isolated from the seawater, fishery products, and fish tanks should be continuously monitored as cases of food poisoning caused by *V. vulnificus* with toxin genes have been reported in Jeju Island.

Keywords: *Vibrio vulnificus*, Seawater, Toxin gene, PFGE, Antibiotic resistance

비브리오패혈증균[*Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*)]은 그람음성 호염성 세균으로 해수, 강하구, 갯벌, 해산물 등 광범위한 해양 환경에서 서식하고 있는 제3급 법정감염병이다[1,2]. 해수의 온도가 15°C 이상으로 높아지는 초여름부터 늦가을까지 비브리오패혈증균은 활발하게 증식하여 해양환경에 존재한다[3]. 피부의 겉모양이 불에 덴 것 같이 나타난다는 의미로 과거에 괴저병이라고 불렸던 비브리오패혈증은 1981년에 원인균이 *V. vulnificus*라고 밝혀졌고, 1985년에 정식으로 비브리오패혈증으로 명명되었다[4]. 비브리오패혈증 인체감염은 오염된 수산물을 생식하였을 때 발생하는 원발성 패혈증과 상처가 해수에 노출되었을 때 발생하는 창상감염 2가지 임상형태가 있는데, 원발성 패혈증의 경우 사망률이 50% 이상으로 높게 보고되고 있다[5]. 국내에서 주로 원발성 패혈증 발생하는데 수산물을 생식하는 식습관과 함께 만성 간질환 때문에 비브리오패혈증은 여름철에 자주 발생하고 있으며, 간질환, 당뇨병 등과 같은 기저질환을 갖고 있는 환자에 심각한 패혈증을 일으킨다고 보고되고있다[6,7].

1982년에 국내 비브리오패혈증에 감염된 환자가 처음 보고되었고, 질병관리청 감염병 누리집 통계자료에 따르면 2020년부터 2022년까지 3년간 국내에서 비브리오 패혈증에 감염된 환자수는 2020년 70명, 2021년 52명, 2022년 46명이고, 사망자 수는 2020년 25명(35.7%), 2021년 22명(42.3%), 2022년 18명(39.1%)으로서, 사망률은 35.7-42.3%로 나타났다[8,9]. 제주에서는 2020년 1명의 환자가 사망한 이후 비브리오패혈증의 발생은 없었지만 비브리오패혈증균에 감염되면 질병이 진행되는 속도가 매우 빨라 임

*Correspondence to: Eunok Kang, Jeju Institute of Health and Environment, Jeju 63142, Korea
Tel: +82-64-710-6952, Fax: +82-64-710-7549
E-mail: keo1128@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

상증상이 나타난 뒤 평균 4.2일이면 사망할 수 있기 때문에 환자에게 적절한 항생제를 신속하게 투여해야 하는 보건의료상 주의가 필요하다[10,11]. 최근 항생제를 오남용하여 항생제 내성균이 꾸준히 발생함에 따라 비브리오패혈증과 같은 병원성 세균 치료에 사용되는 항생제와 항생제 내성에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다[12,13].

비브리오패혈증의 대표적인 독소유전자로는 *vvh*A, *rtx*A, *viu* 가 있는데, *vvh*A 유전자는 모든 비브리오패혈증균 염색체의 DNA에 존재하고, 용혈작용을 일으키는 독소유전자이며[14], *rtx*A 유전자는 그람음성균이 생성하는 독소인자로 세포독성을 나타내고, *viu* 유전자는 siderophore 생성한다고 알려져 있다[3,15].

또한, 유전자 상동성을 확인하기 위한 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)는 수 년 동안 많은 세균성 감염 일으키는 병원성 세균 특징을 밝히기 위한 gold standard로 활용되고 있는데[16], 세균의 DNA를 제한효소로 처리하여 다각도에서 전기파장을 전달하는 방식의 전기영동으로 균주 간에 높은 유전학적 상관관계를 확인할 수 있는 방법이다[17].

제주지역은 지리적으로 해양환경과 밀접하여 비브리오패혈증균에 의한 감염 위험에 언제나 노출되어 있어, 본 연구에서는 2022년 제주도 내 항·포구 및 수족관물, 수산물에서 분리된 비브리오패혈증균의 독소 유전자와 항생제 감수성 및 PFGE 유전자 상동성 분석을 통해 분자생물학적 특성을 파악하고, 감염병 및 식중독 발생 시 역학조사 자료로 활용하고자 하였다.

Materials and Methods

조사대상 및 대상균주

2022년 2월부터 12월까지 Fig. 1과 같이 도내 항·포구 26개소의 해수를 매월 1회씩 수심 1 m 이내 표층에서 2 L를 채취하여 실험실로 운반한 후 검사를 진행하였고, 도내 전통시장과 마트에서 판매하는 유통 수산물과 수족관물을 대상으로 총 시료 487건을 본 연구에 사용하였다.

해수의 환경요인 측정

해수의 환경요인 중에서 수온과 염도는 Orion star A216 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였고, pH는 Seal analytical (Bltec, Seoul, Korea)을 이용하여 측정하였다. 매월 비브리오패혈증균 검출된 균수와 환경요인 사이의 상관관계는 엑셀에서 추세선을 작성하여 상관관계를 결정하였다.

