

## 국내 연근해 및 환자로부터 분리된 *Vibrio vulnificus*의 세균학적 특징

신광훈 · 신영학\* · 이종삼

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과

\*국립 보건원 미생물부 세균과

국내 연안의 어패류, 해구 및 환자 등으로부터 *Vibrio vulnificus*를 분리동정하여 생화학적 특성, 성장조건, 혈청형, 약제 감수성 시험 등 세균학적 특성을 밝혔다. *V. vulnificus*균의 생화학적 특성은 유당을 발효(95%)하고 서당은 발효(4%) 않은 균주가 대부분이었으며, ornithine 발효능, gelatine 액화능, mannitol 분해능 등이 다른 연구자들과 동일한 결과를 나타내지 않았다. 따라서 이들 성상이 *V. vulnificus* 동정에 그리 유용하지 않다. o 혈청형은 자연계 분리균주의 경우 o2 혈청형이 제일 많았고(24%) 환자 분리균주의 경우 o4군(42%)이 제일 많았다. *V. vulnificus*의 최적 성장조건은 염농도는 3-6‰였고, 온도는 25-35°C, pH는 8로 나타났다. *V. vulnificus*균은 chloramphenicol, erythromycin, tetracycline, ampicillin에 높은 감수성을 지니고 있었고 gentamycin에 대하여는 내성을 가진 것으로 나타났으며, 자연계 분리균주가 환자 분리균주보다 이들 항생제에 더 높은 감수성을 지니고 있었다. chelating agent EDTA가 *V. vulnificus*에 대하여 성장억제효과가 있음이 밝혀졌으나 치사적으로 작용치는 않았다.

**KEY WORDS** □ *Vibrio vulnificus*, biochemical properties, serotype, growth requirement, drug susceptibility

*Vibrio* 속군 30 여종 가운데 인체 병원균은 전통적인 *V. cholerae*와 *V. parahaemolyticus*를 비롯하여 *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V. damsela* 및 *V. vulnificus* 등이 알려져 있다(19, 25, 27, 29, 31). 이들 병원체 중에서 *V. vulnificus* 균은 창상 및 경구 감염에 의한 치명적인 피부괴사 및 패혈증을 주로 일으키는 특이적인 임상 감염양상을 나타내며 사망율이 50-80%로 대단히 높다(3, 18).

우리나라의 경우 *V. vulnificus* 감염증에 대한 보고는 비교적 근년의 일로서 1979년 해안지방의 "원인 모를 피부괴사"이란 병명으로 소개되어 국내 의학계에 주목을 받기 시작한 때부터이며, 미생물학적으로 최초로 확인된 것은 1980-1981년 사이 5명의 패혈증 환자로 부터 *V. vulnificus* 분리 예를 보고한 구정순 등(2)에 의해서이다.

*V. vulnificus*는 Farmer(26)에 의해 명명 되기전에는 *V. parahaemolyticus*균의 변이균주로 의심되다가 Weaver와 Ehrenkenz(54) 그리고 Hollis 등(31)에 의하여 lactose fermenting vibrio로 분리되었으며 한때 *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas*, *Pleisomonas shigelloides* 및 *Serratia* 등으로 잘못 동정되었다(14).

미국의 경우 *V. vulnificus*의 생화학적 시험 결과 사람과 자연계에서 분리된 균주 중 O-nitrophenyl-β-

D-galactopyranoside(ONPG)시험, 유당이나 서당에서 산생성능 그리고 *V. vulnificus*를 감별하는 중요 성상이 균주에 따라서 차이가 있음이 보고되었다(27, 40). 그러므로 *V. vulnificus*를 인체 및 자연계에서 분리, 생화학적으로 동정하는데 많은 문제점이 있다. 따라서 환자의 정확한 진단이나 치료, 역학적 조사를 위한 *V. vulnificus*의 세균학적 특성의 규명은 대단히 중요하다.

*V. vulnificus* 감염의 임상 양상은 창상 감염과 경구 감염으로 구분되는데 창상 감염의 경우 잠복기가 약 12시간이며 치사율은 7-12%로 알려져 있으며 정상인에서는 기존의 상처를 통해 오염 해수와 접촉하거나 계에게 물린 상처와 조개, 굴 등을 채취하다가 난 상처 등을 통해 감염되는 특징을 갖는 반면(20, 28), 경구 감염은 잠복기가 16시간이며 치사율이 40-60%이고 병증이 급격히 진전되며 만성 간질환을 갖고 있는 40세 이상의 남자에게 주로 발생하는 경향을 나타내고 있다(40, 44).

*V. vulnificus*의 경구 감염시 패혈증을 발생시키는 병인은 일단 *V. vulnificus*가 감수성있는 환자의 구강을 통하여 소장에도달하면 장관벽을 뚫고 직접 혈류속으로 들어가 증식하여 전형적인 패혈증을 발생시키는 것으로 알려져 있다(40, 43). 패혈증에 의한 사망기전은 손상된 혈관으로부터 혈장성분이 주위조직으로 삼출되어 나오므로 그 결과 초래된 저혈압성



(American Type Culture Collection)로 부터 분양 받은 *V. vulnificus* C7184, ATCC 27562 및 ATCC 29306을 공시하였다.

## 2. *V. vulnificus*의 동정

### 1) 생화학적 동정 시험

자연계 및 환자로부터 분리한 *Vibrio*균속의 생화학적 동정시험은 Cowan과 Steel(24), Bauman 등(17), Farmer 등(27) 및 West와 Brayton 등(55)의 방법을 병용하여 *V. vulnificus*균을 동정하였다. 생화학적 시험에 이용된 각 배지에는 NaCl을 1% 농도가 되도록 첨가하였다. 생화학적 동정시험에 사용된 주요배지로서 감별배지는 제조자의 지시서에 따라 제조된 triple sugar iron agar(TSI, Difco), MR-VP medium(Difco), malnate broth(Difco), Christensen urea agar(Difco), arginine dihydrolase와 lysin 및 ornithine decarboxylation 시험을 위한 Moeller(36)의 decarboxylase base(Cifco)에 1% L-arginine monohydrochloride, L-lysine dihydrochloride 또는 1% L-ornithine dehydrochloride이 첨가된 배지 및 pH 7.5인 0.01 M sodium phosphate buffer 1.000에 O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(ONPG) 6 gm을 넣고 여과멸균한 용액 250 ml와 가압멸균된 1% APW(pH 8.4 $\pm$ 2) 750 ml를 섞어 제조한 ONPG 배지 등이며 운동성과 indol 생성능은 sulfide indole motility(SIM, Difco)배지를 사용하였다. 탄수화물에서의 산생성 시험용배지는 enteric fermentation base(Difco)에 각종 탄수화물을 1% 농도로 넣어서 제조하였으며 시험방법은 평판배지상에서 자란 유사집락을 백금으로 취하여 각 배지에 접종한 후 18-48시간 동안 35°C에서 배양한 후 육안으로 판독하였다. 생화학적 시험후에는 제조된 *V. vulnificus* H-항혈청으로 응집시켜 혈청학적으로 재확인 동정하였다.

### 2) *V. vulnificus*의 H-항혈청에 의한 동정시험

항혈청 생산용 균주: H-항혈청 생산균주로 *V. vulnificus* ATCC 27562주를 사용하였다.

편모의 정제: 시험균주를 motility GI 배지(Difco)에 3회 계대 배양하여 운동성을 증가시킨 후(52) modified MOF 배지(49)에 증균하였으며 이를 Roux bottle의 TSA(2%NaCl pH 7.2)표면에 접종하여 48시간 동안 배양하였다. 배양된 균은 생리식염수로 채취하여 2회(3,000 rpm, 20분) 세척하였다. 침전된 균을 완충액(0.1 M Tris(pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 0.001% thimerosal)으로 부유시킨 후 진탕기로 3분간 고속진탕시켰다. 진탕액을 다시 10,000 X g 로 2시간 동안 원심하여 상층액을 취한 후 상층액을 30,000 X g 로 2시간동안 원심하여 crude flagella를 얻었다. crude flagella를 Tris-EDTA 완충액(0.1 M Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.8)에 부유시키고 15 gm의 CsCl<sub>2</sub>(Sigma)를 첨가시켜 39 ml가 되도록 한 후 이 용액을 SW-38 rotor(Beckman)를 사용 64,000 X g로 44시간동안 밀도 구배 초원심분리 후 flagella band를 확인한 후 분회회수기를 이용하여

채취하였다(58). 채취된 편모층은 Tris-EDTA 완충액으로 하루밤동안 4°C 조건에서 투석하였고 전자현미경으로 관찰하였다. 단백질 정량은 편모층액을 0.1 ml 취하여 증류수에 10배 희석한 후 50% trichloroacetic acid를 가하고 100°C에서 15분 열처리를 하고 냉각시켜 단백질을 원심침전(1,400 Xg 이상)시킨 후 1 N NaOH, 용액을 넣어 용해시켰다. 이것을 전량 Kjeldahl flask로 옮겨 촉매제(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : CuSO<sub>4</sub>=9:1)를 넣은 후 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml 을 가해 2-3시간동안 가열 분해시키고 냉각시켰다. 내용물은 증류수를 사용하여 micro-kjeldahl 분해장치에 옮겨준 후 30% NaOH 6 ml 넣어 증류시키며 증류된 액은 4% boric acid를 5 ml 넣은 flask에 받았다. 이것을 지시약(brom cresol green 0.3 g, methyl red 0.2 g/90% ethanol 400 ml)을 한 두 방울 넣은 후 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 적정하였다. 단백질함량은 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액의 소비량으로 구하였다(4). 순수정제된 편모는 82,000 Xg로 4시간 동안 원심, 침전물을 얻은 후 0.067 M PBS로 4시간 동안 원심, 침전물을 얻은 후 70°C 최저온냉동기에 보관, 면역용 항원으로 사용하였다(33).

