

*Vibrio parahaemolyticus*와 *V. vulnificus* 사람 분리균의 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서의 생존율

임수연* · 김은희†

*해양수산부 운영지원과, 전남대학교 수산생명의학과

Viability of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* isolated from human in cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Su Yeon Im* and Eunheui Kim†

*Ministry of oceans and fisheries, Government Complex-sejong, 94, Sejong-si, 30110, Korea
Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

Vibrio parahaemolyticus and *V. vulnificus* are known to be infected to human via fisheries products. Therefore, food safety of fisheries products is important for public health and fish industry. This paper was conducted to know how well these human isolates can survive in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). The growth of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* showed about 50~60% reduced rates at 25°C than at 37°C and did not show any differences according to NaCl concentration of media except the increasing in the growth of *V. vulnificus* in medium containing 3% NaCl. Artificial infection of 1×10^6 CFU/fish was carried out to confirm the sensitivity of olive flounder against *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. After 1 week from injection, no fish was dead. To evaluate non-specific defense of olive flounder against *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, the antibacterial potency of serum and epidermal mucus were tested. The number of the vibrios exposed to serum obtained from olive flounder significantly decreased after 3 hours, and epidermal mucus showed decrease of the bacteria over than 90% until 12 hours from exposure. Phagocytosis of head kidney leucocytes of healthy olive flounder against *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* showed in over 70% of leucocytes at the 2 hours. Therefore, cultured olive flounder only as vehicle for human pathogen in environmental water is well developed its antibacterial potency against human pathogens, so the viability of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in cultured olive flounder was considered very low.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, Human origin, Viability, Olive flounder

서 론

과도한 육류섭취가 성인병 등 각종 질환의 원인으로 밝혀지면서 어패류의 소비가 증가하였으나

연안 해수의 오염과 수산물의 비가열 섭취로 인한 비브리오의 인체 감염이 종종 발생하므로(KDCA, 2019a; 2020) 수산물의 식품 안전성에 대한 소비자들의 요구를 만족시킬 수 있는 다양한 연구가 필요하게 되었다. 질병관리청 감염병 정보에 따르면 비브리오 패혈증의 발생 건수는 2019년에 42건, 2020년에 70건이었고, 장염비브리오 발생 건수는 2018

†Corresponding author: Eunheui Kim
Tel: +82-61-659-7171, Fax: +82-61-659-7179
E-mail: ehkim@jnu.ac.kr

년의 수인성·식품 매개 감염병 총 발생 697건 중 15건, 2019년에 총 발생 600건 중 5건이었다(KDCA, 2019a; 2020). 한편 질병관리청의 해양 환경 내 병원성 비브리오 실험실 감시 사업에 따르면 해수 시료 중 비브리오 검출 양성률은 패혈증 비브리오가 2019년의 7, 8, 9, 10월 해수에서 각 43% 이상이었으며, 장염비브리오는 5월부터 12월까지 매월 63% 이상으로 나타났다(KDCA, 2019b). 따라서 해수 시료의 비브리오 양성 검출 비율은 비교적 높았지만 사람의 비브리오 감염증의 발생 비율은 그에 비례하여 높다고 볼 수는 없다.

*Vibrio parahaemolyticus*는 장염비브리오로 불리며 장염 환자의 분변뿐 아니라 해수, 어패류, 어류 가공식품 등에서 분리된다(Sakazaki *et al.*, 1963). *V. vulnificus*는 해수, 갯벌, 어패류 등에서 주로 분리되는 해양 상재균이지만 오염된 어패류의 생식이나 피부 상처를 통한 감염으로 비브리오 패혈증을 유발한다(Linkous and Oliver, 1999). 이러한 인체 위해 세균들은 생활하수와 사람의 분변 및 축산 폐수 등의 다양한 경로를 통해 하천, 호수, 바다로 유입된 후, 수산물을 매개로 다시 사람에게서 발병할 가능성이 있다.