증균배양 및 DNA 추출

해수와 수족관물의 비브리오패혈증균 증균배양은 Lee 등[18]이 제시한 방법을 수정하여 실시하였다. 해수와 수족관물의 500 mL를 0.45 μm nitrocellulose 여과지(Advantec, Tokyo, Japan)를 사용하여 여과한 후, 여과지를 1%의 NaCl (Samchun chemicals, Pyeongtaek, Korea)이 포함된 Peptone (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 9 mL에 넣어 37°C에서 24시간 증균배양 하였다. 수산물의 증균배양은 식품의약품안전처 식품공전[19] 방법에 따라 실시하였다. 시료 25

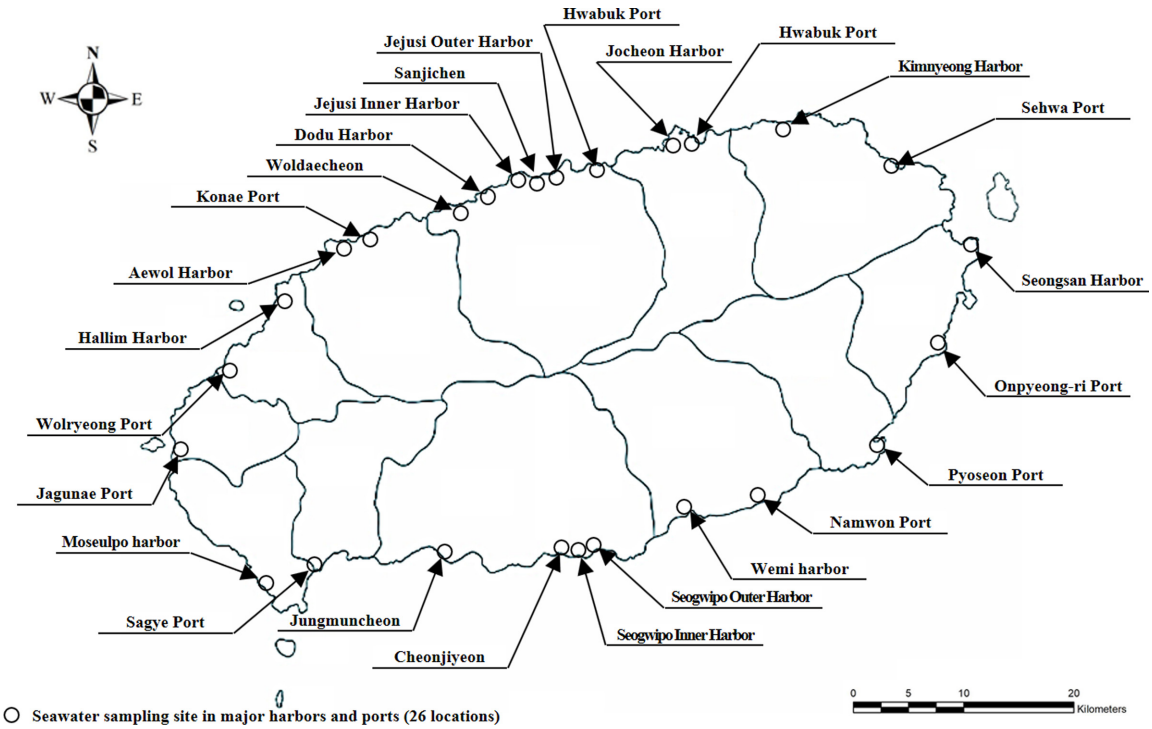

Fig. 1. Sampling point for monitoring *Vibrio vulnificus* in the harbor and port of Jeju.

g을 취하고, 여기에 1%의 NaCl이 포함된 peptone을 가하여 10배 희석액을 만든 뒤 균질화하여 37°C에서 24시간 동안 증균배양 하였다. DNA 추출은 증균액 1 mL를 취하여 13,000 ×g에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였고, 균체 세척을 위해 여기에 멸균증류수 500 μL를 넣어 13,000 ×g에서 5분간 원심분리를 2회 실시하여 배지의 염을 제거하였다. 수집된 균체에 멸균증류수 100 μL를 첨가 후 충분히 혼합 후 100°C에서 10분간 가열하고 13,000 ×g에서 10분간 원심분리 하였으며, 그 상층액을 유전자 증폭을 위한 DNA 주형으로 사용하였다.

독소유전자 확인시험

비브리오패혈증균의 *vvh*A 독소 유전자 검사를 위하여 PowerChek™ Diarrheal *Vibrio* 4-plex Real-time PCR Kit (Kogene biotech Co., Seoul, Korea)로 ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) 장비를 사용하여 유전자 유무를 확인하였다. PCR 반응조건은 제조사 시험법에 따라 50°C에서 2분 반응 후 95°C에서 10분 반응시킨 뒤, 95°C에서 15초 반응 후 60°C에서 1분간 반응 시킨 것을 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 반복하였다. 비브리오패혈증균의 *rtx*A, *viu* 유전자 검출여부는 PowerChek™ 2X Premix strip kit (Kogene biotech Co., Seoul, Korea)을 이용하여, Conventional PCR (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 실험을 진행하였으며, 최종적으로 전기영동을 통해 증폭산물을 확인하였다. 각 PCR 반응 조건 및 프라이머 서열 정보는 Table 1과 같다.

