

어패류에서의 *Vibrio vulnificus* 분리

연세대학교 의과대학 임상병리과

정윤섭 · 전명숙 · 정혜경 · 권오현 · 이삼열

= Abstract =

Isolation of *Vibrio vulnificus* from Shellfish

Yunsop Chong, Myung Sook Chun, Hae Kyung Chung, Oh Hun Kwon and Samuel Y. Lee

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Vibrio vulnificus is an organism capable of causing septicemia and wound infection in compromised patients. The source of infection is known to be raw oysters and others. The prevalence of the organism in Korean sea water and shellfish is not known. The authors surveyed shellfish and other specimens obtained mainly from a market in Seoul and from ones in Inchon. Five cultures of *V. vulnificus* were isolated from oyster and clam samples. Two isolates had typical characteristics of the strains isolated from patients, i.e., definite hemolysis and typical biochemical reactions. However, other 2 isolates were sucrose positive, although the identity were confirmed by Center for Disease Control. We do not know whether such strains are pathogenic or not. For the isolation of *V. vulnificus* from environmental samples, TCBS agar and VV agar were not very selective or differential. We isolated our strains with the use of OF-lactose agar and SPS agar. However OF-lactose agar did not support good growth of *V. vulnificus*, while SPS agar did not suppress other vibrios.

서 론

*V. vulnificus*는 패혈증과 창상감염을 일으킬수 있는 세균이다^{1,2)}. 이 세균의 감염이 국내에서 처음 보고된 것은 1982년이지만^{1,2)}이 감염은 그 이전에도 있었던 것이 확실하고 그 발생보고는 1978년까지 거슬러 올라가게 되었다³⁾. 김영포등²⁾은 매년 5-10명의 환자를 보았음을 보고하여 이 감염이 우리나라에 드물지 않음을 시사하였다. 이 세균 감염증 중에서 패혈증은 치명율이 대단히 높으므로 그 예방은 시급한 과제라고 하겠다. 이 감염이 외국에서는 굴의 생식에 연유되고⁴⁾ 국내에서는 어패류의 생식에 의한다고 추측되고 있다^{1-3,5)}. 그러나 우리나라 해안의 해수나 어패류의 이 세균에 의한 오염에 관한 보고는 없는 것으로 생각된다.

이 세균을 혈액에서 분리하기는 어렵지 않으나, 여러가지 *Vibrio*가 다수 섞여있는 해수나 어패류에서 분리하기는 쉽지않다. 따라서 감별배지나 선택배지가 필요하나, 이 세균은 그 성상이 특히 *V. parahaemolyticus*와 유사하여 그러한 배지를 만들

기가 어려운 것으로 생각된다.

저자들은 몇가지 어패류에서 *V. vulnificus*를 배양하기 위해 OF base(Difco)를 기초로 한 OF-lactose 한천과 sodium dodecyl sulfate polymixin B sucrose(SPS) 한천⁶⁾을 사용하였고 5주를 분리할수 있었다. 한편 SPS의 *V. vulnificus*에 대한 선택성을 환자 유래주를 써서 시험하였다.

재료 및 방법

V. vulnificus 분리를 위한 검체로는 1983년 7월-1984년 5월에는 서울의 1시장에서의 계와 굴을 사용하였다. 1984년 6월-8월에는 대부분 인천의 1시장에서 구한 조개등과 소수의 서울과 제주도에서의 어패류및 산 생선탱크의 물을 검체로 사용하였다.

분리배지로 1983년-1984년 5월에는 TCBS(BBL), VV agar⁷⁾ 및 OF-lactose agar를 채용하였다. VV agar는 처방에⁸⁾ 따라 만들었다. OF-lactose 한천은 OF base(Difco) 9.4 g, yeast extract 5 g, lactose 20 g, tween 80 0.5 ml, NaCl 10 g, MgCl₂.