넙치, *Paralichthys olivaceus*는 우리나라의 양식장에서 가장 대표적으로 사육되며 고급 횡감으로도 선호도가 높은 어종이다. 수산물에 대한 소비자들의 신뢰를 높이고 식품 안전성을 확보하기 위해서는 수산물을 통해 전파되는 인체 위해성 세균과 수산 생물과의 관련성에 대한 연구가 필요하다. 일반적으로 어류는 체표 점액과 같은 일차 방어 체계를 통하여 병원체의 체내 침입을 방어하므로(Suhalim *et al.*, 2007; Dash *et al.*, 2018) 이러한 방어 체계는 인체 위해 세균의 어류 체내 침투도 저하시켜 어류를 통한 인체 감염의 빈도를 줄일 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 온도와 염분 농도 변화가 사람에게서 분리된 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*의 생존에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고, 이들 세균의 넙치에 대한 감염력과 이들에 대한 넙치 혈청 및 체표 점액의 항균 능력 및 macrophage의 식균 능력을 알아봄으로써 넙치를 통한 인체 위해 세균의 인체 감염 위험성 정도를 평가해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 세균과 배양 조건

본 연구에 사용된 *V. parahaemolyticus* (KCTC 2729)와 *V. vulnificus* (KCTC 2959)는 인체에서 분리한 것으로 생물자원센터(Korean collection for type cultures)로부터 구입하였으며 API 20E 및 20NE (BioMeriux, France)로 분류 특성을 확인한 후 사용하였다. 세균 배양을 위해, 염분 농도별 실험을 제외한 모든 경우에 1% 농도로 NaCl (W/V)이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, BD)와 tryptic soy agar (TSA, BD)를 사용하였다.

온도와 NaCl 농도에 따른 vibrios의 생장도 측정

*V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*의 온도 및 염분 농도 변화에 따른 생장량의 차이를 알아보기 위하여 배양 시간에 따라 생장량을 측정하였다. 시험균을 TSB에 초기 농도가 1.0×10^5 CFU/ml이 되도록 준비하여 24시간 동안 25°C와 37°C에서 진탕배양 하면서 2시간 간격으로 ELISA reader (Spectra Max 340, Molecular Devices) 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 전 배양된 시험 균을 NaCl이 1%, 2% 및 3% 함유된 TSB에 접종하여 25°C에 배양하면서 2시간 간격으로 24시간 동안 흡광도를 측정하여 생장 정도를 비교하였다.

*V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*의 넙치 인위 감염

실험에 사용한 넙치는 전남 완도 소재의 양식장에서 구매하였으며 평균 체중은 167.6 ± 6.4 g, 평균 전장 25.3 ± 1.0 cm이었다. 시험 어는 실내 사육 수조에서 수온 23~24°C로 관리하면서 1일 1회 배설물 및 부유물을 제거하였고 동량의 여과 해수를 보충해 주었다. 실험 전에 넙치의 각 장기로부터 vibrios의 유무를 확인한 후에 각각의 실험 수조에 15마리씩 나누어 수용하고 시험 균을 1.0×10^6 CFU/fish로 복강 주사하였으며 대조군 넙치에는 1% 멸균 식염수를 동량 주사하였다. 7일 동안 유지하면서 수시로 어류의 상태를 확인하였으며 실험 종료 시점에는 모든 어류를 해부하여 내외부의 병변 확인과 혈액, 간, 신장, 비장 등으로부터 균 분리를 시도하였다.

혈청과 체표 점액의 항균작용 측정

혈청의 항균 활성은 Leung *et al.* (1995)의 방법을 응용하여 측정하였다. 넙치를 100 PPM의 MS-222 용액에 3~5분간 침지하여 마취하고 미부 정맥에서 혈액을 채취하여 실온에 2시간 방치하였다. 다시 4°C 냉장고에 하룻밤 방치하여 완전히 응고시킨 후 6000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 0.45 µm pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과하여 혈청 시료로 사용하였다. 또한 마취된 넙치의 체표 수분을 멸균 티슈로 제거하고 슬라이드글라스를 이용하여 체표 점액을 모은 후 2배량의 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)을 첨가하여 마쇄하였다. 균질액을 8000 rpm으로 15분 동안 4°C에서 원심 분리하고 상등액을 취하여 pore size 0.45 µm의 filter (Corning Inc.)로 여과하여 점액 시료로 사용하였다. 시험 균은 TSB에서 37°C로 24시간 배양한 것을 8000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 집균한 후 0.1 M PBS로 3회 세척 후 재 부유시켰다. 세균의 최종농도가 1×10^7 CFU/ml이 되도록 시험 균액과 혈청 및 점액 시료를 1:1의 비율로 혼합한 후 96 well plate에 분주하여 25°C에 배양하면서 혈청의 항균효과는 1, 3시간 경과 후에, 점액의 항균효과는 1, 6, 12시간 경과 후의 생존수로 측정하였다. 통계적 유의성은 SPSS version 28 (IBM)의 프로그램을 이용하여 검증하였다.

