

뱀머리돌고래, *Steno bredanensis*에서 분리된 *Enterococcus faecium*의 특성

김명석[†] · 최혜승 · 한현자 · 김두남* · 안두해* · 정승희

국립수산과학원 병리연구과, *국립수산과학원 고래연구소

Characteristics of *Enterococcus faecium* isolated from rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*

Myoung Sug Kim[†], Hye Sung Choi, Hyun Ja Han, Doo Nam Kim*, Du Hae An* and Sung Hee Jung

Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

*Cetacean Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Ulsan, 680-050, Korea

Enterococcus faecium was isolated from the internal organs of the rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis* which was stranded at Jeju island. *E. faecium* were isolated from the liver, spleen, kidney, heart and lung up to 1.54×10^6 cfu/g. No significant differences of bacterial enzyme activities between *E. faecium* KCCM 12118 and the isolates were found. Biochemical constellation was the same or similar to that of *E. faecium* KCCM 12118 according to API20 strep. All isolates had the multi-drug resistance to 6 antibiotics by an agar disk diffusion method but these isolates didn't have resistance to chloramphenicol and vancomycin.

Key words : *Steno bredanensis*, *Enterococcus faecium*, Antibiotic resistance

우리나라 연안에는 밍크고래, *Balaenoptera acutorostrata*, 긴부리참돌고래, *Delphinus capensis* 등 35종의 고래류가 분포하고 있다 (Kim *et al.*, 2000; Sohn *et al.*, 2012). 고래류는 먹이사슬의 최상위 포식자로 해양 생태계의 중요한 구성원임에도 불구하고 우리나라에서 고래류 질병에 관한 연구는 거의 이뤄지지 않고 있다.

외국에서는 아쿠아리움에서 사육되는 고래류와 좌초된 고래류를 대상으로 병원체의 감염여부 등이 연구되었고 고래류에서 세균, 바이러스, 기생충, 진균이 분리되었다 (국립수산과학원, 2013). 해산 양식 어류에 연쇄구균증을 일으키는 병원체로 잘 알려져

있는 *Streptococcus iniae*는 아쿠아리움에서 사육되었던 아마존강돌고래, *Inia geoffrensis*에서 처음 분리되어 (Pier and Madin, 1976) 고래류의 질병이 어류의 질병에 영향을 주는 것을 알 수 있다.

뱀머리돌고래, *Steno bredanensis*는 이빨고래류에 속하며 북위 40도와 남위 35도 사이에 분포하고 체장은 최대 2.83 m, 체중은 최대 155 kg으로 알려져 있다 (West *et al.*, 2011). 2012년에 제주도에서 뱀머리돌고래 1마리가 좌초되었고 구조되어 치료를 받는 도중에 폐사하였다. 폐사원인을 조사하기 위해 부검이 실시되었고 죽은 뱀머리돌고래의 내부 장기에서 *Enterococcus faecium*이 분리되었다.

*E. faecium*은 그람 양성, 알과 용혈성 또는 용혈성이 없는 *Enterococcus*에 속하는 세균이고 사람의 장

[†]Corresponding Author : Myoung Sug Kim

Tel: +82-51-720-2481, Fax: +82-51-720-2498

E-mail: fishdoc@korea.kr

내에서 공생하지만 최근에는 신생아의 수막염을 일으키거나 (Ryan and Ray, 2004) 노인에게 폐렴을 일으키기도 하는 것으로 알려졌다 (Kimura and Kobayashi, 2011).

*E. faecium*이 고래류에서 분리된 보고는 없으므로 이번 연구에서는 뱀머리돌고래에서 처음 분리된 *E. faecium*의 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

뱀머리돌고래

2012년 8월 26일에 제주도 김녕 연안에 좌초된 뱀머리돌고래는 치료 과정에서 2012년 8월 31일에 폐사하였고 사체는 냉동보관 후 2013년 2월 18일에 국립수산과학원 고래연구소에서 부검되었다 (Fig. 1).



Fig. 1. The autopsied rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis* which was stranding in Jeju

세균 분리 및 동정

부검시 적출된 뱀머리돌고래의 간, 비장, 신장, 심장, 폐 조직의 정량적 세균 수 분석을 위해 조직과 멸균된 PBS (phosphate buffer saline)를 1:9 (w/v)로 혼합하여 pellet pestle (Sigma, USA)를 사용하여 마쇄하였다. 마쇄된 조직을 PBS로 10 배씩 단계 희석한 후 BHIA (brain heart infusion agar)에 100 μ l를 도말하였고 37 $^{\circ}$ C로 유지된 배양기에서 48시간 동안 배양하여 형성된 집락의 수를 측정하였다.