H-항혈청의 제조: 0.067 M PBS 0.5 ml/당 flagella protein을 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 및 100 g이 포함되도록 희석하여 3일 간격으로 2.5-3.0 Kg의 백색가토(Newzealand albino white rabbit)에 10-12회 정맥주사 또는 피하주사하여 면역하였다. 최종 면역 후 5-10일째 채혈하여 항혈청을 얻었다(33).

H-항혈청의 응집 및 교차응집시험: 면역생산된 H-항혈청의 O 및 H항원에 대한 동종 응집 및 교차응집시험은 Tassin 등(52) 방법에 준하여 2배 계단희석 *V. vulnificus* 및 인체병원성 *Vibrio*속 9종의 참조균주를 대상으로 시험하였다. 즉 생산된 H-항혈청을 PBS(pH 7.2)로 10 X 75 mm 시험관에서 1:10 또는 1:100 부터 계단희석한 후 면역용항원 균부유액을 제조하는 방법으로 제조한 균부유액(530 nm, 10 IU)을 동량 각 시험관에 넣어 51°C에서 18시간동안 반응시킨 후 판독하였다.

*V. vulnificus* 분리균주의 혈청학적 동정시험: 생화학적으로 동정된 자연계 및 환자 분리균주를 대상으로 탁도가 조정된 항원액(530 nm, 10 IU)과 동종 응집가의 1/2이 되도록 PBS로 희석된 항혈청을 동량 가하여 51°C에서 18시간 반응시킨 후 응집여부를 판독하였다.

## 3. O 혈청형 시험

1) 생산용균주: O 항혈청 생산용균주로는 *V. vulnificus* ATCC 27562(serogroup o1)와 일본 국립방위생연구소의 Shimada로부터 분양받은 혈청군 o1에서 o9 및 R strain을 사용하였다.

항혈청 제조: 생산용균주를 3% NaCl TSA 고체 배지에 접종하여 35°C로 18-24시간 배양하였다. 순수 배양된 이들 균주를 PBS(0.01 M pH 7.2)로 부유시킨 후 Roux bottle의 TSA표면에 접종하여 35°C로 18-24

시간 배양후 PBS로 채취하여 100°C에서 2시간 가열 flagella를 파괴시켰다. 이를 2회 원심세척한(3,000 rpm, 20분) 후 얻어진 균을 PBS로 부유시켜 600 nm에서 흡광도를 OD 1.5(Colman junior II type, spectrophotometer)로 조정후 면역용항원으로 사용하였다. 이들 항원을 백색가토에 4일 간격으로 0.5, 1, 2 및 4 ml 씩 정맥주사한 후 면역 완료일부터 6일째 채혈. 분리된 혈청을 56°C에서 30분간 가열처리하였다(47).

O 항혈청의 시험관내 응집가 시험: 항원용액은 3% NaCl TSA 고체배지에서 배양하여 면역용항원 균부유액을 제조하는 방법으로 준비하였다. 항혈청은 56°C에서 30분간 비동화한 후 생리식염수로 0.5 ml/가 되도록 2배 계단희석하였다. 이 혈청희석액을 가하고 50°C 항온수조에서 18시간 반응시킨 후 응집여부를 관독하여 최종 응집을 보인 혈청희석배수를 항체가로 하였다. R 항원에 대한 응집가시험은 R 항원의 자가응집반응을 방지하기 위하여 증류수에 부유시킨 후 생리식염수로 희석시킨 항원액(530 nm, 10 IU)과 계단 희석된 항혈청과 동량으로 반응시켰다(47).

2) R 항체의 흡수: 생산된 O 항혈청에 존재하는 R 항체의 제거는 100°C에서 2시간 가열한 R 항원부유액을 생리식염수로 3회 세척하여 얻은 침전물에 항혈청을 부가, 50°C 에서 30분간 반응시킨후 -4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 3회 원심분리한 후 상층액을 분리 R 항체를 흡수하고 10% sodium azide 1-2방울을 떨어뜨려 O grouping 항혈청으로 사용하였다(47).

3) *V. vulnificus* 분리주의 O 혈청형 동정: 생화학적 반응과 *V. vulnificus* H-항혈청으로 확인 동정된 자연계 및 환자 분리균주를 대상으로 동종 O 응집가의 1/2이 되도록 PBS로 희석된 항혈청을 면역용항원 균부유액을 제조하는 방법으로 준비된 항원에 동량 부가하여 50°C 항온수조에서 18시간 반응시킨 후 응집여부를 관독하여 O 혈청형을 동정하였다(47).

#### 4. 생장 특성

##### 1) 시험균주

1986년 미국 CDC에서 분양받은 *V. vulnificus* C 7184, 환자 분리균주 1주(1A9-p-22) 및 자연계 분리균주(1A7-2-27) 1주를 사용하였다. 이들 시험균주들은 Oliver와 Cowell(42)이 사용한 three salt 용액(KCl 0.75 gm, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 7.9 gm, NaCl 23.4 gm/liter DW)에 protease peptone 0.1%, yeast extract 0.1% 및 한천 1.5%를 첨가한 modified salt water-yeast extract agar 사면배지에 보관하면서 각 실험에 사용하였다.

##### 2) 내염도와 균증식과의 관계

증식용 배지인 1% APW 15 ml에 NaCl을 최종농도가 0, 3, 6, 8, 및 10%씩 되게 조제하여 멸균시켜 사용하였다. 이 배지에 2.5%의 NaCl이 첨가된 BHI 고체배지에서 하룻밤 배양된 균을 채균하여 균농도를 McFarland No. 1 표준탁도관에 맞추고 50 μl 씩 접

종하여 증식여부를 관찰하였다. 다만 염도와 균증식과의 관계 시험에는 분리균을 모두 공시하였다.

##### 3) 온도의 영향

*V. vulnificus* 생장에 가장 좋은 염도로 알려진 2.5%의 염도를 갖도록 2%의 NaCl이 보강된 BHI 액체배지에 시험용 *V. vulnificus*을 접종한 후 Temperature gradient Bio-photorecorder TN-112D형(Toyo KaGaKu Sangyo CO., LTD)를 이용하여 각각 4, 25, 35 및 42°C 의 조건으로 진탕배양하면서 660 nm에서 증식양상을 관찰했다.

*V. vulnificus* 접종은 시험균주를 2.5% NaCl BHI 고체배지에서 하룻밤 배양하고 2.5% NaCl BHI 액체배지에서 6-8시간 배양한 후 PBS로 세척하고 균농도를 McFarland No. 1 표준탁도에 맞추어 BHI 액체배지 15 ml에 50 μl 씩 접종하였다(14).

##### 4) pH의 영향

pH를 4, 6, 8 및 10까지 조정된 2.5% NaCl BHI 액체배지에 *V. vulnificus*를 접종. Temperature gradient Bio-photorecorder를 이용 35°C조건으로 진탕배양하면서 이들 균의 증식양상을 보았다. 균집중은 온도에 따른 균증식곡선 변화 측정기와 동일한 농도량을 접종하였다.

#### 5. 약제 감수성 시험

##### 1) 시험균주

1985-87년 사이에 어패류 등 자연계 분리균주 46주, 환자로부터 분리된 25주 및 미국 CDC에서 분양받은 *V. vulnificus* C7184를 시험대상으로 하였다.

##### 2) 항생제 감수성 시험

항생제: 임상에서 널리 사용되고 있는 tetracycline (TC), ampicillin(AM), gentamycin(GM), chloramphenicol(CM) 및 erythromycin(EM) 등 5종을 공시하였다.

최소발육억제농도(minimal inhibitory concentration: MIC) 측정: MIC 측정시험은 Müller Hinton 액체배지를 사용한 표준 microdilution 방법(15, 39)을 변형한 Morris 등(38)의 방법을 준용하였다. 다만 본 실험에서는 균배양시 진탕배양을 하지않았다. 육안으로 균증식여부를 관찰, 균이 발육하지 않은 농도를 최소발육억제농도(MIC)로 하였다.

##### 3) chelating agent의 영향

chelating agent: *V. vulnificus*에 살균작용이 있다고 알려진 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)(9, 13)와 각종 음료에 신맛을 내는데 널리 사용되는 2가 양이온 chelating agent인 구연산(56)을 사용하였다.