신장 macrophage 분리

넙치 두신의 macrophage는 Secombes (1996)의 방법을 응용하여 분리하였다. 넙치(평균 체중 20g, n=5)의 꼬리 부분으로부터 순환 혈액을 최대한 제거한 후 해부하여 두신을 분리하였다. 2% fetal bovine serum (FBS, Sigma Chemical Co), penicillin/streptomycin 100 units/ml (Sigma Chemical Co) 및 heparin 10 units/ml이 함유된 L-15 배지에서 두신을 100 µm nylon mesh (BD Falcon)에 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 34~51% Percoll 용액 (Sigma) 위에 중층한 후 2000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 백혈구 층을 분리하였다. 분리한 백혈구는 L-15 배지 (2% FBS)로 2회 세척하고 0.1% trypan blue로 염색하여 혈구 계산 반으로

계수한 후에 1×10^7 cells/ml로 조정하였다.

Macrophage의 식균율

식세포의 식균율은 Mathews *et al.* (1990)의 방법에 따라, 먼저 세균의 formalin killed cell (FKC)을 제조하였다. TSB로 37°C에서 24시간 배양한 균액에 formalin을 2% (v/v) 되도록 첨가하여 하룻밤 방치한 후 원심 분리(3000 rpm, 10 min)하고 PBS로 2회 세척하여 50 ml PBS에 재 부유 시켜 4°C에 보관하였다. 각각의 FKC 균액 2.5×10^7 CFU/ml와 macrophage 2.5×10^5 cell의 혼합액을 20°C에 배양하면서 1, 2시간 후에 1 ml씩 취하여 얼음에 넣어 반응을 정지시킨 후 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. Pellet은 세척 후 slide glass에 퍼트려 자연 건조 시켰으며 Park *et al.* (2004)의 방법에 따라 Diff-Quick (Sysmex Co., Japan)으로 염색하여 현미경 1000배에서 식균 작용을 한 macrophage 수를 확인하였고 관찰한 총 식세포 수에 대한 비율로 식균율을 계산하였다.

결과 및 고찰

배양 온도와 NaCl 농도에 따른 시험 균의 생장도

*V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*의 생장은 배양 4시간 경과 후부터 37°C에서 큰 폭으로 증가하기 시작하여 최종적으로 25°C에서의 생장량과 비교해 약 50~60%의 차이를 보였다(Fig. 1). 이는 *V. parahaemolyticus*는 15~45°C 사이에서 발육하지만 35°C에서 가장 왕성하게 발육한다고 보고한 Song

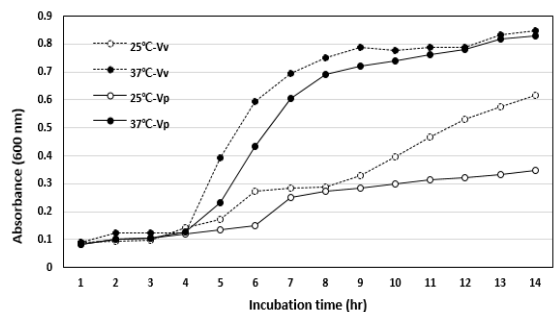


Fig. 1. Growth curve of *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) and *V. vulnificus* (Vv) cultured in tryptic soy broth containing 1% NaCl at 25°C or 37°C.

