

# *Vibrio vulnificus* 분리율에 대한 SPS Agar와 SGP Broth의 사용 및 검체 저장의 영향

연세대학교 의과대학 임상병리학교실<sup>1</sup>·원광보건전문대학<sup>2</sup>

정윤섭<sup>1</sup>·이삼열<sup>1</sup>·김신무<sup>2</sup>

=Abstract=

## Effect of Use of SPS Agar and SGS Broth and Storage of Specimen on the Isolation of *Vibrio vulnificus*

Yunsop Chong; Samuel Y. Lee<sup>1</sup> and Shin Moo Kim<sup>2</sup>

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea<sup>1</sup>  
and Wonkwang Junior College, Eree, Korea<sup>2</sup>

*Vibrio vulnificus* septicemia is not rare disease in Korea. Carriage rate of the organism by shellfish is not well known. In this study performance of SPS agar and SGP broth and effect of storage of specimen in the isolation was determined using the shellfish specimens collected from the coast and market of Koonsan city. Isolation rate was similar with TCBS and with SPS, but the rate became much higher after enrichment in SGP broth. 80% of oyster speimes were positive when inoculated immediately, but the rate dropped rapidly after storage of specimens at freezing temperature for sometime. All of the isolates fermented lactose in 2 days. A few isolates were not identifiable with API 20E system, because of acid production from melibiose. Serover 04 was the frequent isolates.

**Key Words:** *Vibrio vulnificus*, SPS agar, SGP broth.

### 서 론

*Vibrio vulnificus*는 장외감염을 일으키는 것이 특징인 *Vibrio*균종이다<sup>8,9</sup>. 이 세균에 의한 치명적인 감염이 우리나라에서는 드물지 않게 생기고 있다<sup>4,10</sup>. 이 세균의 감염을 예방하기 위하여는 해수나 해산물중의 이 세균분포를 파악하여야 하지만 이러한 연구가 우리나라에서는 많지 않다. 그 이유는 이 세균을 분리하기가 환자검체에서는 어렵지 않으나, 해수나 해산물에서는 함께 존재하는, 집락형태가 유사한 *V. parahaemolyticus*등 *Vibrio*때문에 용이하지 않기 때문이다. 정등은 서울의 한 시장에서 채취한 검체중에서의<sup>4</sup>, 송등은 전국해안에서 채취한 검체에서의 이 세균의 분리율이 낮음을 보고한 바 있다. Kitaura 등은 soluble starch-gelatin-polymixin B(SGP) broth와 sodium dodecyl sulfate-polymixin B sucrose(SPS) agar를 만들었으며, 이 배지를 사용하면 *V. vulnificus*의 분리가 용이함을

보고하였다. 한편 김등<sup>11</sup>은 군산지역에서 채취한 해산물에서 *V. vulnificus*를 분리하기 위해 이 배지를 사용하였고, 그 분리율이 대단히 높음을 보고하였다.

저자들은 이 연구에서 SGP broth와 SPS agar의 *V. vulnificus*분리를 위한 효과와, 검체의 냉장이나 냉동이 이 세균의 분리에 미치는 영향을 검토하고, 또한 군산지방에서 채취한 해산물에서의 분리율을 조사하고자 하였다.

### 재료 및 방법

중균배지인 SGP broth는 1리터당 soluble starch 10 g, gelatin 10 g, NaCl 20 g, polymixin B 150,000U를 넣고 pH를 7.6으로 맞춘뒤에 시험관에 10 ml를 분주하였다. 선택배지인 SPS agar는 proteose pepton 10 g, beef extract 5 g, sucrose 15 g, NaCl 20 g, sodium dodecyl sulfate 1 g, polymixin B 100,000U, bromthymol blue 0.04 g, cresol red 0.04 g, agar 15 g

을 넣고 녹인후에 pH를 7.6으로 맞추고 평판배지를 만들었다<sup>18)</sup>. TCBS agar(Difco)는 통상방법으로 만들었다.

굴 검체는 1986년 7월 24일 군산의 해안에서 접질이 붙은채로, 채취하였고, 그중의 일부는 즉시 시험에 사용하였고, 일부는 가정용 냉장고를 써서 냉장 또는 -15°C에 냉동하였다가 시험에 사용하였다. 시장에서 구입한 피조개 4, 대합 3, 바지락 2,

꼬막 3, 모시조개 2, 들게 3, 꽃게 2개는 수집 즉시 시험에 사용하였다.