MIC 측정: 항생제의 MIC 측정 방법과 동일한 방법으로 시행하였다. 다만 EDTA 및 구연산 수용액의 pH가 균생장에 영향을 미치지않게 하기 위하여 pH를 7.2로 조정하여 시험하였다.

chelating agent 첨가에 의한 균생장량의 변화: 1% NaCl이 첨가된 Müller-Hinton 배지에 pH 7.2가 되도록 조정된 chelating agent를 MIC 농도가 되도록 가한 후, (4) pH의 영향 시험시와 동일한 탁도와

**Table 1.** Distribution and number of *V. vulnificus* isolates from the patients with vibrio septicemia.

Areas	No. of isolates at the month (%)										Total
	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Seoul				2( 8)	1( 4)	3(12)					6(24)
Kyungki					1( 4)	1( 4)					2( 8)
Incheon						1( 4)					1( 4)
Chunam			1( 4)	7(28)	4(16)						12(48)
Chunbuk				2( 8)							2( 8)
Pusan					2( 8)						2( 8)
Total			1( 4)	11(44)	8(32)	5(20)					25(100)

**Table 2.** Age distribution of the patients with *Vibrio* septicemia.

No. of isolates	No. of isolates at the age group (%)					Total	
	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70		71-80(yrs.)
		2(8)	11(44)	8(32)*	3(12)	1(4)	25(100)

\*One strain isolated from female patient with septicemia.

**Table 3.** Number of *V. vulnificus* isolates from marine sources during 1986-1987.

Coastal areas	Specimen	No. of sucrose negative suspected <i>Vibrio</i> species	No. of <i>V. vulnificus</i> isolates (%)
Inchon	51	47	3( 6.5)
Kunsan	427	317	14(30.5)
Makpo	33	24	3( 6.5)
Haenam	58	34	4( 8.7)
Wando	15	11	
Kangjin	71	61	10(21.8)
Yeosu	57	39	3( 6.5)
Chungmu	27	16	1( 2.2)
Masan	64	59	3( 6.5)
Pusan	35	25	3( 6.5)
Ulsan	30	21	
Pohang	30	21	
Ulsjin	16	11	
Samchuk	25	18	
Donghae	43	30	2( 4.3)
Kangreung	17	13	
Jumunjin	26	19	
Total	1025	766	46(100)

방법으로 균을 접종, 35°C에서 Temperature gradient Bio-photorecorder를 이용하여 진탕배양하면서 균생장변동곡선을 그렸다. 시험균주는 *V. vulnificus* C7184, 환자 분리균주 1주(1A9-P-22) 및 자연계 분리균주 1주(1A7-2-27)를 대상으로 하였다.

### III. 결 과

#### 1. 균 분리율 및 지역적 분포

##### 1) 환자 분리균주

국내 비브리오패혈증 환자로 부터 분리된 *Vibrio vulnificus* 균주는 Table 1에 나타난 바와 같이 총 25주로 서울이 6주, 경기, 전북 및 부산이 각 2주, 인천 1주, 전남 12주로 전남이 전체의 48%였다. 또한 *V. vulnificus*가 분리된 환자의 발병시기를 분석하여 본 바 주로 6-9월 중에 집중적으로 발행한 것으로 나타났다으며 7월중에는 11명으로 전체의 44%를 차지하였다.

성별 및 연령별 분포는 Table 2에 나타난 바와 같이 환자의 96%가 남자였으며 40세 이상 남자가 22명으로 전체의 88%나 되었다. 특히 40-60세 연령층이 19명으로 가장 많은 환자 발생연령층이었다.

##### 2) 자연계 가검물

어패류, 해수 및 estuarine water 등 가검물은 Table 3에 나타난 바와 같이 1,025건으로 부터 *V. vulnificus*균은 46주 분리하였다. 이들을 지역별로 보면 서해안 20주(인천 3주, 군산 14주, 목포 3주), 남해안 24주(해남 4주, 당진 10주, 여수 3주, 총무 1주, 마산 3주, 부산 3주), 그리고 동해안 2주였다. 또한, 총 1,025건의 가검물 중에서 sucrose음성균이 분리된 가검물은 766건(75%)였으며 이 중에서 46주가 *V. vulnificus*균으로 분리 동정되었다.

*V. vulnificus*균이 분리된 가검물을 보면 Table 4와 같이 꼬막에서 9주, estuarine water 및 피조개에서 각 6주, 해수에서 5주, 바지락에서 5주, 새우 및 낙지에서 각 3주였다. *V. vulnificus*균의 월별 분리율은

**Table 4.** Source and number of *V. vulnificus* isolated from marine areas.

Collected areas	No. of specimen from the sources										
	Sea water	Estuarine water	Aquarium sea water	Sediment	Ark shell ( <i>Anadora granosa</i> )	Oyster	Short necked clam ( <i>Macrua veneriformis</i> )	Shirimp	Small octopus	Ark shell ( <i>Scapharca broughtonii</i> )	Total (%)
Inchon	1		1+1*								3
Kensan		4	1+1*	1	4		1			2	14
Makpo	1				1					1	1
Haenam	1	2							1		4
Kangjin				1	3	1	2	2		1	10
Yeosu				1		1			1		3
Chungmu			1								1
Masan	1								1	1	3
Pusan					1		1	1			3
Donghae	1										1
2											
Total (%)	5	6	3+2*	3	9	2	4	3	3	6	46(100)

\*: isolated from chopping board in the restaurant.

**Table 5.** The biochemical reactions of *V. vulnificus* isolated from patients or marine sources.

Test of substrate	Patient		Marine	
	Sign	%	Sign	%
Indole	+	100	+	94
Voges-Proskauer	-	0	-	0
Motility	+	95	+	100
Gelatine	+	100	+	100
Lysine decarboxylase	+	100	+	100
Arginine dihydrolase	-	0	-	0
Ornithine decarboxylase	+ or -	72	- or +	44
Glucose acid	+	100	+	100
Galactose	+	100	+	100
Manitol	+	100	+ or -	83
Salicin	+	100	+	100
Arabinose	-	0	-	0
Xylose	-	0	-	0
Trehalose	+	100	+	100
Cellobiose	+	100	+	100
Nitrate to nitrite	+	100	+	100
Beta-Galactosidase (ONPG)	+	100	+	100
Oxidation-fermentation	F	100	F	100
Catalase	+	100	+	100
Oxidase	+	100	+	100

+ : 90% or more positive, - : no reacton(90% or more)  
 + or - : most cultures positive; some strains negative  
 - or + : most strains negative; some cultures positive.  
 F: fermentation

**Table 6.** Fermenting activity of isolated strains for lactose and sucrose.

Sources of isolate	No. of isolate	Fermentation group (%)			
		Lactose		Sucrose	
		+	-	+	-
Patient	25	21(95)	4(5)	4(5)	21(95)
Marine	46	39(84)	7(16)	0(0)*	0(0)

\*: collected from green colony on the TCBS.

4월에서 2주, 5월에서 2주, 6월에서 5주, 7월에서 9주, 8월에서 19주, 9월에서 10주 및 10월에서 1주가 분리되어 수온이 높은 6월에서 9월 사이에 집중적으로 분리되었다. 이 결과는 Fig. 1에 표시하였다.

**2. 분리균주의 생화학적 반응 성상**

자연계 및 환자로부터 분리한 *V. vulnificus*균의 생화학적 성상은 Table 5와 같다. *V. vulnificus*균 동정에 중요한 생화학적 시험 성적은 환자 분리균주의 경우 Voges-Proskauer(VP) 음성(0%), lysine 양성(100%), arginine 음성(0%), nitrate reduction 양성(100%), cellubiose 양성(100%), salicine 양성(100%), ONPG 양성(100%)으로 나타났고, Table 6에서와 같이 서당 양성균이 4%였으며 운동성이 없는 균도 1주 있었다. 자연계 분리균주의 경우에는 VP 음성(0%), lysine 양성(100%), salicine 양성(100%), ONPG 양성(100%)으로 환자 분리균주와 동일한 반응 성적을 보였으며 자연계 분리균주의 경우 TCBS상에서 청녹색 집락은

**Table 7.** H- and O agglutination titers of *V. vulnificus* strains reacted with the H-antiserum of *V. vulnificus* ATCC 27562.

Antigens	Antisera(ATCC 27562)	
	O-titer	H-titer
ATCC 27562	1:<20	1:10240
ATCC 29306	1:<20	1:10240
ATCC 29307	1:<20	1: 2560
C7184	1:<20	1:10240
Obutcher	1:<20	1:10240
H3308	1:<20	1:10240
o9889	1:<20	1:10240
C2756	1:<20	1:10240
C8806	1:<20	1:10240
E2272	1:<20	1:10240
E4125	1:<20	1:10240

**Table 8.** H- and O agglutination titers of *Vibrio* species reacted with the H-antiserum of *V. vulnificus* ATCC 27562.