비브리오패혈증균 분리배양 및 동정

비브리오패혈증균 *vvh*A, *rtx*A, *viu* 독소유전자가 검출된 시료는 1% NaCl 첨가한 peptone 증균액을 Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose (TCBS, Becton Dickinson) 배지에 도말하여 35°C, 24시간 배양 후 균체의 집락모양을 관찰, 의심병원체를 선별하고 1% NaCl이 첨가된 Tryptic soy agar (TSA, Becton Dickinson)에 한번 이상 계대하여 Viteck II (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) 및 Maldi-Tof (Bruker, Billerica, MA, USA)를 이용하여 비브리오패혈증균을 최종 동정하였다. 분리된 균주는 CryoCare Bacteria Preservers (KEY Scientific Produsts, Stamford, TX, USA)에 넣어 –72°C deep freezer (ULT-587, GMS, Yangju, Korea)에 보관하였다가 PFGE 등 실험에 사용하였다.

항생제 감수성 검사

비브리오패혈증 균주의 항생제 감수성 실험은 제조사가 제시하는 방법에 따라 AST-N169 card (BioMerieux)와 Vitek II를 이용하여 실험하였다. 분리 보관된 균주를 DensiCHEK instrument (BioMerieux)를 이용하여 McFarland 0.6으로 현탁을 하였다. 균주 현탁액과 Vitek II를 이용하여 비브리오패혈증 균주의 항생제 감수성을 실험하였으며, 감수성, 중간내성 및 내성의 판단은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 기준에 따라 판정하였다[20]. 조사한 항생제의 종류는 ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cefoxitin, imipenem, amikacin, gentamycin, ciprofloxacin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole으로 12종이었다.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 검사 및 분석

분리된 비브리오패혈증균을 대상으로 분리 균주들 간의 유전학적 연관관계의 확인을 위하여 표준화된 국가감시 실험실 방법인 PulseNet 방법(CDC)으로 PFGE를 실시하였다[21]. 1% NaCl이 첨가된 TSA에 접종하여 순수분리된 균을 멸균된 면봉으로 취한 뒤, Cell suspension TE buffer (1 M Tris-HCl; pH 8.0 and 0.5 M EDTA; pH 8.0) 2 mL에 Multi Colorimeter (DR900, HACH, Loveland, CO, USA)을 이용하여 투명도가 20%이 되도록 균을 현탁하였다. 1.5 mL microcentrifuge tube를 균 현탁액 200 μL와 1.2% Seakem gold agarose (Lonza, Basel, Switzerland) 200 μL를 섞은 뒤 바로 plug mold에 넣어 실온에서 15분간 굳혀서 plug를 만들었다. Cell lysis buffer (1 M Tris-HCl; pH 8.0, 0.5 M EDTA; pH 8.0, and 10% sodium-lauroyl sarcosine) 1.5 mL와 proteinase K (20 mg/mL) 50 μL가 들어있는 2 mL microcentrifuge tube에 잘 굳은 plug를 넣고, 진탕 항온수조

Table 1. Primer sequences for detection of *rtx* and *viu* toxin gene in *Vibrio vulnificus*

Gene	Condition			Primers	Primer sequence (5′to 3′)	Size (bp)
	Temperature	Time	Cycle			
*rtx*A	95°C	30 sec	30	*rtx*A F	TCG AAT ACC ACA GCC GTA GC	470
	58°C	30 sec		*rtx*A R	CAC CAT TAA CGC GAG AGC AT	
	72°C	1 min				
viu	95°C	30 sec	35	*viu* F	GGT TGG GCA CTA AAG GCA GAT ATA	505
	58°C	30 sec		*viu* R	CGG CAG TGG ACT AAT ACG CAG C	
	72°C	30 sec				

(SW-90MW, Sang Woo Scientific Co., Bucheon, Korea) 55°C 에서 100 rpm으로 1시간 30분동안 반응시켰다. Screen cap 에 plug를 옮기고 Screen cap을 조립하여 Plug wash TE buffer (1 M Tris-HCl; pH 7.6 and 0.5 M EDTA; pH 8.0)를 PVC tube에 가득 채워서 55°C 진탕항온수조에서 100 rpm 으로 20분간 5회 세척하였다. 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 잘라 *Sfil* (20,000 U/mL) 제한효소(NEB, Ipswich, MA, USA)를 사용하여 50°C 항온수조(LB-WM651, LK Labkorea, Namyangju, Korea)에서 3시간동안 반응시켰다. 전기영동장치(Chef Mapper Power Module, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 0.5 X TBE buffer (Bioneer, Daejeon, Korea) 2 L를 채우고 1.5 M Tiourea (Sigma-Aaldrich, Saint Louis, MO, USA) 1 mL를 첨가하여 14°C가 되도록 하였다. 제한효소 처리가 끝난 plug는 1% Seakem Gold agarose을 이용하여 gel을 만들고, 굳힌 뒤 전기영동장치에 옮겨서 Two-Black으로 전기영동을 하였다. 표준균주 *Salmonella* Braenderup BAA-664를 size marker로 이용하기 위해 *Xbal* (40 U/μL) 제한효소(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 분리균주와 동일하게 실험을 진행하였다. 전기영동이 완료된 후 SYBR™ Gold 염색시약(Invitogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 gel을 20분간 염색하였다. 염색이 끝난 gel을 증류수에 넣고 2시간동안 탈색을 실시하였고, 탈색 후에 Gel-Doc System (Universal Hood II, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 확인하였다. 유전자 상동성 분석은 식품의약품안전평가원 미생물과에 의뢰하여 결과를 얻었다.