et al. (2007)의 결과와 유사하였다. Deeb *et al.* (2018)은 미국 남동부 해안의 패류에서 분리된 균들이 수온 16~31°C, 염분 농도 5~22 ppt를 최적 성장 범위로 가졌으며, 기후변화로 인해 수온이 18~33°C, 염분 0~28 ppt 범위가 되면 *V. vulnificus* 농도는 0-58CFU/ml로 온도와 염분도 의존적으로 출현할 것이라는 예측을 하였다. 한편, Jeong *et al.* (2018)은 병원성 비브리오의 증식과 해양 환경 인자와의 상관관계를 조사한 연구에서 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*는 수온 변화에 대해 높은 양의 상관관계를, 염분 변화에 대해서는 높은 음의 상관관계를 보인다고 보고하였다. 그러나 25°C에서 염분 농도를 달리하여 성장량을 비교한 본 연구에서 *V. parahaemolyticus*는 1%, 2% 및 3%의 NaCl을 함유한 배지에서 생장의 차이를 보이지 않았지만 *V. vulnificus*는 1, 2% NaCl 농도 보다 3%에서 증가된 성장을 보여 염분 농도 변화에 따른 음의 상관관계가 형성된다는 이들의 결과와 다소 차이를 보였다(Data not shown). 수온과 염분의 변화는 *V. cholerae*나 *V. parahaemolyticus*와 같은 병원성 비브리오의 증식과 분포에 직접적으로 영향을 끼치며(Xu *et al.*, 2015), 특히 수온의 증가는 3종의 병원성 비브리오(*V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*)에 의한 감염 환자 발생과 관련이 있다고 보고되어있다(Le Roux *et al.*, 2015). 본 연구 결과에서 나타나는 차이는 대부분의 해양 *Vibrio*에 대한 연구가 25°C의 배양 온도를 최고로 하고, 유기물이 첨가되지 않은 인공해수 또는 순수한 NaCl 용액에서 이루어진 것과 달리 본 연구는 유기물이 충분한 배지에서 실시하였기 때문에 나타난 결과의 차이로 생각된다. 따라서 해양 오염으로 인한 해수의 유기물 증가와 수온 상승이 이들 세균의 증식에 미치는 영향에 대한 검토가 필요하다 하겠다.

*V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에 대한 넙치의 감수성

인위 감염 후 7일 동안 감염구와 대조구 모두에서 사망 어류는 발생하지 않았고 실험이 종료된 후 모든 감염구의 넙치를 해부하여 혈액, 간, 신장, 비장에서 균 분리를 시도하였으나 vibrios는 검출되지 않았다(Data not shown). Foua *et al.* (2002)은

어류에 병원성이 있는 *V. vulnificus* biotype 2와 병원성이 없는 biotype 1에 대한 나일틸라피아의 감수성 연구에서 biotype 2는 4×10^4 cfu/fish로 복강 주사 하였을 때 최초 12시간에 사망어가 출현하여 48시간 이내에 50% 이상이 사망하는 데 비해, 비병원성인 biotype 1의 경우 1×10^8 cfu/fish에서도 사망어가 나타나지 않았다고 보고하였다. 이 결과와 비교해 볼 때 본 연구에서는 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*를 1.0×10^6 CFU/fish로 복강 주사한 후 7일까지 사망어가 출현하지 않았으므로 이들 인체 위해성 *Vibrio*는 넙치에 병원성이 없다고 할 수 있다.