6H₂O 2 g, KCl 1 g, agar 13 g에 증류수 1000 ml를 넣어 멸균하고 배지 1ml 당 colistin 32 μg clindamycin 1 μg을 넣어서 만들었다. 같은 그 즙을, 제는 아가미등 표면을 면봉으로 문질러 채취한것을 배지에 접종하였다. 35°C에 배양하고 TCBS는 1일 후에 OF-lactose는 2일후에 관찰하여 의심되는 집락을 선택하여 동정하였다. TCBS에서는 녹색집락을, OF-lactose 한천에서는 황색이나 녹색집락을 선택하여 동정하였다.

1984년 6월-8월에는 TCBS, SPS 한천및 SGP broth¹⁰⁾를 사용하였다.

SPS 한천은 Proteose peptone 10 g, beef extract 5 g, sucrose 15 g, NaCl 20 g, sodium dodecyl sulfate 1 g, bromthymol blue 0.04 g, cresol red 0.04 g, agar 15 g, 증류수 1000 ml(pH 7.6)로 만들고 가압 멸균한 후에 배지 1ml 당 100u의 polymixin B를 넣고 평판을 만들었다. SGP broth는 soluble starch 10 g, gelatin 10 g, NaCl 20 g, 증류수 1000ml(pH7.7)

로 만들고 가열압균 후에 1ml 당 polymixin B 150 u를 넣고 10 ml씩 시험관에 분주하였다. 굴검체는 먼저번과 같은 방법으로, 조개등의검체는 제액과 장동의 조직을, 생선은 체표면에서 면봉으로 채취한 검체를 접종에 사용하였다. 35°C에 배양하고 SGP broth는 1일 배양후에 SPS agar에 계대배양하였다. TCBS는 1일, SPS 한천은 2일 배양후에 관찰하였다. SPS 한천에서는 주위에 혼탁이 있는 집락을 선택하여 동정하였다. 균종의 동정은 재래식방법과 API 20E (Analytab Products, Plainview, N. Y.)를 사용하였다. 감별배지에는 식염을 첨가한 것을 사용하였다.

SPS 한천의 선택성을 보기위하여는 환자유래 *V. vulnificus* 균주와 해산물유래 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*를 사용하였다. 단체회석한 시험세균의 부유액을 시험배지에 접종하여 배양하고 그 집락수를 비교하였다.

Table 1. Isolation of *V. vulnificus* from crab and oyster specimens

Specimen	Medium	No. of specimen (positive/tested)							
		1983						1984	
		Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	May	Total
Oyster	TCBS	0/1	0/4	0/8	0/18	0/7	0/2	0/8	0/48
	VV agar	0/1	0/4						0/5
	OF-Lactose			1/8	1/18	1/7	0/2	0/8	3/43
Crab	TCBS	0/5	0/11	0/10	0/18	0/6	0/2	0/7	0/59
	VV agar	0/5	0/11						0/16
	OF-Lactose			0/10	0/18	0/6	0/2	0/7	0/43

Table 2. Isolation of *V. vulnificus* from clam, oyster and other specimens

Specimen	Medium	No. of specimen (positive/tested)			
		1984			Total
		Jun	Jul	Aug	
Clam	TCBS	0/11	0/42	0/22	0/75
	SPS-D ^a	0/11	1/42 ^b	0/22	1/75
	SPS-S ^c	0/11	1/42 ^c	0/22	1/75
Oyster & others	TCBS	0/3	0/24	0/8	0/35
	SPS-D	0/3	0/24	0/8	0/35
	SPS-S	0/3	0/24	0/8	0/35

^a SPS-D, direct inoculation of specimen; SPS-S, sub-culture of SGP broth culture.

^b Isolated from an arkshell specimen.

^c Isolated from a Bajirak specimen.

