

Sucrose 발효 및 비발효 *Vibrio vulnificus* 균주의 생물학적 및 유전학적 성상 비교

원광보건대학 임상병리과¹, 전북보건환경연구원 미생물부², 순천대학교 대학원 생물학과³
전주대학교 대학원 생물학과⁴, 원광대학교 의과대학 전정와우 연구센터⁵, 피부과교실⁶

김신무^{1*} · 소향아² · 송계민³ · 이영엽⁴ · 임채원¹ · 이재형⁵
소홍섭⁵ · 김진경⁵ · 박래길⁵ · 박석돈⁶

Comparison of Biological and Genetic Characteristics Between Sucrose-Fermenting and Sucrose-Nonfermenting *Vibrio vulnificus* Isolates

Shin-Moo Kim^{1*}, Hyang-Ah So², Kye-Min Song³, Young-Youp Lee⁴, Chae-Won Lim¹,
Jae-Hyung Lee⁵, Hong-Seob So⁵, Jin-Kyung Kim⁵, Rae-kil Park⁵ and Seok-Don Park⁶

¹Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-750, Korea;

²Department of Microbiology, Jellabukdo Institute of Health & Environmental, Jeonju 561-844, Korea;

³Department of Biology, Graduate School, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea;

⁴Department of Biology, Graduate School, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea;

⁵Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology and

⁶Dermatology, Wonkwang University School of Medicine, Iksan 570-749, Korea

Received : October 28, 2006

Accepted : December 4, 2006

Twelve strains of *V. vulnificus* isolated from clinical specimens in 2002~2004 in Jeollado province were determined for their biologic groups, serotypes, presence of *vvhA* (hemolysin/cytolysin) gene, DNA sequence, and PFGE patterns of NotI-restricted genomic DNA. The following results were obtained. All 12 isolates were biogroup 1, and API 20E profiles were: 5146105 for 5 (41.7%) isolates, and 5148125 for 2 isolates with sucrose fermentation. Ten (83.3%) of the 12 isolates was *V. vulnificus* serotype O4A, and two sucrose-fermenting isolates belonged to serotype O2. Alleles of cytolysin-hemolysin gene were detected in all 12 isolates. The nucleotide sequences of *vvhA* genes from strains WKHC 212 and WKHC 221 showed 94~97% similarity compared with those from previously reported 7 strains, YJ016, CMCP6, L-180, CDC B3547, IF Vv10, CIP 75.4T and CNRVC 970121. PFGE of NotI-restricted genomic DNA from the 12 isolates showed approximately 48.5 to 873-kb fragments and they were clustered to five (A to E) patterns. Two sucrose-fermenting isolates belonged to pattern D with 95% similarity with each other. Two strains isolated from two different patients had two identical patterns C and D. It is concluded that sucrose-fermenting strains also exist among clinical isolates of *V. vulnificus* in Korea, and they can be identified by using API 20E system, and by detecting *vvhA* gene. DNA sequences and PFGE pattern of NotI-restricted genomic DNA suggested that the two sucrose-fermenting isolates belonged to an identical clone, and two strains each isolated from two different patients belonged to two identical clones.

Key Words: Sucrose-fermenting, *Vibrio vulnificus*, Biological, Genetic characteristic