어패류는 1개를 1검체로 하였다. 굴이나 조개는 외부를 알팔면으로 닦고 접질을 깐후에 채액을 면봉에 묻혀서 TCBS와 SPS에 도말하고 백금으로 획선했었다. SGP에는 채액과 조직을 넣고 하룻밤 배양후에 SPS와 TCBS에 면봉으로 도말하고 백금으로 획선했었다. 배양은 35°C에서 하였다.

**Table 1.** Isolation rate of *V. vulnificus* by method of culture

Storage	Specimen (No.)	No. (%) of positive specimen				Total
		Direct inoculation		SGP enrichment		
		TCBS	SPS	TCBS	SPS	
Immediate inoculation	Oyster (10)	3 (30)	4 (40)	8 (80)	8 (80)	8 (80)
	Clam and others (20)	0	0	0	1 (5)	1 (5)
	Subtotal (30)	3 (10)	4 (13)	8 (27)	9 (30)	9 (30)
Refrigeration, 15 d	Oyster (15)	2 (13)	0	6 (40)	7 (47)	9 (60)
Total	(45)	5 (11)	4 (9)	14 (31)	16 (36)	18 (40)

**Table 2.** Efficiency of various culture methods determined by the number of TSI agar tubes used for screening *V. vulnificus*

Storage	Specimen (No.)	TSI	Direct inoculation		SGP enrichment		Total
			TCBS	SPS	TCBS	SPS	
Immediate inoculation	Oyster (10)	Inoculation	11	8	26	19	64
		Positive	5	4	14	16	35
		%	45	50	54	84	55
	Clam and others (20)	Inoculation	35	2	19	4	60
		Positive	0	0	0	1	1
		%	0	0	0	25	2
	Subtotal (30)	Inoculation	46	10	45	23	124
		Positive	5	4	14	17	36
		%	11	40	31	74	29
Refrigeration, 15 d	Oyster (15)	Inoculation	33	0	45	15	93
		Positive	2	0	9	14	27
		%	6	0	20	93	29
Total (45)	Inoculation	79	10	90	38	217	
	Positive	7	4	23	31	63	
	%	9	40	26	82	29	

**Table 3.** Effect of storage of oyster on the isolation of *V. vulnificus*

Storage	No. of specimen	Positive specimen	
		No.	%
Immediate inoculation	10	8	80
Refrigeration 15d	15	9	60
Freezing 35d	15	2	13
Freezing 47d	10	0	0

TCBS에 생김 집락은 녹색인 것을, SPS에서는 백색침전으로 둘러싸인 것을 선별대상으로 하였다. 한개의 평판에서는 집락 10개까지를 선별대상으로 하였다. 대상집락을 TSI agar에 접종하고 그 반응이 알칼리성 사면과 산성고층이고 oxidase 양성, ONPG 시험 양성인 것을 재래식방법 및 API 20E (Analytab Products, Plainview, N.Y.)을 써서 동정하였다. 일부 균주에 대해서는 혈청군의 동정이 일본 NIH에 의해서 시험되었다.

## 성 적

검체채취 즉시 및 15일간 냉장후에 배양한 결과에서(Table 1), 직접 접종된 TCBS에서는 11%의 검체에서, SPS에서는 9%에서 *V. vulnificus*가 분리되었다. SGP에 증균후 접종된 TCBS에서는 31%에서, SPS에서는 36%에서 분리되었다.

*V. vulnificus*를 분리하기 위해 사용한 TSI의 수와 분리양성수의 비율을 보면(Table 2), 직접접종된 TCBS에서는 79개가 사용되어서 7주(9%)가, SPS에서는 10개가 사용되어서 4주(40%)가 분리되었다. SGP 증균후에 접종된 TCBS에서는 90개가 사용되어 23주(26%)가, SPS에서는 38개가 사용되어서 31주(82%)가 분리되었다. 굴 검체의 저장이 *V. vulnificus*의 분리율에 미치는 영향을 보기 위한 시