간, 비장, 심장 시료로부터 각 1 균주씩, 신장과 폐 시료로부터 각 2 균주씩 총 7 균주를 무작위로 선정하였으며 API20 strep kit (Biomérieux, France)와 16S rRNA 염기서열 분석으로 (Wiik *et al.*, 1995) 동정하였다. 16S rRNA 염기서열 분석법은 27f, 1492r primer를 사용하였으며 PCR (polymerase chain reaction) 법으로 세균의 유전자 부분을 증폭한 후 sequencing을 실시하고 GenBank의 Blast 분석을 실시하여 종을 동정하였다.

효소 활성 검사

분리된 세균의 효소 활성은 API ZYM kit (Biomérieux, France)를 사용하여 조사하였으며 표준균주인 *E. faecium* KCCM 12118 (ATCC 19434)와 비교하였다.

항균제 내성 검사

분리된 세균의 항균제 감수성은 CLSI (2006)의 disc diffusion 법으로 8 종류의 항균제, ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, erythromycin, norfloxacin, tetracycline, vancomycin 에 대해 조사하였고 37 $^{\circ}$ C에서 16-24 시간 동안 배양한 후에 저지대 크기를 측정하였다. 항균제 내성의 판정은 CLSI의 *Enterococcus* spp.에 대한 내성 기준에 따라 해석하였고 실험의 정도관리를 위한 대조균주로 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923을 사용하였다.

결과 및 고찰

검사된 뱀머리돌고래는 체장 214 cm, 체중 71.3 kg의 암컷이었고 부검에서 소화가 되지 않은 어류, 뼈와 함께 비닐 등 이물질이 위에서 다량 발견되었다. 뱀머리돌고래의 간, 신장, 비장, 심장과 폐에서 세균이 분리되었다. 분리된 세균의 수는 폐에서 1.54×10^6 cfu/g, 심장에서 5.75×10^3 cfu/g, 간에서 5.13×10^3 cfu/g, 신장에서 4.88×10^3 cfu/g, 비장에서 2.5×10 cfu/g의 순서로 많았다 (Fig. 2).

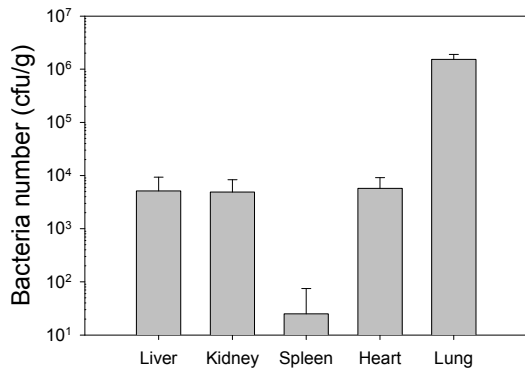


Fig. 2. The number of *Enterococcus faecium* isolated from the rough-toothed dolphin's organs

API20 strep kit는 *E. faecium* 의 동정에 사용되고 있다 (Ham, 2007). 분리 균주의 생화학적 성상은 1 균주의 API 20 strep kit에 의한 생화학적 성상이 표준 균주인 *E. faecium* KCCM 12118과 동일하였고 6 균주는 *E. faecium* KCCM 12118과 달리 αGAL (6-bromo-2-naphthyl-αD-galactopyranoside)가 양성반응을 나타내었으나 (Table 1) 모두 *E. faecium* 로 동정되었다.