혈청 및 점액의 항균 활성

*V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에 대한 넙치 혈청과 체표 점액의 항균활성을 조사한 결과(Fig. 2). 혈청에서 *V. parahaemolyticus*는 노출 3시간째에 약 85%의 균이 제거되어 유의성 있는 감소를 보인 반면 *V. vulnificus*는 노출 3시간째 99.9%가 제거되었으며 1시간 이내에 유의성 있는 감소 결과를 보였다. Foua *et al.* (2002)은 어류에 병원성이 있는 *V. vulnificus* biotype 2의 경우 어류 혈청에서의 생존율이 접촉 후 첫 2시간 이내에 100-200%의 균수를 유지하였으며 추가 2시간 이내에 1000%까지 균수가 증가하는 반면, 비병원성인 biotype 1의 경우 생존율이 70% 정도까지 높은 것을 보여주었다. Leung *et al.* (1995) 또한 어류 혈청에서 세균이 생존할 수 있는 능력은 병원성 세균과 비병원성 세균을 구별할 수 있는 중요한 지표가 될 수 있으며, 비병원성 *Aeromonas hydrophila*가 틸라피아의 혈청에서 급격히 감소하는 반면에 병원성 *A. hydrophila*는 지속해서 생존한다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에 대한 넙치 혈청의 항균 능력은 매우 높은 것으로 평가된다.

한편 체표 점액에서 *V. parahaemolyticus*는 6시간째 약간의 균수 증가가 있었으나 12시간째 감소하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. *V. vulnificus*는 6시간 후에 증가하는 경향을 보이긴 했으나 초기 균수에 비해 6시간, 12시간째 모두 통계적으로 유의성 있는 감소를 보였다. 체표 점액에서 항균 능력이 낮게 나타나긴 하였으

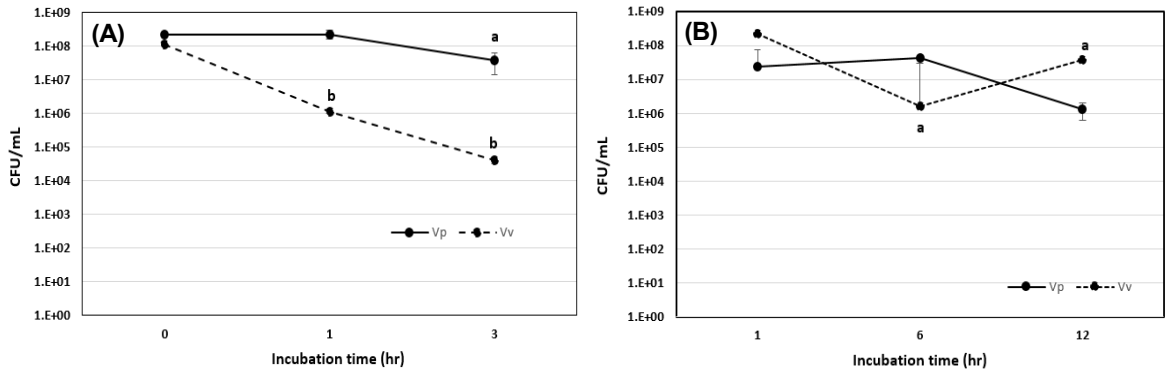


Fig. 2. The numbers of *Vibrio parahaemolyticus* (Vp; Solid line) and *V. vulnificus* (Vv; Dotted line) survived in mixed culture with serum (A) and skin mucus (B) prepared from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Lowercase letters a and b indicate significant differences between start and incubation time at $P < 0.05$.

나 실험에 사용한 점액 시료가 원액보다 1/3로 희석하여 준비된 것을 감안하면 생존한 어류에서는 충분한 방어력을 나타낼 것으로 판단된다. Suhalim *et al.* (2007)은 catfish의 점액과 인체병원세균인 *Escherichia coli* O157:H7 E318 cells와의 관계에 관한 연구에서 catfish 점액의 항균 효과가 12시간까지 유지된다는 결과를 보고하였다. 어류의 병원체에 대한 방어로는 특히 항체 생산과 더불어 체표 점액 및 식균세포 등에 의한 비특이적인 방어 작용이 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Aranishi and Mano, 2000; Findlay and Munday, 2000). 본 연구에서 *V. vulnificus*가 체표 점액에서 6시간 이후부터는 군수가 증가하는 경향을 보였으나 혈청과 체표 점액 모두 12시간까지는 항균력을 유지하면서 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*의 초기 침투를 방어하고 있는 것으로 판단되었다.