**Table 4.** Cultural characteristics of *V. vulnificus* isolates

Characteristics	% of isolates from:	
	Shellfish (n=17)	Patient (n=13)
Indole	100	100
Voges-Proskauer	0	0
Citrate, Simmons	77	92
H <sub>2</sub> S, TSI	0	0
Urease	0	0
Phenylalanine deaminase	100	100
Arginine dihydrolase	0	0
Lysine decarboxylase	100	100
Ornithine decarboxylase	100	100
Gelatin hydrolysis	100	100
Acid from Adonitol	0	0
Arabinose	0	0
Cellobiose	100	100
Dulcitol	0	0
Erythritol	0	0
Galactose	100	100
Glycerol	43	60
Inositol	0	0
Lactose	100	100
Maltose	100	100
Mannitol	94	100
Mannose	100	100
Melibiose	24	8
Raffinose	0	0
Rhamnose	0	0
Salicin	100	85
Sorbitol	0	0
Sucrose	0	0
Trehalose	100	100
Xylose	0	0
Esculin hydrolysis	100	100
ONPG test	100	100
Growth in nutrient broth with:		
0 % NaCl	0	0
6 % NaCl	78	89

**Table 5.** Identification of *V. vulnificus* by API 20E

API 20 code	No. of isolates from:		
	Shellfish	Patient	Total
5046005	1	0	1
5046105	0	1	1
5146105	4	5	9
5246105	1	0	1
5346105	7	4	11
5146045*	0	1	1
5146145*	2	0	2
5346145*	2	0	2
Total	17	11	28

\*No identification.

험에서(Table 3), 그 양성율은 즉시 접종한 경우에는 80%, 15일간 냉장한 경우에는 60%, 35일간 냉동했던 경우에는 13%이었다. 47일간 냉동했던 15개의 검체에서는 이 세균이 분리되지 않았다.

어패류와 환자에서 분리한 균주의 생화학적 반응은 비슷하였다(Table 4). 즉 전균주가 양성 혹은 음성반응을 보이지 않은 시험은 citrate 이용능, glycerol, mannitol, melibiose, salicin에서의 산생성, 6% NaCl 첨가배지에서의 증식이었다. ONPG 시험은 모두가, lactose에서의 산생성은 2일 배양후에는 모두가 양성이었다.

API 20E에 의한 동정결과는(Table 5) 어패류에서 분리된 17주중 13주는 *V. vulnificus*로 동정되었으나 4주는 melibiose가 양성이므로 동정이 되지 않았다. 환자에서 분리된 균주 11주중의 1주도 melibiose에서 산생성이 되어 동정이 되지 않았다. code는 패류에서 분리된 균주나 환자에서 분리된 균주나 5146105와 5346105가 가장 많았다. 패류에서 분리된 *V. vulnificus*의 혈청군은(Table 6) serovar 01과 02는 각각 2주, 04는 5주, 06와 07이 각 1주, serovar 동정이 되지 않은 것이 3주이었다. 그동안 환자에서 분리된 균주의 serovar 중에서는 04가 5주로 가장 많았고, 그밖에 01, 05, 07, 09가 각 1주이었다.

## 고 찰

*V. vulnificus* 감염이 우리나라에는 드물지 않으며, 1985년까지 보고된 증례만도 적어도 48례가 된다고 생각되고 있다<sup>14</sup>. 이 세균의 해수나 해산물에서의 분리율은 다른 *Vibrio*보다 낮다고 보고되어 있었다. 즉 외국의 연구에서는 Kaneko와 Cold-

**Table 6.** Comparison of serovars of *V. vulnificus* isolated from shellfish and from patients

Serovar	No. of isolates from:		
	Shellfish	Patient	Total
O1	2	2	4
O2	2	0	2
O3	0	0	0
O4	5	6	11
O5	0	1	1
O6	1	0	1
O7	1	1	2
O9	0	1	1
Ungroupable	3	0	3
Total	14	11	25

well<sup>15</sup>, Feeley와 Balows<sup>16</sup>, 및 Bauman 등<sup>7</sup>의 결과에서 낮은 분리율을 엿볼 수 있다. 국내의 결과에서도 정등<sup>4</sup>, 송등<sup>5</sup>, 주와 김<sup>6</sup>은 그 분리율이 낮음을 보고하였는데, 이는 *V. vulnificus*의 진정한 분포를 보인 것인지 혹은 그 분리가 어렵기 때문인지 알 수가 없다. 그러나 Kitaura<sup>15</sup> 등은 SGP 증균배지와 SPS 선택배지를 사용해서 그 분리율이 높음을, 김과 김<sup>6</sup>은 군산지방의 해산물에서의 분리율이 높음을 보고하여 특정지역에서 채취되는 해산물 중에는 이 세균이 흔히 존재하며, 배양방법에 따라서 그 결과가 달라질 수 있음을 시사하였다. 이 결과에서도 군산에서 채취한 굴에서의 *V. vulnificus* 분리율은 대단히 높았으며, 검체에 따라서는 이 세균의 보급율이 높음을 확인할 수 있었다.