Antigens ( <i>Vibrio</i> species)	Antisera(ATCC 27562)	
	O-titer	H-titer
<i>V. fluvialis</i> ATCC 33809	1:<20	1:<20
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 27519	1:<20	1:<20
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	1:<20	1:<20
<i>V. hollisae</i> ATCC 33564	1:<20	1:<20
<i>V. furnissii</i> ATCC 35016	1:<20	1:<20
<i>V. cholerae</i> ATCC 14035	1:<20	1:<20
<i>V. damsela</i> ATCC 33539	1:<20	1:<20
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	1:<20	1:<20
<i>V. metschnikovii</i> ATC 7708	1:<20	1:<20

대상으로 시험하였기 때문에 sucrose 양성 균주는 없었다. 그 외 indol 생성, ornithine 발효, mannitol 분해 및 유당 발효능 등이 환자 분리균주와 자연계 분리균주 사이에서 약간의 차이를 관찰할 수 있었다. Oliver(41), Hollis(32), Farmer(27) 및 West(55) 등이 밝힌 생화학적 성장과 본 연구에서 나타난 생화학적 반응성상을 비교하면 ornithine 발효능, gelatine 액화능, 그리고 mannitol 발효능에 있어서 다소 차이가 있었으며 그 외 결과는 유사하였다.

**3. H-항혈청 응집가 및 교차응집성**

*V. vulnificus* ATCC 27562균에서 분리정제된 flagella로 면역, 생산한 H-항혈청을 미국 ATCC사, Oliver교수(North Carolina University) 및 CDC에서 분양받은 10종의 *V. vulnificus*로 H-응집가를 시험한

**Table 9.** Agglutination titers of O-antiserum against various homologous and R antigens.

Serogroups	Antigens	Agglutination titers	
		Homologous cell	R cell
o1	ATCC 27562	1:1,280	1: 40
o2	D3894	1: 640	1 80
o3	E240	1:2,560	1: 40
o4	1115-80	1:2,560	1: 80
o5	E-571	1:1,280	1: 320
o6	91-81	1:1,280	1: 160
o7	1333-80	1:1,280	1: 40
o8	TS-1	1:1,280	1: 80
o9	TS-2	1: 640	1: 40
Common OR strain		1:1,280	1:1,280

**Table 10.** Agglutination titers of O-antiserum against various homologous and R antigens after absorption of homologous O-antigen.

Serogroups	Antigens	Agglutination titers	
		Homologous cell	R cell
o1	ATCC 27562	1:1,280	1: 20
o2	D3894	1: 80	-
o3	E240	1: 640	-
o4	1115-80	1:1,280	-
o5	E-571	1: 640	-
o6	91-81	1: 640	-
o7	1338-80	1: 640	1: 10
o8	TS-1	1: 640	1: 20
o9	TS-2	1: 320	-

결과 Table 7에서 보는 바와 같이 *V. vulnificus* ATCC 29307주와는 2560 X의 응집가를 보였고 그외 균종과는 10240 X의 높은 응집가를 나타내었으며 동종 H 응집가도 10240 X로 다른 *V. vulnificus* 참조균주와 차이를 보이지 않았고 O 응집가는 10종의 *Vibrio* 균 모두 20 X이하를 나타내었다. *V. vulnificus*가 아닌 인체병원성 *Vibrio* 균 9종과 *V. vulnificus* H-항혈청과의 교차응집가를 시험관 희석법으로 측정하였던 바, Table 8에서 보여주는 바와 같이 H 및 O 응집가 모두 20 X이하를 나타내어 종특이성이 있음을 확인할 수 있었다.

시험관 H-응집시험에 의한 혈청학적 시험결과는 생화학적으로 동정된 자연계에서 분리한 *V. vulnificus* 균주와 모두 응집반응을 보여 *V. vulnificus* 균임을 재확인할 수 있었으며, 환자 분리균주 25 균주 중에는 운동성이 없는 균주만이 응집반응을 나타내지 않았다.

**4. O 항혈청의 응집가 및 O 혈청형**

Shimada로 부터 분양받은 *V. vulnificus* 혈청균 o1

**Table 11.** Serogroups of *V. vulnificus* isolates by O-antisera.

Serogroups	No. of isolates		Total (%)
	Patient	Marine	
o1	1	0	1( 1.4)
o2	6	15	21(29.6)
o3	3	5	8(11.3)
o4	11	5	16(22.5)
o5	0	3	3( 4.2)
o6	0	5	5( 7.0)
o7	3	5	8(11.3)
o8	0	3	3( 4.2)
o9	0	0	0
Not grouped	1	5	6( 8.5)

에서 o9까지 및 R 항원으로 부터 생산한 O 항혈청에 대하여 100°C, 2시간 처리하여 제조된 항원으로 반응시킨 동종 O 및 R 항원의 응집은 Table 9에 표시한 바와 같다.

동종 O 응집가는 Table 9에서 보는 바와 같이 혈청군 o2가 640 X로 제일 낮았고, 혈청군 o3 및 o4가 2560 X로서 640-2560 X 범위의 응집을 보였다. R 항원에 대한 응집가는 혈청군 o1, o3, o7 및 o9이 40 X였고 o5가 320 X로 제일 높아 40-320 X의 응집가를 나타내었다.

생산된 항혈청을 공통항원(R 항원)으로 1회 흡수 후 동종 O 응집가 및 R 항원응집가를 측정된 결과를 Table 10에 나타난 바와 같이 혈청군 o2가 80 X, 혈청군 o1 및 o4가 1280 X로 80-1280 X 범위의 응집가를 나타내었다.

환자 및 자연계로 부터 분리된 *V. vulnificus* 71군주에 대한 생산된 O 항혈청과 시험관 응집반응 시험으로 혈청군을 분류한 결과는 Table 11에서 보는 바와 같이 환자 분리군주의 경우 대부분 o2군(24%)과 o4군(42%)에 속하였으며, o1, o3 및 o7군에 속하는 군주는 각각 1주, 3주, 및 3주로 나타났고, o5, o6, o8 및 o9군으로 분류된 군주는 1주도 없었다. 자연계 분리군주의 경우 o2군이 6주(33%)로 가장 많았고 o3, o4, o5, o6, o7 및 o8군에서 각각 5주, 5주, 3주, 5주, 5주와 3주로 나타났고 o1군과 o9군은 한 군주도 검출되지 않았으며 어느 0 혈청군과도 반응하지 않은 군주는 환자 분리군주에서 1주, 자연계 분리군주에서는 5주였다.

Table 12은 자연계에서 분리된 46군주의 가검물에 대한 혈청군별 분포를 나타낸 것으로 해수에서 o2, o3 및 o6군에 속하는 군주가 각각 6주, 5주, 5주로 나타났고, estuarine water에서는 o2에 속하는 군주가 2주, 굴에서 군이 속하는 군주가 2주, 꼬막 및 바지락에서 o2군에 속하는 군주가 5주, 피조개에서 o4 및 o5군에 속하는 군주가 각각 3주가 분리되었고, 위생업소 가검물(수족관 해수 및 도마)에서 o2, o4, o7

**Table 12.** Distribution of serogroups in marine isolates.

Serogroups	No. of isolates					Total (%)
	Seawater	Estuarine water	Oyster	Shellfish	Restaurant*	
o1						--
o2	6	2		5	2	15(32.5)
o3	5					5(10.9)
o4				3	2	5(10.9)
o5				3		3( 6.5)
o6	5					5(10.9)
o7			2		3	5(10.9)
o8					3	3( 6.5)
o9						
Not grouped	5					5(10.9)
Total	21	2	2	11	10	46(100)

\*: aquarium water and chopping board at the restaurant

**Table 13.** Effect of NaCl concentration on the growth of *V. vulnificus* isolates.

Sources of isolate	Concentration(%) of NaCl					No. of tested
	0	3	6	8	10	
Patient (%)	0	25(100)	22(88)	0	0	25
Marine (%)	0	46(100)	38(82)	5(11)	0	46



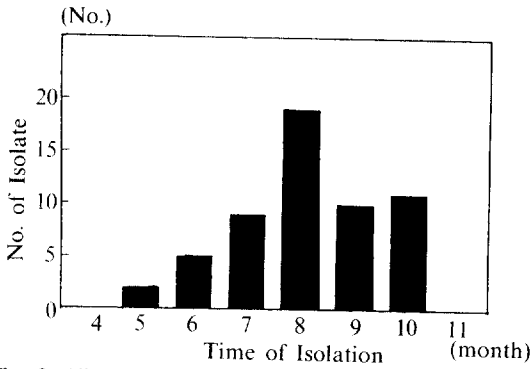


Fig. 2. Histogram of monthly frequency of *V. vulnificus* isolation from marine sources during 1985-1987.

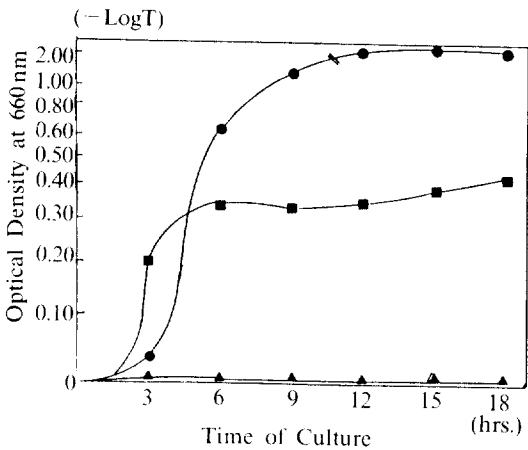


Fig. 3. Effect of pH gradients on the growth of *V. vulnificus* C7184 strain.  
 △: pH 4, ■: pH 6, ●: pH 8, ▲ pH 10.