성 적

1983-1984년 5월에는 48개의 굴과 59개의 계검체가 배양되었으며 이 중에서 굴에서만 3주의 *V. vulnificus* 가 OF-lactose 한천에서 분리되었다 (Table 1). 1984년에는 피조개 20개, 대합 18개, 동죽 17개, 기타 18개의 검체가 배양되었으며 2개 검체에서 *V. vulnificus* 가 분리되었다. 그중 1 주는 피

조개를 직접 접종한 SPS 한천에서, 다른 1 주는 바지락 검체를 SGP broth 에서 증균한후 계대배양한 SPS 한천에서 분리되었다 (Table 2)

분리주의 성상은 Table 3 와 같았다. 즉 굴에서 분리된 83-08주와 바지락에서 분리된 84-S10 주는 그 성상이 환자 유래주와 같고 혈액한천상의 집락형태와 분명한 용혈이 또한 같았다. 그러나 피조개에서 분리된 84-A7 주는 용혈성이 약한점이 달랐고, 굴에서 분리된 83-024와 83-035주는 suc-

Table 3. Cultural characteristics of *V. vulnificus* isolates

Characteristics	Reaction				
	83-08	83-024	83-035	84-A7	84-S10
Hemolysis on blood agar	+	w	w	w	+
Growth 0% NaCl	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+
6% NaCl	-	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+
ONPGI	+	+	+	+	+
Simmon citrate	+	-	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-
Acid from Glucose	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Sucrose	-	+	+	-	-

^a +, positive or growth; w, weak reaction; -, negative or no growth.

Table 4. Comparison of growth of vibrios on SPS and on other media

Organism	CFU/ml on			
	SPS ^a	SPS+PT	SPS+C	Blood agar
<i>V. vulnificus</i>	2.8 × 10 ⁴	4.0 × 10 ⁴	2.5 × 10 ⁴	1.8 × 10 ⁵
<i>V. parahaemolyticus</i>	1.8 × 10 ⁴	1.6 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁴	4.0 × 10 ⁴
<i>V. alginolyticus</i>	4.1 × 10 ⁴	4.3 × 10 ⁴	3.3 × 10 ⁴	2.6 × 10 ⁴

^a SPS, Kitaura's original formula; SPS + PT, SPS plus 0.1% potassium tellurite 5 ml/l; SPS+C, SPS plus colistin 16 μg/ml instead of polymyxin B 100 u.

rose에서 산을 생성하고 용혈성이 약한 점이 달랐다.

SPS 한천의 원래 처방, SPS 한천에 1리터당 0.1% potassium tellurite 5 ml를 첨가한 배지 및 polymyxin B 대신으로 colistin 16 μg/ml를 첨가한 배지에서의 집락수를 혈액한천에서의 집락수와 비교한 성적은 Table 4와 같았다. 즉 이들 선택배지에서는 *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*의 집락수가 크게 다르지 않았다(Table 4).

고 찰

*V. vulnificus*는 해수나 해산물중에 있는 세균임이 보고되어 있지만 우리나라에서 이방면의 보고는 없는 것으로 생각되며, 그 수가 많은지 적은지는 알수없다. Kaneko and Colwell¹³⁾의 Chesapeake 만에서의 연구 결과를 보면, *V. parahaemolyticus* 이외에 다수의 *Vibrio*가 있으나 이중에 *V. vulnificus*가 얼마나 들어있는지는 추측할수 없다. Ward¹⁴⁾가 미국의 해저 검체에서 분리한 균주중 *V. parahaemolyticus*로 동정되지 않은 세균중에도 *V. vulnificus*의 성상을 나타낸 균주를 볼수가 없다. 또한 *V. vulnificus*가 명명되기 이전에는 이 세균이 *V. parahaemolyticus*로 잘못 동정되었기가 쉽다고 생각되는데 Feeley and Balows¹⁵⁾의 감별표에는 *V. parahaemolyticus* 중 lactose 발효 균주가 1272주중 0.4%뿐이다. 또한 Bauman et al.⁶⁾의 *Beneckeia* 분류에 관한 연구에는 환자에서 분리된 *V. vulnificus* 14주만이 group C-2라는 이름으로 포함되어 있다. 이러한 사실들은 이 세균이 해수나 어패류중에 *V. parahaemolyticus* 만큼 흔히 존재하지는 않는 것으로 생각해 한다. 저자들은 본 연구에서 217개의 검체에서 5주의 *V. vulnificus*를 분리할수 있었을 뿐이었다(Table 1,2). 그러나 Kitaura et al.¹³⁾은 소수의 검체를 조사한 결과에서 그 분리율이 높음을 보고하였는데 그 차이가 검체 채취장소에 따른 것인지는 알수 없다. 저자들이 이 세균을 분리할 수 있었던 시기는 7월-11월