통계분석

통계분석은 SPSS Statistics (IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA 분석 후 Duncan의 다중범위 검정을 실시하였다(P<0.05).

Results and Discussion

비브리오패혈증균 분리 및 독소 유전자

총 검사 시료는 486건이었는데, 286건의 해수를 검사한 결과, 44주(15.4%)의 비브리오패혈증균이 분리되었고, 월별 비브리오패혈증균 분리 결과를 보면, 수온이 가장 높았던 8월에 비브리오패혈증균이 16주로 가장 많이 분리되었다. 수족관물은 14건 중 1주(7.1%), 수산물은 187건을 검사한 결과 1주(0.01%)의 균이 분리되었다. 시료 채취 지점 중 분리율이 가장 높은 항·포구는 도두항과 산지천이 각각 6주이고, 천지연이 5주 순으로 분리되었다. 유전자별로는 비브리오패혈증균 44주 중 44주(100%)에서 *vvh*A 유전자가 검출되었고, *rtx*A 유전자는 7주, *viu* 유전자는 9주가 중복으로 가지고 있는 것으로 확인되었다. 수족관물 에서 분리된 비브리오패혈증균의 유전자 확인결과 *vvh*A, *rtx*A, *viu* 유전자를 동시에 갖는 균이 검출되었다. 수산물은 187건을 검사한 결과, 연체류 중 패류에서 비브리오패혈증균이 1주 분리되었고, 검출된 유전자는 *vvh*A 유전자였다(Table 2). Yoon 등[3]은 해수에서 채수한 물에서 분리한 비브리오패혈증균의 100%가 *vvh*A를 보유하고 있었다고 보고하였고, *rtx*A, *viu* 유전자는 각각 81.2%, 88.9%를 보유하고 있다고 보고한 것으로 보아, 지역적으로 독소 유전자 검출 정도는 차이가 있는 것으로 보여진다.

Table 2. Detection rate of toxin gene in *Vibrio vulnificus*

Sample type	Toxin genes profile (%)		
	*vvh*A	*rtx*A	*viu*
Seawater (n=44)	44 (100)	8 (18.0)	9 (20.0)
Fishety products (n=1)	1 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
Fish tank (n=1)	1 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)

해수의 환경요인에 따른 비브리오패혈증균 검사

월별로 해수의 환경요인과 비브리오패혈증균간의 연관성을 알아보기 위하여 수온, 염도, pH를 측정하였는데, 해수의 수온은 측정값 중에서 2월(월대천)에 8.5°C로 가장 낮게 측정되었고, 8월에 30.0°C(한림항 등)로 가장 높게 측정되었으며 평균 19.8°C를 나타내었다. 염도는 9월(김녕항)에 10.48 psu로 가장 낮았고, 2월(표선항)에 54.66 psu로 가장 높게 측정되었으며 평균 46.72 psu를 나타내었고 해수의 평균 pH는 7.88 로 측정되었다. 해수의 비브리오패혈증균 첫 분리는 4월 12일 도두항(17.9°C), 월대천(18.4°C), 서귀포내항(20.2°C)이었고, Baker-Austin C 등[22]에 의하면 비브리오 패혈증균은 해수 온도 18도 이상에서 활발히 증식하는 것으로 알려져 있다는 보고와 일치하였다. 비브리오패혈증균과 환경요인의 연관성을 보면 수온은 양의 상관관계(R^2=0.52)가 있고(Table 3), pH는 음의 상관관계(R^2=-0.52)가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 비브리오속 세균이 해수의 수온과 양의 상관관계에 있고, pH는 음의 상관관계가 있다는 Go 등[24]의 보고와 일치한다. 염도인 경우, 월별 염도 결과와 비브리오균의 상관관계는 없었으나, 비브리오패혈증균의 검출 여부와 염도의 관계는 각각 18.33±9.91 psu와 30.88±9.01 psu로 유의적 차이가 있었고, 이는 Kim 등[25]의 보고와 일치하였다. Kim 등[24]은 비브리오패혈증균은 염도가 15-25 psu에서 균이 잘 자라고, 30 psu 이상부터 균 생육이 감소한다고 보고하였다.