및 o8군에 속하는 균주가 각각 2, 2, 3 및 3주가 검출되었다.

5. 염도, 온도 및 pH가 균생장에 미치는 영향

염 농도에 따른 성장여부를 시험한 결과는 Table 13에 나타난 바와 같이 3% NaCl 농도에서는 환자 분리균주 및 자연계 분리균주가 현저히 증식하였고 NaCl 0% 및 10%에서는 성장하지 않았다. 특이하게도 환자 분리균주는 8%의 식염농도에서는 성장하지 않았으나 자연계 분리균주 46주 중 5주(11%)는 성장하였다.

pH에 따른 *V. vulnificus*의 성장곡선의 변화는 Fig. 2, 3 및 4에 표시되었다. 시험에 공시된 C7184, 1A9-p-22 및 1A7-2-27주 모두 약산성(pH 6.0) 및 약알칼리(pH 8.0)의 범위에서는 생장이 이루어졌으며 강산(pH 4.0) 및 강알칼리(pH 10.0)에서는 균증식이 이루어지지 않았다. 다만 자연계 분리균주인 1A7-2-27에서는 pH 10에서도 18시간이 경과한 후부터 균생장이 이

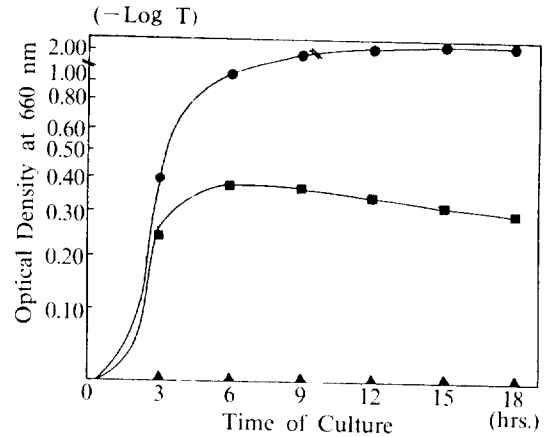


Fig. 4. Effect of pH gradients on the growth of *V. vulnificus* 1A7-p-22 strain.  
 △: pH 4, ■: pH 6, ●: pH 8, ▲: pH 10.

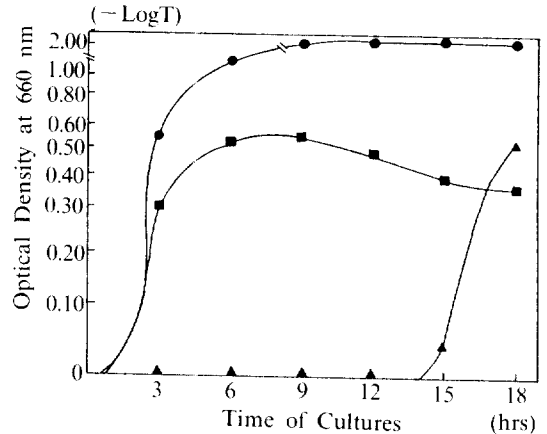


Fig. 5. Effect of pH gradients on the growth of *V. vulnificus* 1A7-p-27 strain.  
 △: pH 4, ■: pH 6, ●: pH 8, ▲: pH 10.

루어졌다.

온도의 영향은 Fig. 5에 나타난 바와 같이 25, 35 및 42°C에서는 왕성한 균생장을 볼 수 있었으나 4°C에서는 균증식이 이루어지지 않았다.

6. 항생제 감수성

환자 분리균주 *V. vulnificus* 25주와 자연계 분리균주 46주에 대하여 액체배지희석법에 의해 MIC를 측정, NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standard)에 의거 판정한 결과 환자 분리균주의 경우 MIC90은 CM, GM, TC, EM 및 AM에 각각 2, 16, 0.5, 4 및 8 µg/ml 농도를 보였으며 자연계 분리균주의 MIC90은 2, 16, 0.5, 8 및 4 µg/ml를 나타내어 환자 분리균주 및 자연계 분리균주 공히 GM만을 제외하고는 CM, TC, EM 및 AM에 대하여 감수성을 지니고 있는 것으로 나타났으며, 자연계 분리균주가 환자 분리균주에 비하여 공시된

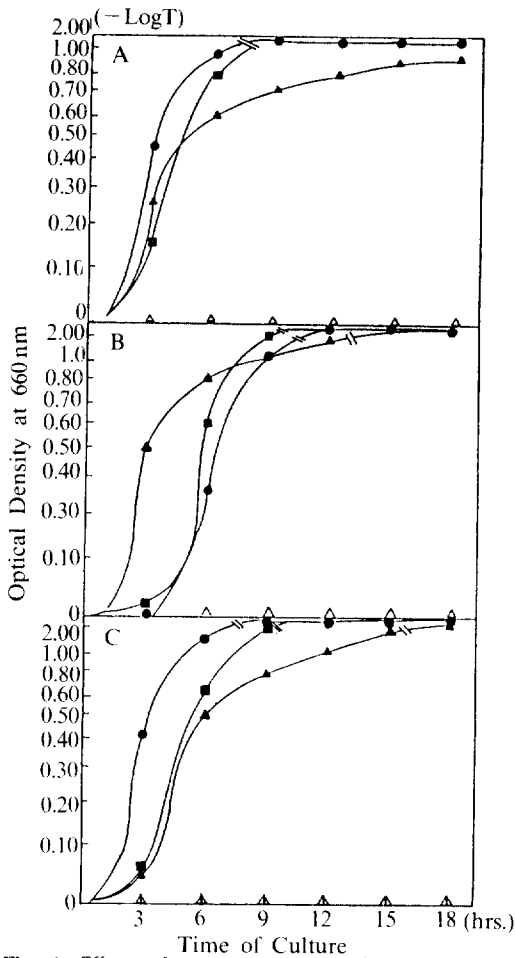


Fig. 6. Effect of temperature on the growth of *V. vulnificus* C7184 strain(A), 1A7-p-22 strains(B), and 1A7-2-27 strain (C).  
 △: 4C, ■: 25C, ●: 35.

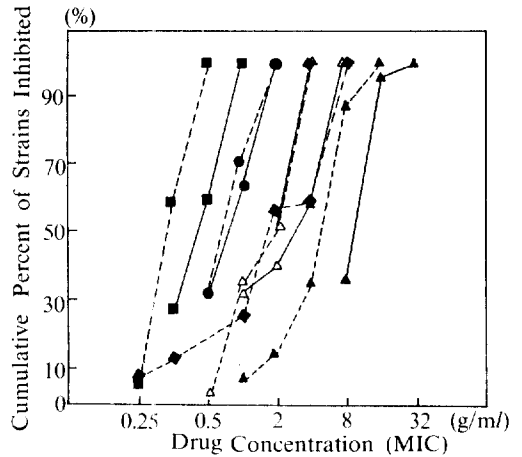


Fig. 7. In vitro antibiotics susceptibility of *V. vulnificus* isolated from patients (—) and marine sources (---).  
 ●: Chloramphenicol, ▲: Gentamycin, ■: Tetracycline, ◆: Erythromycin, △: Ampicillin.

항생제에 대한 MIC가 약간 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 6, Table 14).

7. chelating agent의 영향

살균작용이 있다고 알려진 EDTA 및 2가 양이온 chelating 효과가 있다는 구연산의 *V. vulnificus*에 대한 살균작용 효과를 밝히기 위하여 자연계 분리균주 46주 및 환자 분리균주 25주에 대하여 MIC를 측정된 결과를 Table 15에 나타난 바와 같이 EDTA는 MIC 90이 6.25 mM/m<sup>3</sup>이었으며 구연산은 100 mg%의 농도에서도 생장이 억제되지 않았다.

또한 *V. vulnificus*에 대한 억제효과의 재활성화 여부를 알기 위하여 MIC90 농도로 EDTA를 첨가한 후 Temperature gradient Bio-photorecorder로 진탕 배양하면서 균생장율을 측정하였던 바 Fig. 7, 8 및

Table 14. Minimal inhibitory concentration of various antibiotics to *V. vulnificus* isolated from patient and marine source.

Antibiotics	Sources of isolates	No. of specimen	MIC( $\mu$ g/ml) for % of isolates		
			25	50	90
Chloramphenicol	patient	25	0.5	1	2
	marine	46	0.5	1	2
Gentamycin	patient	25	8	16	16
	marine	46	8	8	16
Tetracycline	patient	25	0.25	0.25	0.5
	marine	46	0.25	0.25	0.5
Tetracycline	patient	25	2	2	4
	marine	46	0.25	0.25	0.5
Erythromycin	patient	25	2	2	4
	marine	46	1	2	8
Ampicillin	patient	25	1	2	8
	marine	46	2	2	4

9에서 나타난 바와 같이 *V. vulnificus* C7184의 경우 배양 12시간후, 환자 분리균주(IA9-p-22) 및 자연계 분리균주(IA7-2-27)는 각각 6시간 30분 및 8시간 경과후 균이 성장하기 시작하여 EDTA가 *V. vulnificus*균에 살균적으로 작용하지는 않았다. 구연산의 경우 100 mg%를 첨가하였을 때도 *V. vulnificus*균의 성장에 전혀 영향을 미치지 않아 액체희석법에 의한 성적과 동일한 결과를 나타내었다.