이었고, 이 세균의 감염은 여름철에 국한되는 것을 생각할 때 해수나 해산물 중의 이 세균의 수는 이 시기에 느는 것이 *V. parahaemolyticus*의 경우와 같은 것으로 생각된다.

수가 적은 세균을 성상이 비슷한 세균이 많은 검체에서 분리해내기는 쉽지않다. *V. cholerae*나 *V. parahaemolyticus*의 선택배지로 널리 이용되고 있는 TCBS에서는 *V. vulnificus*나 *V. parahaemolyticus*의 집락이 다 같이 녹색이므로 구별이 되지 않는다. 또한 TCBS는 *V. vulnificus*에 대해 상당한 억제작용을 한다는 보고도 있다⁷⁾. Kitaura et al.¹³⁾은 TCBS를 써서 *V. vulnificus*를 분리하지 못하였음을 보고하였고 저자들도 이 배지를 써서는 분리하지 못하였다(Table 1,2). 따라서 해수나 어패류에서의 *V. vulnificus*분리를 위하여는 다른 선택점 감별배지가 필요하나 *V. vulnificus*와 *V. parahaemolyticus*는 그 성상이 유사하여 이러한 배지를 만들기가 어려운 것으로 생각된다. 즉 이 두세균에 대한 담즙의 영향이나 산도의 영향이 비슷하고(이명자, 석사학위논문, 연세대보건대학원, 서울, 1983), 한냉 처리나 배양온도로, 또는 항생제나 식염 첨가 배지라도 이 세균을 선택적으로 배양할 수 없었다(전명숙, 석사학위논문, 연세대보건대학원, 서울, 1984). lactose 첨가 배지를 써도 그 산생성이 약하여 감별이 안되며, peptone의 양을 줄여도 약한 산성반응을 볼수 있을 뿐이고 이 배지에서는 *V. vulnificus*의 증식이 느리었다. Brayton et al.⁸⁾은 *V. vulnificus*의 선택배지인 VV agar를 만들었고 이 배지가 TCBS보다 *V. vulnificus*를 덜 억제한다고 하였으나 저자들이 이 배지를 써서 어패류에서 *V. vulnificus*의 분리를 시도해 본 바로는 다른 세균에 대한 억제력이 약함을 경험하였고 이러한 결과는 다른 연구자(Dinuzzo AR et al., Abstr. Annual Meeting Am. Soc. Microbiol. 1984, p 206)도 보고하고 있다.

Kitaura et al.¹³⁾은 sodium dodecyl sulfate가 포함

된 배지에서 *V. cholerae* 와 *V. vulnificus* 는 집락주 위에 불투명대를 형성함으로써 이들을 감별할 수 있다고 하였고 8-9월에 어패류에서 쉽게 *V. vulnificus* 를 분리할 수 있음을 보고하였다. 그러나 저자들이 이 배지를 사용해서 얻은 결과(Table 2)를 보면 역시 분리가 낮았고, 다른 세균에 대한 억제력이 낮았다. 이 배지에서 불투명대를 보인 집락중 많은 수가 *Alteromonas putrefaciens* 인 점은 Kitaura et al 의 보고와¹²⁾ 같았고 그밖에도 재래식이나 API 20 E 로나 동정이 되지 않는 세균과 *Aeromonas* 등이 있었다. 이러한 사실은 더 개량된 감별배지가 있어야 해수나 어패류에서 *V. vulnificus* 를 분리하기가 더 용이할 것임을 보이고 있다.