신장 macrophage 식균율

넙치 두신 macrophage의 *V. parahaemolyticus*에 대한 식균율은 평균 1시간에 61%, 2시간에 78%, *V. vulnificus*에 대해서는 1시간에 78%, 2시간에 88%로 나타났다(Fig. 3). 병원체가 숙주에 감염되면 macrophage는 병원체를 비 특이적인 식작용으로 제거함으로써 초기 면역 반응에 중요한 역할을 담당한다(Secombes, 1996). Gu *et al.* (2021)은 다른 척추동물에서와 같이 넙치에서도 macrophage의 활성을 촉진하는 macrophage colony-stimulating factor

(MCSF) 유사 인자가 나타남을 보고하였다. 이는 넙치 조직에 널리 분포하고 있지만 특히 혈액, 근육, 두신에 많이 분포하면서 침입한 병원체의 형태에 따라 다양한 양상으로 마크로파아지의 활성을 촉진시켜 병원체를 방어하는데 *in vivo*에서는 MCSF에 대한 receptor가 면역반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 넙치의 두신 백혈구는 인체 위해성 vibrios에 대해서 1~2시간 이내에 식작용에 의한 병원균 제거 능력을 보이는 것으로 판단되었으나, Gu *et al.* (2021)의 연구에 비추어 볼 때 이와 같은 결과가 *in vivo*에서도 동일하게 나타날 것인지에 대한 연구는 추가로 보완되어야 할 문제로 여겨진다.

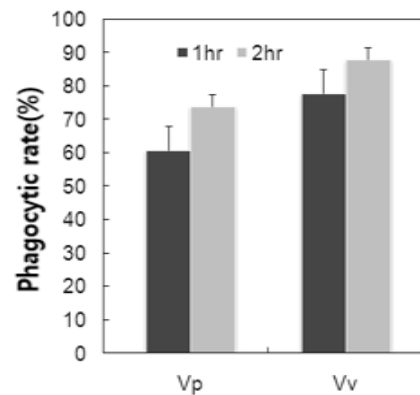


Fig. 3. Phagocytic rate of macrophages isolated from head kidney of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) or *V. vulnificus* (Vv).

이상의 결과로 볼 때, 넙치는 해양의 인체 위해 세균인 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에 대하여 단순 이동 매개체로 작용할 수 있다 할지라도 넙치 양식장의 온도 및 염분 농도 조건에서 이들 균의 생장률은 저하되고, 더불어 넙치가 보유하고 있는 비특이 면역 방어 시스템이 인체 위해성 vibrios의 수를 유의성 있게 감소시킴으로써 넙치를 통한 vibrios의 인체감염 가능성이 저하되는 효과를 준다고 평가된다.

요 약

*Vibrio parahaemolyticus*와 *V. vulnificus* 같은 인체 위해성 세균들은 수산물을 통하여 인체에 감염되는 것으로 알려져 있음으로 생선회로 선호도가 높은 넙치에서 이들 세균이 어느 정도 생존 가능한지 알아보고자 하였다. 먼저 온도와 염분 농도가 다른 배지에서 이들 세균의 생장도를 조사하였다. 37°C에서 보다 25°C에서 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*는 약 50~60% 감소한 생장률을 보였다. 그러나 1%, 2% 및 3% NaCl을 함유한 배지로 25°C에서 배양하였을 때의 생장은 3% NaCl을 함유한 배지에서 *V. vulnificus*가 증가된 생장을 보인 것을 제외하고 차이는 없었다. *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에 대한 넙치의 감수성을 알아보기 위하여 1×10^6 CFU/fish로 복강 주사하여 인위 감염을 하였으나 1주일간 사망 개체는 없었다. *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에 대한 넙치의 방어능력을 알아보기 위하여 넙치의 혈청 및 체표 점액에서의 세균 생존력과 신장에서 분리한 macrophage의 식균 활성을 알아보았다. 혈청에서는 3시간 이내에 각각 85%, 99% 이상의 균이 제거되었고 체표 점액에서는 12시간까지 세균 수가 감소하였으며 신장 백혈구는 약 70% 이상에서 식균 작용을 나타냈다. 따라서 넙치는 환경 수에 있는 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에 대한 단순 이동매개체로 작용한다 할지라도 발달된 자체 항균력으로 이들 세균의 수를 감소시켜 인체 감염 가능성을 저하하는 효과가 있음을 시사하였다.