#### IV. 고 찰

*V. vulnificus*는 대개 간질환을 가진 사람에서 원발성패혈증이나 창상감염을 일으키며 사망에까지 이르게 하는 세균이다(18, 19). 이 균은 유당을 발효하는 호염성세균으로(32, 54) 해수, 해안의 뱀 및 어패류에 서식하고 있다(5, 41). 우리나라의 경우 단성 간질환자가 많고 어패류를 생식하는 식습관으로 인하여 *V. vulnificus*균의 감염증이 드물지 않다(7). 따라서 국내의 연근해에 서식하는 어패류(8)를 비롯하여 기타 자연환경 서식처에 *V. vulnificus*가 다수 생존하고 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 1985년부터 1987년까지 5월-11월 사이에 서해안의 인천의 2개 지역, 남해안의 해남의 6개 지역, 동해안의 울산의 6개 지역으로부터 채취된 어패류등 자연환경 가검물로부터 *V. vulnificus*의 분리를 시도하여 총 1,025건의 가검물 중 46주(4.5%)의 *V. vulnificus*를 분리하였다. 이중 서해안 지역에서는 총 513건의 가검물 중 20주(3.9%), 남해안 지역에서는 325 가검물 중 24주(7.4%)가 분리되었고, 동해안 지역에서는 울산을 비롯한 대부분 지역의 유통 어패류 및 채취 가검물 중에서는 *V. vulnificus*를 분리할 수 없었으나 동해 항만해수와 산지불명의 유통 피조개에서 각 1주씩 2주(1.1%)가 분리되었다.

가검물 채취시 수온 및 pH를 측정한 결과 서해안 및 남해안이 5월에서 6월 사이는 평균수온이 15-20°C, pH가 6.2-6.9였고, 7-9월 사이는 수온이 18-28°C, pH는 6.5-6.8이었고 10-11월 사이에는 10-18°C, pH는 6.2-6.8이었고, 동해안의 경우는 7-8월 사이를 제외하고는 수온이 20°C이하였으며 pH는 6.2-7.0 사이였다. 따라서 연중 수온이 20°C이상인 평균일수가 많은 지역에서 *V. vulnificus*의 분포가 많은 것으로 사료된다. 다만 동해안에서 분리된 2주중 1주는 내항에서 채취된 해수로 부터였으며 수온은 27°C였다. 다른 1주는 이 지역산물이 아닌 생산지불명의 양식피조개인 것으로 밝혀져 아직까지 환자 발생보고가 없었던 지역에서도 유통해산물에 의해 환자 발생 가능성을 시사해주고 있다.

*V. vulnificus* 분리를 연구자에 따라서 차이가 크다. 미국 Chesapeake만의 해수에서 이 세균은 드물게 분리되며 굴에서는 2.3 MPN/g이 보고된 반면(23), Louisiana 해수에서는 3-10,000 MPN/L 으로 다수 분리된 것으로 보고된 바 있다(16).

본 실험결과 *V. vulnificus*이 분리된 중요한 가검물은 꼬막, 피조개, 바지락, 새우, 낙지, 해수 및 estuarine water로 각각 9, 6, 3, 3, 5 및 4주가 분리되어 우리나라 사람의 주요 생식 기호식품인 어패류가 모두 오염되어 있어 어패류 생식시 많은 주의가 요망되고 있다.

분리동정된 46주의 자연계 분리균주의 월별 분리를 보면 8월에 19주(41.3%)로 해수온이 가장 높은 시기였다. 그러나, 국내 일부 종합병원에서 분양받은 균주를 대상으로 입원환자의 역학적 자료분석결과 7월이 11명(44%)으로 제일 많은 환자발생율을 보여 자연계 계절별 분리와 상이한 결과를 나타내었다. 이와같은 상이한 결과는 본 연구 대상으로 분양받은 균주가 국내 환자발생을 대표할 수 없기 때문에 나타난 결과로 추정할 수 있으나 이러한 현상에 대하여는 좀 더 과학적인 역학적 조사가 이루어져야 할 것이다.

*V. vulnificus*의 동정에는 통상적으로 생화학적 반응성상에 의존하는데 분류학상 같은 호염성 *Vibrio*에 속하는 *V. parahaemolyticus* 및 *V. alginolyticus*와 유사하나, 생화학적 특성 중 유당의 발효능(81-85%)은 높으나 서당의 발효능(15%)은 낮다고 알려져 있다(27, 55). 환자 분리균주의 경우 95%가 유당 양성이었으며, 4%가 서당 양성이었다. 자연계 분리균주의 경우 84%가 유당 발효능을 가지고 있었고 서당 발효능은 본 실험에서 자연계 가검물로부터 1차적으로 검색할 때 TCBS상에서 녹색침착만을 취하여 생화학적 시험을 시행하였으므로 자연계 분리균주의 경우 서당 발효능을 가진 *V. vulnificus*의 분리는 모두 배제되었다. 따라서 *V. vulnificus*의 분리동정을 위하여서는 보다 더 개량된 선택배지의 개발이 요구되고 있다. 또한 ornithine 발효능, gelatine 액화능, mannitol 분해능 등에 있어서도 Hollis 등(32), Farmer(27) 및 West와 Brayton(55)의 보고와 다소 상이하여 생화학적 동정 시험이 *V. vulnificus*의 동정에 완벽한 시험방법으로 준용하기는 다소 무리가 있음을 확인할 수 있었다. *V. vulnificus*의 확인 동정에는 DNA hybridization 방법(22, 44)과 flagella 항원의 종특이성을 이용한 혈청학적 진단방법의 이용(33, 52)등이 모색되고 있으나 DNA hybridization 동정법은 수기가 까다롭고 특수장치의 필요 등 일선 실험실에서 적용이 현실적이지 못하다. 본 연구에서는 *V. vulnificus*의 확인 동정시험 방법으로 Tassin 등(52)이 주장한 *V. vulnificus* flagella 종특이성 혈청을 생산, 종특이성을 재확인한 후 생화학적으로 동정된 *V. vulnificus*균을 확인 동정하였다. 그 결과 동종 H-응집가는 시험에 공시된 *V. vulnificus* 참조균주 10종 중 *V. vulnificus* ATCC 29307 만이 2560 X로 약한 응집가를 나타내었다. 그외 균주에서는 모두 10,240 X의 강한 역가를 나타내었고 그의 *V. fluvialis* ATCC 33809등 인체병원성 *Vibrio*종 9균주는 20 X이하의 응집가를 나타내어 *V. vulnificus*균 확인동정에 유용하게 이용되어질 수 있음을 확인하였다. 그러나 종특이 H-항혈청을 이용한 혈청학적

진단 방법은 현재 알려진 인체병원성 *Vibrio* 균종과는 종특이성을 가지고 있다고 확인되었으나 자연계에 분포하는 *Vibrio* 속에는 *V. vulnificus* H-항원과 공통 항원을 갖는 다른 *Vibrio* 종이 존재할 가능성이 많으므로 자연계에 분포하고 *V. vulnificus* flagella와 공통 항원을 갖는 *Vibrio* 균속에 관한 연구가 규명되지 않은 한 자연계 가검물에서 *V. vulnificus* 동정용 항혈청을 실용화 하기에는 적당치 않은 것으로 사료된다.

*V. vulnificus* 생장에 미치는 염농도와와의 관계를 살펴보면 1% APW배지에서 NaCl을 첨가하지 않았을 경우에는 자연계 분리균주와 환자 분리균주 모두가 생장치 않았으며 3%의 농도에서는 100% 생장하였다. 그러나, NaCl의 농도가 6%일때는 환자 분리균주는 88%, 자연계 분리균주는 82%가 생장하였으며, 자연계 분리균주는 NaCl 8%의 농도에서도 11%가 생장하였다. 이상의 결과는 Oliver와 Warner(41)가 기술한 *Vibrio* 종의 numerical taxonomy 중 치명도가 높고 *V. vulnificus*가 속하는 Cluster III에 속하는 성상이다.

*V. vulnificus*는 pH 6.0-8.0 범위에서 생장이 일어났는데 pH 6.0인 경우에는 pH 8.0인 경우에 비하여 균생장이 대단히 억제됨을 알 수 있었다. pH 4.0 및 10.0 즉 강산 및 강알카리에서는 균증식이 이루어지지 않았다. 이와 같은 결과는 정선식 등(11)의 결과와 유사하였다.

세균의 종류에 따라 저온에 노출되면 증식능력이 없어지는 경우가 있는데(35, 43) *V. vulnificus* 균의 경우 25, 37, 42°C에서는 왕성한 증식능력을 보여주었고 4°C에서 증식을 관찰할 수 없었다. 따라서 4°C에서는 *V. vulnificus* 균이 치사되는지는 알 수 없었으나 4°C 정도의 냉장고에 어패류를 저장 섭취하면 *V. vulnificus* 균 감염증의 예방이 어느 정도 가능하리라 사료된다.