Table 1. The biochemical characteristics of *Enterococcus faecium* isolated from rough-toothed dolphin using API20 Strep kit

Bacteria	VP	HIP	ESC	PYR A	αG AL	βG UR	βG AL	PA L	LA P	AD H	RIB	AR A	MA N	SO R	LA C	TR E	INU	RA F	AM D	GL Y
Isolates (n=6)	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Isolate (n=1)	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
KCCM 12118	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-

VP, sodium pyruvate; HIP, hippuric acid; ESC, esculin ferric citrate, PYRA, pyroglutamic acid-β-naphthylamide; αGAL, 6-bromo-2-naphthyl-αD-galactopyranoside; βGUR, naphthol ASBI-glucuronic acid; βGAL, 2-naphthyl-βD-galactopyranoside; PAL, 2-naphthyl phosphate; LAP, L-leucine-β-naphthylamide; ADH, L-arginine; RIB, D-ribose; ARA, L-arabinose; MAN, D-mannitol; SOR, D-sorbitol; LAC, D-lactose; TRE, D-trehalose; INU, inulin; RAE, D-raffinose; AMD, starch(2); GLYG, glycogen

API20 strep을 사용하여 동정된 7개 분리 균주는 16S rRNA sequencing에 의해 *E. faecium*로 재확인되었다. 분리 균주 중에서 2개 균주는 *E. faecium* (accession number JN560903.1)과 100% 일치하였고 3개 균주는 *E. faecium* (JN560903.1), 1개 균주는 *E. faecium* (KC422716.1), 또 다른 1개 균주는 *E. faecium*

(JN560869.1)과 99% 일치하였다.

API ZYM kit에 의한 효소 이용능 확인 결과는 7개 분리균주와 *E. faecium* KCCM 12118이 모두 동일하여 esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β-glucuronidase, β-glucosidase의 활성을 갖고 있었다 (Table 2).

Table 2. The results of API ZYM test with *Enterococcus faecium* isolated from rough-toothed dolphin

Bacteria	API ZYM																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Isolates (n=7)	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
KCCM 12118	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-

1, Control; 2, Alkaline phosphatase; 3, Esterase; 4, Esterase lipase; 5, Lipase; 6, Leucine arylamidase; 7, Valine arylamidase; 8, Crystine arylamidase; 9, Trypsin; 10, α -chymotrypsin; 11, Acid phosphatase; 12, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase; 13, α -galactosidase; 14, β -galactosidase; 15, β -glucuronidase; 16, α -glucosidase; 17, β -glucosidase; 18, N-acetyl- β -glucosaminidase; 19, α -mannosidase; 20, α -fucosidase

분리된 모든 *E. faecium*은 tetracycline, ampicillin, erythromycin, doxycycline, ciprofloxacin, norfloxacin에 내성이 있으나 chloramphenicol과 vancomycin에 대해서는 내성이 없었다 (Table 3). 고래류에서 분리된 *E. faecium*의 항균제 내성은 연구된 것이 없기 때문에 환자에서 분리된 경우와 비교하여 볼 수 있다. 2002년부터 2010년 사이에 대만의 병원에서 치료받은 환자로부터 분리된 *E. faecium*는 3종류 이상의 항균제에 내성을 갖는 다재내성률이 97.8% 이었고 이번 연구에서 사용된 ampicillin에 대해 81.8%, erythromycin에 대해 89.8%, ciprofloxacin에 대해

86.9%, vancomycin에 대해 15.3%의 내성률을 나타내어 (Wang *et al.*, 203) 뱀머리 돌고래에서 분리된 *E. faecium*의 항균제 내성 경향과 유사하였다.

이번에 부검된 뱀머리돌고래는 냉동 보관되어 있었기 때문에 병리조직 검사를 실시하지 못하여 *E. faecium*이 폐사에 직접적인 영향을 주었을 증거를 확보하지 못하였다. 그러나 *E. faecium*이 내부 장기에서 분리 되었고 특히 폐에서 가장 많이 분리 되었으므로 폐 등에서 병리조직학적 변화를 일으켰을 가능성이 높을 것이라고 생각된다.

Table 3. Clear zone diameters (mm) of *Enterococcus faecium* by a disc diffusion method against 8 antimicrobial agents

Antimicrobial agent	Zone Diameter (mm)			Disk content	KCCM 12118	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
	R	I	S									
Tetracycline	≤14	15-18	≥19	30 μ g	0	0	0	0	0	0	0	0
Chloramphenicol	≤12	13-17	≥18	30 μ g	20	19	16	18	20	15	17	19
Ampicillin	≤16	-	≥17	10 μ g	20	0	0	0	0	0	0	0
Erythromycin	≤13	14-22	≥23	15 μ g	14	0	0	0	0	0	0	0
Doxycycline	≤12	13-15	≥16	30 μ g	24	10	11	11	10	11	11	11
Ciprofloxacin	≤15	16-20	≥21	5 μ g	13	0	0	0	0	0	0	0
Norfloxacin	≤12	13-16	≥17	10 μ g	11	0	0	0	0	0	0	0
Vancomycin	≤14	15-16	≥17	30 μ g	23	24	23	25	25	21	23	26