Table 3. Relation of temperature, pH, and salinity on *Vibrio vulnificus* in the seawater of Jeju island

Organisms	Environmental factors		
	Temperature	pH	Salinity
V. vulnificus	R^2=0.52	R^2=-0.52	R^2=-0.01

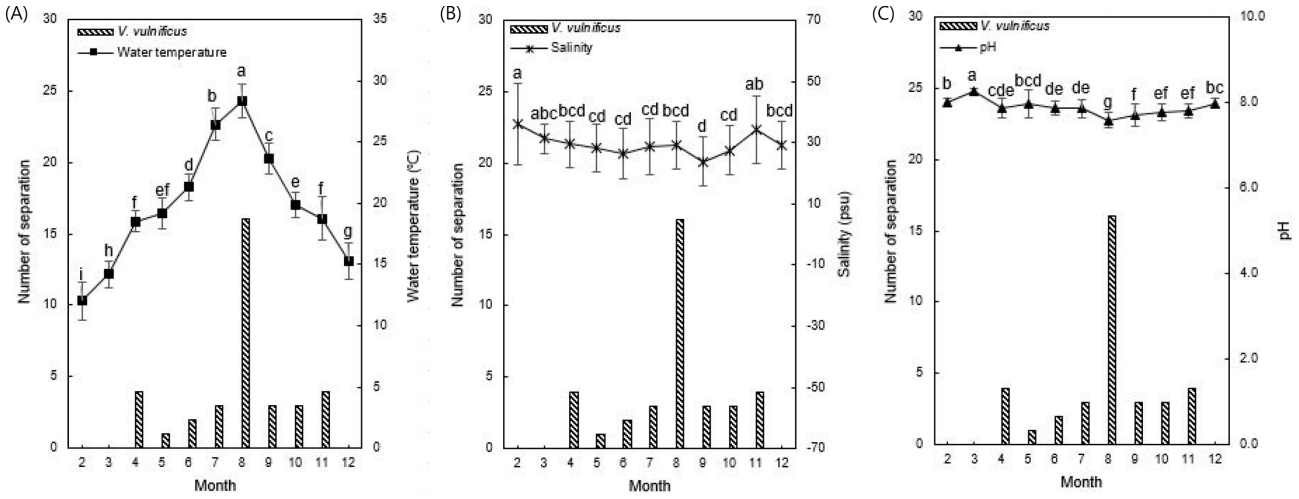

Fig. 2. Water temperature (A), salinity (B), and pH (C) of seawater and quantitative test results of *V. vulnificus* in Jeju area seawater from February to December 2022. Mean±SD. Means with different small letters on the bar indicate significant difference within other months at $P<0.05$.

비브리오패혈증균의 항생제 감수성

비브리오패혈증균에 대한 항생제 내성 실험결과는 Table 4에 나타내었다. 실험결과 cefazolin 항생제에 대하여 분리주 46주 중 42주가 감수성을 4주가 중간내성을 보였고, 실험에 사용된 비브리오패혈증균 46주 모두 chloramphenicol과 tetracycline 등 10종의 항생제에 감수성(susceptibility)을 나타내었다. 가장 많은 균주가 내성을 보인 항생제는 cefoxitin 항생제로서 46균주 중 46균주(100%) 모두 내성(resistance)을 나타내었다. 이는 2014년에서 2015년 전남지역 해수 및 갯벌에서 분리된 비브리오패혈증 균주에 대한 항생제 내성 실험결과 cefoxitin에 85.7% 내성을 나타내었다는 보고와 일치하였다[2]. 현재 수산업에서는 ampicillin에 대한 내성을 보이는 경우가 대부분인 것을 비교해 보았을 때, 해수의 항생제 내성은 수산물로부터의 전달이 아닌, 주변 생활하수 등의 유입에 의한 원인인 것으로 예상된다. 이렇듯 항생제 내성에 관여하는 유전자는 환경에 흔하게 존재하며 농·축·수산업 및 의료계의 항생제 오남용은 환경에서 새로운 항생제 내성 유전자가 나타나는데 기여하고, 인체 병원균은 다시 환경으로부터 항생제 내성을 획득하게 된다. 비브리오패혈증균은 해양환경에 상재하는 비브리오패혈증균이 인체에 기회감염하는 것으로 알려져 있으며 병증이 빠르게 진행되는 특성상 감염 치료시 항생제 선택이 중요하다[25]. 본 연구를 통해 해수에서 분리된 비브리오패혈증균이 잠재적으로 항생제 내성을 나타낼 수 있음을 확인하였으므로, 감염 치료시 항생제 내성까지 고려하여 적절한 항생제를 선택하는 것에 주의가 필요할 것이다.