References

- Aranishi, F. and Mano, N.: Response of skin cathepsins to infection of *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder. *Fisheries Sci.*, 66: 169-170, 2000.
- Dash, S., Das, S.K., Samal, J. and Thatoi, H.N.: Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *IJVR*, 19:72-81, 2018.
- Deeb, R., Tufford, D., Scott, G.I., Moore, J.G. and Dow, K.: Impact of climate change on *Vibrio vulnificus* abundance and exposure risk. *Estuaries and Coasts*, 41:2289-2303, 2018.
- Findlay, V.L. and Munday, B.L.: The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmon salar* L. *J. Fish Dis.*, 234:369-378, 2000.
- Foua, B., Alcide, E., Barrera, R. and Amaro, C.: Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). *Aquaculture*, 212:21-30, 2002.
- Gu, H., Wang, H., He, J. and Hu, Y.: Macrophage colony stimulating factor (MCSF) of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): Immunoregulatory property, anti-infectious function, and interaction with MCSF receptor. *Develop. and Com. Immunol.*, 116:103920, 2021.
- Jeong, Y.I., Myung, G.E., Choi, E.J., Soh, S.M., Park, G.J. and Son, T.S.: Distribution of pathogenic vibrios in the aquatic environment adjacent to coastal areas of South Korea and analysis of the environment factors affecting their occurrence. *J. Environ Health Sci*, 44:133-142, 2018.
- KDCA (Korea Disease Control and Prevention Agency): Epidemiological investigation of infectious disease in Republic of Korea annual report, pp.21-23, 2019a. <https://www.kdca.go.kr>
- KDCA (Korea Disease Control and Prevention Agency): Distribution of pathogenic vibrios in the aquatic environment adjacent to coastal areas of South Korea. 2019b. <https://www.kdca.go.kr/npt/biz/npp/portal/nppVbStatsMain.do>
- KDCA (Korea Disease Control and Prevention Agency): Infectious disease surveillance yearbook, pp. 82-87, 2020. <https://www.kdca.go.kr>
- Linkous, D.A. and Oliver, J.D.: Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Letter*, 174:207-214, 1999.
- Le Roux, F., Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., et al.: The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). *Front.*

- Microbiol. 830(6), 2015.
- Leung, K.Y., Yeap, I.V., Lam, T.J. and Sin, Y.M.: Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. J. Fish Dis., 18:511-518, 1995.
- Mathews, E.S., Warinner, J.E. and Weeks, B.A.: Assays of immune function in fish macrophages. In Techniques in Fish Immunology, pp. 155-163, Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and van Muiswinkel, W.B., SOS Publications, NJ, 1990.
- Park, S.W., Kim, D.W. and Choi, M.S.: Application of a commercial Diff-Quick kit for fish hematology. J. Fish Pathol., 17:151-157, 2004.
- Sakazaki, R., Iwanami, S. and Fukumi, H.: Studies in the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria. *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. Jap. J. Med. Sci. Biol., 16: 161-188, 1963.
- Secombes, C.J.: The nonspecific immune system; cellular defenses. In The fish immune system; Organism, Pathogen and Environment, pp. 63-103, Iwama, G. and Nakanishi, T., Academic press, London, 1996.
- Song, M. K., Kim, M. C. and Heo, M. S.: Study on the distribution of *Vibrio parahaemolyticus* along Cheju coast. Korean J. Environ. Biol., 25:34-41, 2007.
- Suhalim, R.R., Huang, Y.W. and Chen, J.R.: Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 E318 cells with the mucus of harvested channel catfish (*Ictalurus punctatus*). LWT- Food Sci. Technol., 40:1266-1270, 2007.
- Xu, F., Ilyas, S., Hall, J.A., Jones, S.H., Cooper, V.S., Whistler, C.A.: Genetic characterization of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* from the Northeast USA reveals emerging resident and non-indigenous pathogen lineages. Front. Microbiol. 272(6), 2015.

Manuscript Received : Nov 12, 2021

Revised : Nov 29, 2021

Accepted : Jan 12, 2022