R, resistant; I, intermediate; S, susceptible

*E. faecium*이 살아 있는 어류에서 분리되었다는 보고는 없으나 우리나라 수산물 시장에서 유통되는 건 오징어와 쥐치포에서 검출된 보고가 있어 (Ham, 2007) 해산 어류에도 *E. faecium*이 분포할 가능성이 있으므로 지속적인 분포조사가 필요할 것으로 생각된다.

지금까지 뱀머리돌고래에서 질병이 보고된 경우는 거의 없으며 피부 병변에서 *vetacean poxvirus* (CPV-1)이 분리된 것이 (Bracht *et al.*, 2006) 유일한 보고이다. 이번 연구에서 처음으로 뱀머리돌고래의 폐, 심장, 신장, 비장, 간에서 *E. faecium*이 분리된 결과는 향후 고래류 질병 연구에 활용될 것으로 기대된다.

요 약

제주도에서 좌초된 뱀머리돌고래, *Steno bredanensis*에서 *Enterococcus faecium*이 분리 되었다. *E. faecium*은 간, 비장, 신장, 심장, 폐에서 1.54×10^6 cfu/g까지 분리 되었다. *E. faecium* KCCM 12118과 분리균주 사이의 효소 활성은 차이가 없었고 생화학적 특성은 같거나 유사하였다. 모든 분리균주는 6 종류 항균제에 대해 다재내성을 갖고 있었으나 chloramphenicol 과 vancomycin에 대한 내성은 없었다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원 (수산생물 질병특성 연구, RP-2013-AQ-208)의 지원에 의해 수행되었습니다. 시료 제공에 도움을 주신 고래연구소에 감사드립니다.

참고문헌

Bracht, A.J., Brudea, R.L., Ewing, R.Y., Manire, C.A., Burea, K.A., Rosa, C., Beckmen, K.B., Maruniak, J.E. and Romero, C.H.: Genetic identification of novel poxviruses of cetaceans and pinnipeds.

Arch. Virol., 151, 423-438, 2006.

CLSI: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA. 2006.

Ham, H.J.: *E. faecalis* and *E. faecium* isolated in dried marine products. J. Fd. Hyg. Safety, 22(4), 294-299, 2007.

Kim, Z.G., Lee J.U., Baik, C.I. and Sohn, H.: Whales and dolphins off Korean peninsula. Hangeul Graphics, Busan, Korea, p.133. 2000.

Kimura, Y. and Kobayashi, I.: A case of pneumonia due to *Enterococcus faecium* after near drowning. Kansenshogaku Zasshi. 85(4), 380-383, 2011.

Pier, G.B. and Madin, S.H.: *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta hemolytic *streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 545-553, 1976.

Ryan, K.J. and Ray, C.G.: Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 294-295. ISBN 0-8385-8529-9.

Sohn, H.S., Park, K.J., An, Y.R., Choi, S.G., Kim, Z.G., Kim, H.W., An, D.H., Lee, Y.R. and Park, T.G.: Distribution of whales and dolphins in Korean waters based on a Sighting Survey from 2000 to 2010. Kor. J. Fish Aquat. Sci. 45(5), 486-492, 2012.

Wang, J.T., Chang, S.C., Wang, H.Y., Chen, P.C., Shiau, Y.R., Lauderdale, T.L. and Hospitals T.: High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 75, 406-411, 2003.

West, K.L., Mead, J.G. and White, W.: *Steno bredanensis*

(Setacea: Delphinisae). *Mammalian Species*,
43(1): 177-189, 2011.

Wiik, R., Stackebrandt, E., Valle, O., Daae, F.L., Rodseth,
O.M. and Andersen, K.: Classification of
fish-pathogenic vibrio based on comparative
16S rRNA analysis. *Int. J. Systematic Bacteriol.*,

45: 421-428, 1995.

국립수산과학원 고래연구소: 혼획 · 좌초 고래류의
질병 · 건강 평가 및 관리 방안, 2013.

Manuscript Received : August 23, 2013

Revised : October 31, 2013

Accepted : November 21, 2013