Table 4. Antimicrobial susceptible of *Vibrio vulnificus* isolates

Class of antibiotics	Antimicrobial agents	No.(%)of isolates		
		Susceptible	Intermediate	Resistant
Penicillins	Ampicillin	46(100)	0	0
β-Lactam combination	Amoxicillin/clavulanic acid	46(100)	0	0
	Ampicillin/sulbactam	46(100)	0	0
Cephems	Cefazolin	42(91.3)	4(8.7)	0
	Cefoxitin	0	0	46(100)
Carbapenem	Imipenem	46(100)	0	0
Aminoglycoside	Amikacin	46(100)	0	0
	Gentamicin	46(100)	0	0
Quinolone	Ciprofloxacin	46(100)	0	0
Tetracycline	Tetracycline	46(100)	0	0
Phenicol	Chloramphenicol	46(100)	0	0
Folate pathway antagonist	Trimethoprim/sulfamethoxazole	46(100)	0	0

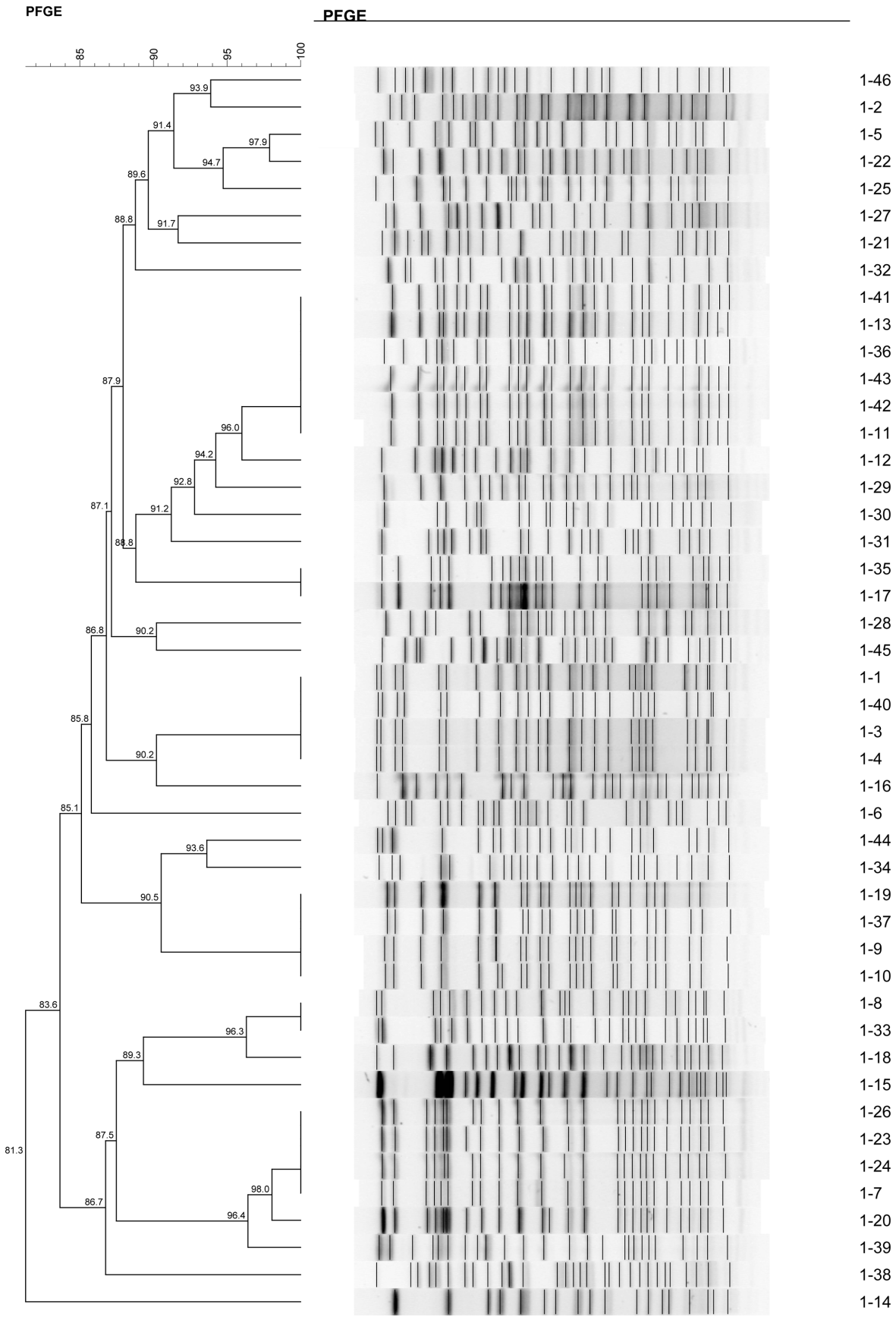

Fig. 3. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *V. vulnificus* isolates.

Table 5. *V. vulnificus* PFGE genotype analysis result

Type	No.	Date	Port	Target gene	homology
A	11	2022.08.09.	Hwabuk port	*vvh*A	100%
	13	2022.08.09.	Sanjichen	*vvh*A	
	36	2022.09.07.	Sehwa port	*vvh*A	
	41	2022.11.14.	Sanjichen	*vvh*A	
	42	2022.11.14.	Hwabuk port	*vvh*A	
	43	2022.11.21.	Aewol harbor	*vvh*A	
B	17	2022.08.09.	Pyoseon port	*vvh*A	100%
	35	2022.09.07.	Kimnyeong harbor	*vvh*A	
C	1	2022.04.12.	Dodu harbor	*vvh*A	100%
	3	2022.04.25.	Sanjichen	*vvh*A	
	4	2022.05.09	Sanjichen	*vvh*A	
	40	2022.10.28.	Sanjichen	*vvh*A	
D	9	2022.07.19.	Sehwa port	*vvh*A	100%
	10	2022.08.09.	Sehwa port	*vvh*A	
	19	2022.08.16.	Seogwipo outer harbor	*vvh*A	
	37	2022.09.26.	Cheonjiyeon	*vvh*A	
E	8	2022.07.04.	Hallim harbor	*vvh*A	100%
	33	2022.08.16.	Hallim harbor	*vvh*A	
F	7	2022.07.04.	Woldaecheon	*vvh*A	100%
	23	2022.08.16.	Cheonjiyeon	*vvh*A, *viu*	
	24	2022.08.16.	Woldaecheon	*vvh*A, *viu*	
	26	2022.08.16.	Dodu harbor	*vvh*A, *viu*	