*V. vulnificus*의 항혈청균을 동정하는 일은 역학적으로 매우 중요한 일로 사료된다. Shimada와 Sakazaki(47)는 *V. vulnificus* 균을 o1에서 o9까지의 혈청군으로 나누고 있다. 본 연구에서는 Shimada의 방법에 따라 O 항혈청형을 생산, 국내에서 분리한 *V. vulnificus*의 O 항혈청형을 동정하였다. 그결과 환자로부터 분리한 대부분이 o2군(24%)과 o4군(42%)에 속하였으며, 자연계 분리균주의 경우는 o2군(33%)이 가장 많았고, 어느 혈청군과도 반응하지 않은 군도 2주 있었다. Shimada와 Sakazaki(47) 보고에 의하면 자연계 분리균주의 혈청군은 o1이 28%로 제일 많았고 환자 분리균주의 혈청군은 o4가 33%로 보고한 바 있으며, 오재세 등(6)은 o4 혈청군이 가장 흔히 분리되는 군주로 보고하여 환자 분리균주의 경우는 본 실험성적과 유사하였지만 자연계 분리균주의 경우에는 상이한 결과를 나타내었다.

이와 같은 차이는 지역적 특성에 의한 균분포의 차이로 추정되며 본 연구결과 o1에서 o9군 까지 어느 혈청군과도 반응을 보이지 않은 군주는 새로운 혈청군으로 분류될 가능성이 있다. 또한, 환자 및 자연계 분리균주에서 혈청군의 분포양상이 차이를 보이고

있는데 이는 혈청군에 따라 인체에 대한 감수성 및 병원성의 차이 때문인지는 분명하지 않다. *Vibrio* 균종은 항생제 내성을 획득하지 못하는 세균(59, 36, 50, 53)으로 알려져 있다. 그러나, 비브리오패혈증의 경우 그 진행이 빠르므로 초기에 진단하여 치명적인 상태에 빠져들기 전에 살균효과가 우수한 항생제의 신속한 투여 및 속 치료를 집중적으로 실시하여야 한다(3, 18). 따라서 *V. vulnificus* 감염증 치료를 위한 항생제 감수성 시험은 중요하다. *V. vulnificus* 균에 대한 항생제 감수성에 관한 보고가 없었던 것은 아니나 거의 모두 원판 확산법이나 한천배지 희석법에 의한 것이기 때문에 그러한 결과는 실제 치료에 응용하기는 이론적으로 무리가 있다고 하여(10), 실제 치료상황에 더 근접할 수 있는 액체 희석법에 의하여 항생제 감수성 시험을 한 결과 MIC90은 CM, TC, EM 및 AM이 환자 분리균주의 경우 2, 0.5, 4 및 8이었고, 자연계 분리균주의 경우 각각 2, 0.5, 8 및 4  $\mu\text{g/ml}$ 로 감수성이 높은 것으로 나타났으며 GM만이 환자 분리균주가 MIC90이 16  $\mu\text{g/ml}$ , 자연계 분리균주가 환자 분리균주보다 MIC가 약간 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 이준행 등(10)의 보고와 유사한 성적이며, *V. vulnificus* 감염증으로 의심될 시에는 CM, TC, EM 및 AM의 투여가 치료에 유용할 것으로 사료된다.

*V. vulnificus* 감염증에 대한 위험인지도가 높아진 이래 비브리오패혈증의 효과적인 예방을 위한 살균 방법의 모색에 많은 연구 촛점이 맞추어져 왔다. 1981년 Oliver는 생굴마쇄액에 집중한 *V. vulnificus*가 병점 근처의 온도에 노출되었을 때 급격히 사멸하여 간다고 보고하였고(40), 이준행 등(9)은 증류수가 *V. vulnificus*를 거의 완벽하게 사멸시킨다고 보고하였다. 그러나 Johnstone 등(34) 및 이준행(9)은 *V. vulnificus*가 냉동 또는 냉장만으로 의외있게 사멸하지 않는다는 주장과 함께 증류수에 노출되었다라도 적당한 재화성배지에서 상당 정도 재화성화된다는 고광련(1)의 보고로 인하여 그 효용성은 의심스럽다. 한편 정선식 등(12, 13)은 chelating agent인 EDTA가 저농도(1 mM)에서도 *V. vulnificus* 균에 대한 억제효과가 크고, 삼투압 속에 대한 강화효과가 있다고 주장하였다. 이에 본 실험에서는 *V. vulnificus* 균에 대한 chelating agent의 살균효과를 재확인하고 *V. vulnificus* 균에 치사적으로 작용하는지를 규명하기 위하여 EDTA 및 구연산에 대한 MIC를 구하고 균생장량을 측정하였다. 그 결과 EDTA의 MIC90은 6.25 mM/ml로 나타나 *V. vulnificus* 균에 억제효과가 있음을 재확인할 수 있었으나 구연산은 100 mg%의 농도에서도 균증식이 이루어져 억제효과가 없는 것으로 나타났다. 한편 EDTA를 MIC90의 농도가 되도록 2.5% NaCl BHI 액체배지에 첨가하여 진탕배양하면서 생장억동곡선을 그려보았던 바, 시험에 공시된 *V. vulnificus* C7184, 환자 분리균주(1A9-p-22) 및 자연계 분리균주(1A7-2-27)가 모두 6-8 시간 후에 재생장이 이루어져 EDTA가 *V. vulnificus* 균에 저농도(1

mM)에서도 생장을 억제시킨다는 정선식 등(11)의 보고와는 상이한 결과를 나타내었다.

### 참 고 문 헌

- 고광련, 1987. 증류수에 억제된 *Vibrio vulnificus* 재활성화배지에 관한 연구. 전남대학교 대학원 의학박사학위 청구논문.
- 구정순, 김대원, 한규섭, 석종성, 박명희, 김상인, 1982. Lactose fermenting vibrio(*Vibrio vulnificus*) 패혈증 5예. 대한병리학회지 15, 463-469.
- 김신무, 김현숙, 1985. 어패류에서 *Vibrio vulnificus*의 분리. 대한임상병리사회지 17, 78-
- 보건사회부, 1988. 일반시험법. 식품공전: 397-398.
- 송 철, 김호훈, 강연호, 이광식, 이재관, 오해성, 서준석, 1985. 우리나라 연안 *Vibrio*균속분포에 관한 연구. 국립보건원보 21, 177-132.
- 오제세, 김신무, 박선희, 1987. *Vibrio vulnificus*의 면역혈청에 대한 연구. 대한임상병리사회지. 19, 145.
- 윤종만, 김성렬, 범희승, 윤영근, 박광숙, 양건호, 김석민, 정명호, 1985. *V. vulnificus* 감염증에 대한 임상적 고찰. 대한내과학회잡지. 29, 37.
- 이연태, 기용숙, 황기선, 고광표, 최상규, 박성희, 박길수, 이종훈, 1971. 1970-1971년도 국내 각 지역에서의 *Salmonella*균, *Shigella*균 및 호염성 비브리오균속에 대한 세균학적 조사. 대한미생물학지. 6(1), 75.
- 이준행, 조순흠, 정선식, 1987. Osmotic shock에 의한 *Vibrio vulnificus* 시멸에 관한 연구. 대한미생물학회지. 22, 109-116.
- 이준행, 최소남, 정선식, 1987. *Vibrio vulnificus*에 대한 tetracycline 살균활성에 관한 연구. 대한의학협회지 30, 769-777.
- 정선식, 박중호, 이준행, 1986. *Vibrio vulnificus*의 세균학적 성상에 관한 연구. 감염학회지. 18, 55-62.
- 정선식, 양한모, 이준행, 1987. *Vibrio vulnificus*의 증식에 미치는 chelating agent의 영향. 전남의대잡지 24(1), 1-7.
- 정선식, 양한모, 이준행, 1939. *Vibrio vulnificus* 패혈증 예방을 위한 효과적 살균방법 모색에 관한 연구 (I. 살균적 osmotic shock 및 이에 대한 chelating agent의 강화효과) 대학의학협회지. 32, 272-282.
- 정선식, 이준행, 1985. *Vibrio vulnificus*균에 대한 항균제의 활성에 미치는 정산인 혈청의 영향. 전남의대잡지. 23, 399-403.
- Anhalt, J.P. and Washington II, J.A., 1980. Preparation and storage of antimicrobe solutions, 495-496. In manual of clinical microbiology, 3rd ed Americans Society for microbiology, Washing D.C.
- Barbay, J.R., H.B. Bradford and Jr. N.C. Roberts. The occurrence of halophilic vibrios in Louisiana coastal waters. in Colwell RR(ed), *Vibrios* in the environment. John Wiley & Sons, Inc., New York, 511.
- Baumann, P., A.L. Furnis and J.V. Lee, 1984. Family II *Vibrionaceae*. in Kreig NR and Holt JG (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore: 528-538.
- Blake, P.A., M.H. Merson, R.E. Weaver and P. C. Heublin, 1979. Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *N. Engl. J. Med.* 300, 1-5.
- Blake, P.A., R.E. Weaver and D.G. Hollis, 1980. Diseases of Human(other than cholera) caused by *Vibrio*. *Anna. Rev. Microbiol.* 34, 341-356.
- Bowdre, J.H., M.D. Poole and J.D. Oliver, 1981. Edema and Haemoconcentration in mice experimentally infected with *Vibrio vulnificus*. *Infect. & Immun.* 32, 1193-1199.
- Carruher, M.M. and W.J. Kabet, *Vibrio vulnificus* (lactose-positive vibrio) and *Vibrio parahaemolyticus* differ in the their susceptibilities to human serum. *Infect. Immun.* 32, 964-966.
- Clark, W.A. and A.G. Steigerwalt, 1977. Deoxyribonucleic acid reassociation experiments with a halophilic lactose fermenting *Vibrio* isolated from blood cultures. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 194-199.
- Colwell, R.R., P.A. West, D. Maneval, E.F. Remmers, E.L. Ellio and Carlson, N.E. Ecology of pathogenic *Vibrios* in Chesapeake Bay. in colwell RR(ed) *Vibrios* in the environment. John Wiley & Sons, Inc., New York, 367.
- Cowan, S.T., 1979. Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge Univ. Press.
- Davis, B.R., 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio minicus*. *J. Clin. Microbiol.* 14, 631-639.
- Farmer, J.J., 1979. *Vibrio* ("Benecke") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicemia, and the sea. *Lancet*, 903.
- Farmer, J.J., 1985. *Vibrio* in manual of clinical microbiology 4th ed.: 282-301.
- Fernandez, C.R. and G.A. Pankey, 1975. Tissue invasion by unnamed marine *Vibrios*. *JAMA.* 233, 1173-1176.
- Fisher, D.T., 1981. *V. damsela*, a marine Bacterium causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*, 34, 1139-1140.
- Helms, S.D., J.D. Oliver and J.C. Travis, 1984. Role of heme compound and haptoglobin in *Vibrio vulnificus* pathogenicity. *Infect. Immun.* 45, 345-349.
- Hickman, F.W. and Farmer, 1982. Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhoea. *J. Clin. Microbiol.* 151, 395-401.
- Hollis, D.G., R.E. Weaver, C.N. Baker and C. Thronsberry, 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 3, 425-431.
- Janet, S. and R.J. Sibling, 1986. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* by anti-H coagglutination. *Appl. and Environ. Microbiol.* 52, 1299-1304.
- Johnston, J.M., Andes, W.A. and Glasser, G., 1983. *Vibrio vulnificus*-a gastronomic hazard. *JAMA.* 249.