직접 접종된 TCBS와 SPS에서의 결과를 볼 때 TCBS나 SPS 중의 어느 것을 이용하거나 그 결과는 비슷하였다. 또한 SGP에 증균을 거친 후에 접종한 이들 배지에서도 그 결과는 비슷하였다. 그러나 직접 접종한 TCBS와 SGP에 증균한 후 접종한 TCBS를, 또한 직접 접종한 SPS와 SGP 증균후에 접종된 SPS를 비교할 때 그 양성율은 각각 3배와 4배로 되었다. 이 결과로 SGP가 *V. vulnificus*의 양성율을 현저히 높임을 알 수 있었다.

선별을 위해 사용한 TSI 중 *V. vulnificus* 양성인 수를 볼 때(Table 2), TCBS에서는 더 많은 TSI를 사용하여야 비슷한 수의 양성결과를 얻을 수 있었다. 즉 직접 접종한 TCBS에서는 9%의 TSI에서 양성결과를 얻을 수 있었다. SGP 증균후의 TCBS에서는 26%의 TSI에서 양성결과를 얻을 수 있었던 반면에, SPS에서는 82%에서 양성결과를 얻을 수 있었다. 즉 SPS를 사용할 때는 TSI의 낭비없이 *V. vulnificus*를 분리할 수 있다고 하겠다. 그러나 SPS

는 선택성이 낮아서 다른 세균의 집락이 많이 형성되었으며, 이러한 집락의 형성이 억제된다면 *V. vulnificus*의 분리는 더 용이할 것으로 생각되었다.

*V. vulnificus*를 냉동하면 완전히 살균되지 않으며, 그 수가 약간 감소됨이 보고된 바 있다<sup>16)</sup>. 해산물의 보존중에 *V. vulnificus*가 감소되어서 그 분리율이 낮아지는지를 보기 위한 시험에서, 15일간 냉장한 검체에서의 분리율은 60%로 즉시 배양한 양성율의 80%와 크게 다르지는 않았다. 그러나 35일간 냉동한 검체에서의 양성율은 13%에 불과하였고, 47일간 냉동한 검체에서는 세균분리에 실패하였다. 이것은 해산물에서 *V. vulnificus*분리를 시도할 때는 장기간 냉동한 검체는 부적당함을 보인 것이라 하겠다. 이러한 냉동이 이 세균을 살균하여 어패류를 생식하기에 안전케 하는 것으로 생각해서는 안될 것이다. 저자는 *V. vulnificus*를 탈지유에 부유시켜서 -20°C 이하에 수년간 보존할 수 있음을 경험하고 있다.

CDC의 자료<sup>17)</sup>에 의하면 *V. vulnificus*의 일부 생화학적 성상은 균주에 따라서 차이가 크다. 특히 48시간 배양후의 결과는 lactose에서의 산생성이 85%에 불과하며, ONPG 시험도 75%만이 양성이고, mannitol에서의 산생성도 45%, ODC가 55%이며, 6% NaCl배지에서의 증식도 65%이다. 그러나, 저자가 시험한 균주의 성상은 그 반응이 비교적 균일하였다. 즉 48시간 배양후에 모든 균주가 ONPG 양성, lactose에서 산생성, ODC양성이었다. 그러나 6% NaCl 배지에서의 증식은 분명한 결과를 얻기가 어렵고, 78%의 균주만이 양성결과를 보였다. 이와 같이 거의 모든 균주가 비슷한 성상을 보인 것은 시험균주수가 적기 때문이거나 비교적 국한된 지역에서 분리된 균주이기 때문으로 생각된다. API 20E의 code도 그다지 다양하지 않았다. 그러나 어패류에서 분리한 균주중 4주는 melibiose양성이기 때문에 동정이 되지 않았다. 이 4균주중의 3주는 serovar 1, 2, 7이었다. CDC의 자료는 40%의 균주가 melibiose양성으로 수록되어 있다. 이러한 결과는 자연계에서 분리된 균주의 동정에 있어서 CDC의 생화학적 성장표를 잘못 이용하면 다른 *Vibrio* 균종을 *V. vulnificus*로 잘못 동정할 가능성이 있고, API 20E를 잘못 이용하면 *V. vulnificus*를 다른 균종으로 잘못 동정할 가능성이 있음을 보인 것이라고 하겠다.