저자들이 분리한 *V. vulnificus* 5주중 83-08과 84-S10은 혈액한천상의 집락형태와 용혈성을 포함한 모든 성상이 환자에서 분리한 균주^{3,10)}와 같았으나 83-024와 83-035주는 용혈성이 약하고 citrate 음성, sucrose 에서 산을 생성하는 점이 달랐다. CDC 의 Dr. G.K. Morris 는 이 두 균주를 "sucrose 양성 *V. vulnificus*" 로 확인하였다. 또한 84-A7 주도 용혈성이 약하였다. 이들 3주도 사람에게 병원성이 있는지는 의문이며 동물시험 등으로¹¹⁾ 이들 균주의 병원성이 밝혀져야 할 것이다.

결 론

1983년-1984년에 217개의 어패류등 검체를 배양하여 5주의 *V. vulnificus* 를 분리하였다. 이 중 2주는 용혈성을 포함한 모든 성상이 환자 유래주와 같았으나 나머지는 용혈성이 약하였고 2주는 sucrose 에서 산을 생성하였다.

이 세균분리를 위한 선택배지인 SPS agar 가 *V. parahaemolyticus* 나 *V. alginolyticus* 를 억제하지 않았으며 따라서 해수나 해산물에서의 이 세균분리가 용이할 수 있기 위해서는 더 선택성이 높은 개량된 배지가 필요하다는 결론을 얻었다.

참 고 문 헌

- 1) 구정순, 김대원, 한규섭, 석종성, 박명희, 김상인 : Lactose fermenting *Vibrio* (*V. vulnificus*) 패혈증 5예. 대한병리학회지 16:463, 1982.
- 2) 김영표, 전인기, 나해철, 박석돈 : 소위피부피질이라 불리웠던 가칭 fluminating gangrenous dermatitis syndrome due to *Vibrio* (4예, 대

한피부과학회지 1983. p19.

- 3) 김현옥, 정윤섭, 이삼열, 강진경, 전재윤 : *Aeromonas hydrophila* 로 잘못 동정된 2예를 포함한 *Vibrio vulnificus* 패혈증 4예. 임상병리학회지 4 : 115, 1984.
- 4) Bauman P, Bauman L and Reichelt JL: Taxonomy of marine bacteria: *Beneckeia parahaemolytica* and *Beneckeia alginolytica*. *J. Bacteriol.* 113:1144, 1973.
- 5) Blake PA, Merson MH, Weaver RE, Hollis DG, and Heublein PC: Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *N.Engl. J. Med.* 300:15, 1979.
- 6) Blake PA, Weaver RE, and Hollis DG: Disease of human (other than cholera) caused by *Vibrio*. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:341, 1980.
- 7) Brayton PR, West PA, Russek E and Colwell RR: New selective plating medium for isolation of *Vibrio vulnificus* Biogroup 1. *J. Clin. Microbiol.* 17:1039, 1983.
- 8) Chong Y, Park MY, Lee SY, Kim KS and Lee SI: *Vibrio vulnificus* septicemia in a patient with liver cirrhosis. *Yonsei Med. J.* 23:146, 1982.
- 9) Farmer JJ III: *Vibrio (Beneckeia) vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicemia, and the sea. *Lancet* 2:903, 1979.
- 10) Feeley JC and Barlows A: *Vibrio*. In Lennette EH, Barlow A, Spaulding EH, and Truant JP(ed.), Manual of clinical microbiology, 2nd ed., Amer. Soc. Microbiol., Washington, 1974.
- 11) Kanneko T and Colwell RR: Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *J. Bacteriol.* 113:24, 1973.
- 12) Kitaura T, Doke S, Azuma I, Imaida M, Miyano K, Harada K and Yabuuchi E: Halo production by sulfatase activity of *V. vulnificus* and *V. choerae* O1 on a new selective sodium dodecyl sulfate-containing agar medium: a screening marker in environmental surveillance. *Feder. of Europ. Microbiol. Soc. Microbiology Letters* 17:205, 1983.
- 13) Kreger A and Lockwood D: Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immun.* 33:583, 1981.
- 14) Ward BQ: Isolation of organisms related to *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.* 16:543, 1968.