PFGE에 의한 유전형 분석

2022년 해수에서 분리 동정된 비브리오패혈증균 총 46주를 대상으로 균주간의 유전적 상동성을 알아보기 위하여 PFGE를 수행하였고, 검사결과를 식품의약품안전평가원 미생물과에 분석을 의뢰하여 결과를 얻었다(Fig. 3). PFGE 방법은 균 전체 DNA의 유전자 형태를 모두 비교할 수 있어서 일반적인 전기영동을 이용한 제한효소 분석법과 비교했을 때 분별력과 재현성이 좋고 결과 해석도 용이한 실험방법이다[26]. 분석결과 비브리오패혈증균은 총 6개 type 유형이 100% 상동성을 보이는 것으로 Table 5에 나타났으며, 유사도는 81.3-98.0%로 나타났다. 산지천 및 세화포구 등 채취장소에 따라 100% 상동성을 나타내는 균주들도 있었지만, 전체적으로 지역적인 상동성이 보이지 않았고, 유사도를 찾기는 어려운 것으로 나타났다. Tamplin 등[27]은 임상과 환경에서 분리된 비브리오패혈증균에 PFGE를 실시하였을 때 다양한 유형과 변이를 확인할 수 있다고 보고하였으며, 비브리오패혈증균의 유전자는 종내 다양성이 높음을 확인하였다. 이는 비브리오패혈증 균주가 유전적으로 이질적인 환경균주가 많기 때문인 것으로 추정된다고 보고하였다.

Acknowledgement

본 연구는 제주특별자치도 보건환경연구원 연구사업의 지원으로 수행되었기에 감사드립니다.

국문요약

비브리오패혈증균은 세계에서 치사율이 50%에 달하는 가장 치명적인 수인성식품매개 병원균으로 해수에서 흔히 있으며, 특히 따뜻한 계절에 발생한다. 본 연구는 제주도의 해수, 유통 수산물, 수족관물에서 분리한 비브리오패혈증균에 대해서 RT-PCR을 이용한 독소 유전자, Vitek을 이용한 항생제 내성, PFGE를 이용한 유전적 특성을 조사하였다. 총 487개의 시료를 조사한 결과 비브리오패혈증균 46주(중복 균주 포함)가 해수에서 44주, 유통수산물에서 1주, 수족관물에서 1주 분리되었다. *rtx*A, *viu*와 같은 독소 유전자는 각각 8주(17.4%), 9주(19.6%) 검출되었고, *vvh*A와 같은 독소 유전자는 모든 균주에서 검출되었다. 항생제 내성 실험결과 cefoxitin 항상제에 대해서 100% 내성이 나타났다. 비브리오패혈증균 46주에 대한 PFGE 분석

결과 총 6유형이 100% 상동성을 보였고, 유사도는 81.3-98.0%로 나타났다. 수산물과 수족관물에서 분리된 비브리오패혈증균은 해수와의 상동성 결과 유사도는 불일치로 나타났고 지역과 시료 사이에는 유사성이 없었다. 독소 유전자를 가진 비브리오패혈증균에 의한 식중독 환자가 제주도에서 발생한 점을 고려해볼 때, 해수, 유통 수산물, 수족관물에서 분리한 비브리오패혈증균에 대한 모니터링이 지속되어야 할 것으로 보인다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interests.

ORCID

Eunok Kang https://orcid.org/0000-0003-3897-265X
Man Jae Cho https://orcid.org/0000-0002-0166-4111
Ye-seul Heo https://orcid.org/0009-0000-8466-0417
Eun A Koh https://orcid.org/0009-0009-7733-503X