- 1756-1757.
35. **Maynell, G.G.**, 1958. The effect of sudden chilling on *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 380-389.
  36. **Mertens, A., J. Nagler, W. Hanson and E. Gepts-Friedenreich**, 1979. Halophilic, lactose-positive *Vibrio* in a case of fatal septicemia. *J. Clin. Microbiol.*, **9**, 233.
  37. **Moeller, V.**, 1954. Activity determination of amion acid decarboxylases in Enterobacteriaceae. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **34**, 102.
  38. **Morris, J.G., H.T. James and G.L. Drusano**, 1985. *In vitro* susceptibility of pathogenic *Vibrio* species to nitrofluxacin and six other antimicrobial agents. *Antimicrobial agent. Chemother.* **28**, 442-445.
  39. National committee on clinical laboratory standards. 1983. Methods of dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria which grow aerobically. Tentative standard PSM-7. National committee on clinical laboratory standards. Villanova Pa.
  40. **Oliver, J.D.**, 1981. The pathogenicity and ecology of *Vibrio vulnificus*. *Mar. Tech. Soc. J.*, **15**, 45-52.
  41. **Oliver, J.D., R.A. Warner**, 1983. Distribution of *Vibrio vulnificus* and Other lactose fermenting *Vibrios* in marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 985.
  42. **Oliver, J.D. and R.R. Colwell**, 1972. Extractable lipids of gram negative marine bacteria; phospholipid composition. *J. Bacteriol.*, **114**, 897-908.
  43. **Patterson, T.E. and H. Jackson**, 1979. Effect of storage of 1 and 4°C on viability of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **46**, 161-167.
  44. **Poole, M.D. and J.D. Oliver**, 1978. Experimental pathogenicity and mortality in ligated ileal loop studies of the newly reported halophilic lactose-positive *Vibrio* species. *Infect. Immun.*, **20**, 126-129.
  45. **Reichelt, J.L., P. Baumann and L. Baumann**, 1976. Study of genetic relationships among marine species of the genera *Benechea* and *Photobacterium* by means of *in vitro* DNA/DNA hybridization. *Arch. Microbiol.*, **110**, 102-120.
  46. **Richard, J.M. and M.E. Pessa**, 1985. Necrotizing soft tissue infections caused by marine *Vibrio*. *Surgery* **98**, 126-130.
  47. **Shimada, T. and R. Sakazaki**, 1984. On the serology of *Vibrio vulnificus*. *Japan J. Med. Biol.*, **37**, 241-246.
  48. **Simpson, L.M. and J.D. Oliver**, 1983. Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, **41**, 644-649.
  49. **Sumios, S., R. Kariyama, M. Ogawa, Y. Tekeda and T. Miwatani**, 1976. Flagella antigens of various species of new genus *Vibrio* and related genera. *Int. J. Syst. Bact.*, **26**, 97-101.
  50. **Tacket, C.O., T.J. Barrett, M.A. Roberts, J.M. Mann and P.A. Blake**, 1984. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus*, a marine *Vibrio* in island areas of the United States. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 197.
  51. **Tamplin, M.L., S. Spécter, G.E. Rodrick and H. Freidman**, 1983. Differential complement activation and susceptibility of human serum bactericidal action by *Vibrio* species. *Infect. Immun.*, **42**, 1187-1190.
  52. **Tassin, M.G., R.J. Siebeling, N.C. Robert and A.D. Larsen**, 1983. Presumptive identification of *Vibrio* species with H antiserum. *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 400-407.
  53. **Tison, D.L. and M.I. Kelly**, 1984. *Vibrio vulnificus* endometritis. *J. Clin. Microbiol.*, **20**, 18.
  54. **Weaver, R.E. and N.J. Ehrenkranz**, 1975. *Vibrio parahaemolyticus* septicemia. *Arch. Intern. Med.*, **2** **135**, 197.
  55. **West, P.A. and P.R. Brayton**, 1986. Numerical taxonomy of *Vibrios* isolated from aquatic environments. *Int. J. Sys. Bact.*, **36**, 531-543.
  56. **Windholz, M.**, 1983. The Merck Index, 22th ed. Rahway New Jersey Merck Co., 330.
  57. **Wright, A.C., Simpson and J.D. Oliver**, 1981. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.*, **34**, 505-507.
  58. **Yang, G.C.H., G.P. Schrank and B.A. Freeman**, 1977. Purification of flagella cores of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **129**, 1121-1128.
  59. **Zide, N., J. Davis and N.J. Ehrenkranz**, 1974. Fulminating *Vibrio parahaemolyticus* septicemia. *Arch Intern. Med.*, **133**, 479.

(Received December 23, 1991)

(Accepted January 21, 1992)

---

**ABSTRACT: The Bacterial Characteristics of *Vibrio vulnificus* Isolated from Environments and Patients in Korea.**

**Shin, Kwang Hoon, Young Hack Shin\* and Chong Sam Lee**(Department of Biology, College of Natural Sciences, Sung Shin Women's University Seoul, Korea. \*Division of Bacteriology, National Institutes of Health, Seoul, Korea)

*Vibrio vulnificus* has been recognized as a pathogen of septicemia and wound infection, when the organism attacks high-risk persons with a history of hepatic disease, alcohol abuse, diabetes or any debilitating disease. Forty six strains of *V. vulnificus*, isolated from 1025 marine specimens from May to November for three years, from 1985 to 1987, were studied for their biochemical properties, growth requirements, serotype and drug susceptibilities. The isolates were different in their various biochemical reactions. Ninety-five percent of isolated strains were able to ferment lactose, while most strains didn't utilize sucrose in their biochemical test, for example ornithine, gelatin and mannitol were quite different composition than those described in other reports. It was found that the biochemical test wasn't useful for identifying strain. The type of somatic O antiserum was determined in isolates from marine sources and in patients with *Vibrio* septicemia. In patient isolates, 1-2 group were 24% and 1-4 group were 42%. However, o2 group(33%) were more abundant in isolates from marine sources. Minimal inhibitory concentrations(MICs) of chloramphenicol, tetracycline, erythromycin and ampicillin were determined for *V. vulnificus* by broth dilution method. MIC<sub>90</sub> was 1, 0.25, 2 and 4 µg/ml in patient isolates, 1, 0.25, 2 and 2 µg/ml in marine isolates. The divalent chelating agent, EDTA, inhibited the growth of *V. vulnificus* at 6.25 mM/ml of MIC<sub>90</sub>.