어패류에서 분리한 *V. vulnificus*의 serovar는 04가 가장 많았는데, 이것은 환자에서도 가장 자주 분리된 형이다. 03는 어패류에서도 환자에서도 분리된 것이 없었고, 어패류에서 분리된 3주는 혈청

형이 동정되지 않았다. 한편, 주와 김<sup>18)</sup>은 남해안 해수와 해안에서 01 1주, 07 2주를 분리하였고, 동시에 분리한 12주는 혈청형이 동정되지 않았음을 보고하였다.

## 결 론

군산시에서 1986년 7월에 채취한 검체를 사용한 연구에서, 직접 접종한 경우에는 사용한 배지가 SPS이든 TCBS이든 *V. vulnificus*의 분리율이 낮고, SGP에서 증균한 후에는 그 양성율이 현저히 높아지며, SPS를 사용할 때는 적은 수의 TSI를 사용하여도 TCBS에서와 비슷한 양성결과를 얻을 수 있고, 장기간 냉동한 검체는 이 세균의 분리에 부적당하며, lactose 음성인 분리주는 없고, API 20E로는 동정안되는 균주가 있으며, serovar는 04가 비교적 많고, 검체에 따라서는 *V. vulnificus*의 분리율이 대단히 높다는 결론을 얻었다.

*V. vulnificus*분리주의 혈청균을 동정한 일본 NIH의 Dr. Toshio Shimada에게 감사드린다.

## 참 고 문 헌

- 1) 구정순, 김대원, 한규섭, 석종성, 박명희, 김상인: Lactose fermenting *Vibrio*(*Vibrio vulnificus*) 패혈증 5례. 대한병리학회지, **16**:463, 1982.
- 2) 김신무, 김현숙: 어패류에서 *Vibrio vulnificus*의 분리. 대한임상병리사회지, **17**:78, 1985.
- 3) 송철, 손준용, 이길운, 경재창, 박만석, 박강수, 이인택, 김병훈, 김영자: 비브리오균속 질환의 세균학적 조사연구(1984). (1) 우리나라 연안의 비브리오균속 분포에 관한 연구. 국립보건원보, **21**:117, 1984.
- 4) 정운섭, 전명숙, 정혜경, 권오현, 이삼열: 어패류에서의 *Vibrio vulnificus* 분리. 대한미생물학회지, **19**:73, 1984.
- 5) 조남중: 국내 *Vibrio vulnificus* 감염증의 역학 및 임상상. 대한의학협회지, **29**:69, 1986.
- 6) 주진우, 김 일: 한국 남해안 일대의 해수 및 해산물에서 *Vibrio vulnificus*의 분리에 관한 연구. 대한미생물학회지, **21**:97, 1986.
- 7) Bauman P, Bauman L and Reichelt JL: Taxonomy of marine bacteria: *Beneckeia parahaemolytica* and *Beneckeia alginolytica*. J. Bacteriol. **113**:114, 1973.

- 8) 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.
- 9) Blake PA, Weaver RE and Hollis DG: Disease of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Ann Rev. Microbiol.* **34**:341, 1980.
- 10) 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.
- 11) Farmer JJ, III, Hickman-Brenner FW and Kely MT: *Vibrio*. in Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Jr., Shadomy HJ(ed.) *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed., *Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C., 1985, p. 282.*
- 12) Feeley JC and Barlows A: *Vibrio*. in Lennette EH, Barlows A, Spaulding EH, Truant JP(ed.) *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd ed., *Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., 1974. p. 238.*
- 13) Kanneko T and Colwel R: Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *J. Bacteriol.* **113**:24, 1973.
- 14) Kim JJ, Yoon KJ, Yoon HS, Chong, Y, Lee SY, Chon CY and Park IS: *Vibrio vulnificus* septicemia: Report of four cases. *Yonsei Med. J.* **27**:307, 1986.
- 15) Kitaura T, Doke S, Azuma I, Imida M, Miyano K, Harda K and Yabuuchi E: Halo production by sulfatase activity of *V. vulnificus* and *V. cholerae* 01 on a new selective sodium dodecyl sulfate-containing agar medium: a screening maker in environmental surveillance. *FEMS Microbiology Letters.* **17**:205, 1983.
- 16) Rhee J-H and Chung S-S: Survival of *Vibrio vulnificus* in sea water and ark shell (*Scapharca broughtonii*) broth under refrigeration (4°C) and freezing (-20°C). *대한미생물학회지*, **20**:267, 1985.
- 17) Shimada T and Sakazaki R: On the serology of *Vibrio vulnificus*. *Japanese J. Med. Sci. Biol.* **37**:241, 1984.