References

1. Baker-Austin, C., Oliver, J.D., *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environ. Microbiol.*, **20**, 423-430 (2018).
2. Lee, H.A., Ko, Y.E., Choi, J.H., Lee, D.Y., Yeo, S.S., Park, J.J., Lee, M.Y., Choi, J.H., Park, J.H., Distribution and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated in coastal areas of Chungcheongnam-do province. *J. Environ. Health. Sci.*, **47**, 479-485 (2021).
3. Yoon, Y.H., Park, S., Kim, J.Y., Lee, Y.J., Jeon, D.Y., Choi, G.C., Park, J.S., Kim, J.B., Prevalence of toxin genes and profiles of antibitoc resistance in *Vibrio vulnificus* isolates from fish, fish Tanks, and patients. *J. Food Hyg. Saf.*, **35**, 6-12 (2020).
4. Yang, S.J., Kim, H.S., Kwon, J.Y., Chang, S.H., Kim, Y.M., Ecological characteristics of *Vibrio vulnificus* in estuary of Kum River. *J. Food Hyg. Saf.*, **10**, 53-59 (1995).
5. Oh, H.K., Jeong, H.J., Kim, Y.M., Distribution and molecular characteristics of *Vibrio vulnificus* Isolated from seawater along the Gadeok Island coast. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **53**, 688-693 (2020).
6. Oh, B.Y., Kim, J.H., Gong, Y.W., Jegal, S., Kim, H.Y., Lee, M.Y., Hwang, K.W., Koh, Y.J., Lee, J.M., Go, J.M., Kim, Y.H., Characteristics of *Vibrio vulnificus* Isolated in Incheon. *Korean J. Microbiol.*, **43**, 256-263 (2007).
7. Kim, H.S., Heo, S.T., Bae, I.G., Lim, M.H., Kim, J.H., Yun, S.E., Kim, S.J., A case of acute bacterial meningitis caused by *Vibrio vulnificus*. *Korean J. Med.*, **78**, 523-526 (2010).
8. Goo, J.S., Kim, D.W., Han, K.S., Suk, J.S., Park, M.H., Kim, S.I., Lactose fermenting vibrio (*Vibrio vulnificus*) septicemia: report of five cases. *Korean J. Pathol.*, **16**, 463-468 (1982).
9. Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA), (2023, June 24). Infectious disease. Retrieved from https://npt.kdca.go.kr/npt/biz/npp/ist/bass/bassDissStatsMain.do
10. Yang, S.J., Shin, J.H., Cho, D., Kee, S.J., Shin, M.G., Suh, S.P., Yang, D,W., Identification of *Vibrio vulnificus* by the Microscan and the Vitek II systems. *Korean J. Lab. Med.*, **25**, 33-38 (2005).
11. Lee, C.Y., Current insights into sepsis treatments. *Acute Crit. Care*, **25**, 207-211 (2010).
12. Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., Buschmann, A.H., Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.*, **15**, 1917-1942 (2013).
13. Song, J.W., Jeong I.H., Park, S.H., Yun, S.J., Hur, E.S., Kim, Y.S., Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from the west coastal area of Gyeonggi-do. *Korean J. Microbiol.*, **57**, 197-203 (2021).
14. Li, G., Wang, M.Y., The role of *Vibrio vulnificus* virulence factors and regulators in its infection-induced sepsis. *Folia Microbiol.*, **65**, 265-274 (2020).
15. Lo, H.R., Lin, J.H., Chen, Y.H., Chen, C.L., Shao, C.P., Lai, Y.C., Hor, L.I., RTX toxin enhances the survival of *Vibrio vulnificus* during infection by protecting the organism from phagocytosis. *J. Infect. Dis.*, **203**, 1866-1874 (2011).
16. Lopez-Canovas, L., Benitez, M.B.M., Isidron, J.A.H., Soto, E.F., Pulsed field gel electrophoresis: past, present, and future. *Anal. Biochem*., **573**, 17-29 (2019).
17. Jo, M.H., Kim, S.G., Kim, Y.H., Kim, S.T., Eom, H.J., Jang, Y.S., Ko, Y.H., Genotyping of *Brucella abortus* isolated in Gyeongbuk province by PFGE. *Korean J. Vet. Serv.*, **32**, 257-264 (2009).
18. Lee, D.S., Shin, H.Y., Park, K.S., Shin, I.S., Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish at Gomso Bay. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, **52**, 114-120 (2019).
19. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Korea food code, Cheongju, Korea (2021).
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33rd ed., Wayne, PA, USA, 30-52 (2018).
21. Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA), PFGE standard test method, Cheongju, Korea (2022).
22. Baker-Austin, C., Oliver, J.D., *Vibrio vulnificus:* new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environ. Microbiol.*, **20**, 423-430 (2018).
23. Kim, D.M., Hong, S.J., *Vibrio vulnificus* sepsis. *Korean J. Med.*, **82**, 671-679 (2012).
24. Go, Y.J., Jang, J.S., Relationships of pathogenic vibrios and environmental factors affecting their occurrence in the seawater of incheon coastal Area. *Korea J. Food. Nutr.*, **3**, 414-420 (2013).
25. Noh, Y.M., Kim, H.J., Seo, S.R., Lee, D.H., 2020 epidemiologic analysis of *Vibrio* species patients and deaths. *Public Health Wkly. Rep.*, **14**, 1837-1849 (2021).
26. Choi, Y.M., Bae, J.H., Analysis of genetic diversity of *Sal-*

monella Typhi chromosomal genetic diversity analysis using pulsed-field electrophoresis. *Korean J. Clin. Pathol.*, **18**, 343-351 (1998).
27. Tamplin, M.L., Jackson, J.K., Buchrieser, C., Murphhree, R.L., Portier, K.M., Gangar, V., Miller, L.G., Kaspar, C.W., Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3572-3580 (1996).