*교신저자: 김신무. 570-750 전라북도 익산시 신룡동 344-2, 원광보건대학 임상병리과

Phone: +82-63-840-1211, Fax: +82-63-840-1219, e-mail: smkim@wkhc.ac.kr

**본 연구는 2006년도 원광보건대학 학술연구지원비에 의해 이루어진 것임.

서 론

*Vibrio vulnificus*는 생화학적 성장과 혈청학적 특성에 따라 3개의 생물군 (biogroup)인 *V. vulnificus* biogroup 1, 2 및 3으로 분류 (6,7,11)하며, 해수 등 해양환경에 서식하는 생물군 1형은 1976년 Reichelt 등 (1976)이 보고한 이래 여러 가지 감염, 즉, 치명율이 높은 원발성 패혈증과 치명율이 비교적 낮은 원발성 창상감염을 일으킴이 보고되었다 (37). 우리나라에서 생기는 원발성 패혈증은 주로 선행 간질환을 가진 40~60대 환자가 90% 이상이고, 남자가 여자 보다 5.6배 많으며 (4), 주로 굴 등 어패류를 생식하여 감염되고, 흔히 대수포와 근육의 괴사를 동반한다 (31). 원발성 창상감염은 상처가 어패류나 해양환경에 노출되어 일어나며, 우리나라에서는 흰썩드물고 1예가 보고되었다 (3,16). *V. vulnificus* 감염은 우리나라에서 매년 6월에서 11월 사이에 발생하며, 특히 8~9월에 발생이 가장 많은데, 2000년부터 2003년까지는 202명이 발생하여 50%가 사망하였다 (4). 한편 *V. vulnificus* biogroup 2는 1982년에 Tison 등이 병든 뱀장어에서 분리하여 처음 보고하였고, 1995년 Amaro와 Biosca (5)는 이 생물형에 의한 사람의 창상감염을 보고하였다. *V. vulnificus* biogroup 3는 1999년에 Bisharat 등 (11)이 이스라엘의 연못 어류 (tilapia)에 노출되어 발생한 창상감염과 균혈증 환자로부터 분리하여 보고하였다. 그러나 우리나라에서 보고된 것은 생물군 1 뿐이다 (1~3).

V. vulnificus 균주의 감별에는 종종 혈청형 (serotype)이 이용되는데 김 등 (1991)은 우리나라에서 임상검체나 어패류에서 분리된 균주 중에 O4A형이 가장 많다고 하였다. 또한 *V. vulnificus* 균주는 API 20E system (API systems, La Balme-Les Grottes, France) 등으로 전통적인 생화학적 성상을 시험할 때 그 생물형이 다양한 것으로 알려져 있다 (2,29).

임상검체에서 분리된 *V. vulnificus* 균주의 동정 혹은 역학 조사를 위하여 restriction fragment length polymorphism (RFLP) (14), cellular fatty acid (CFA) 성분 (32), random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석 (7,28), ribotyping (7,8), RAPD-PCR (19), amplified fragment length polymorphism, DNA sequence analysis (8) 및 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 등 (26, 29)이 이용될 수 있음이 보고되었다.

이 연구에서는 임상검체에서 분리된 *V. vulnificus* 12주에 대해서 전통적인 방법에 의한 생물군, 혈청형, *vwhA* (hemolysin/cytolysin) 유전자 검출, DNA 염기서열분석 및 PFGE 유전자형을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험균주

V. vulnificus 균주는 2002년부터 2004년까지 전북 보건환경연구원에서 공시된 4주 (VV-208, 208, 210, 211), 전남의대 미생물학교실에서 6주 (VV-198, 205, CN1, CN2, CN3, CN4), 전남지역 종합병원의 임상검체에서 분리된 2주 (VV-212, 221) 및 ATCC 27562 균주를 사용하였고, 염기서열분석에 사용된 7균주는 Genbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.)에 등록된 7균주인 *V. vulnificus* YJ016, CMCP6, L-180, CDC B3547, IF Vv10, CIP 75.4T 및 CNRVC 970121를 이용하였다.

균주는 하룻밤 배양된 집락을 15% glycerol-BHI (2% NaCl 포함) 배지에 넣어 -70℃에 냉동 보관하였다가 시험에 사용하였다. 시험하는 동안에는 modified salt water yeast extract (MSWYE) 한천배지에 천자 점종 후 37℃에 하룻밤 배양 후 25℃에 보관하면서 사용하였다.

2. 분리된 균주의 동정

임상검체에서 분리된 균주의 동정은 API 20E system (API system, La Balme-Les Grottes, France), 혈청형 (serotyping) 및 polymerase chain reaction (PCR)에 의한 *vwhA* 유전자 검출에 의하여 실시하였다. 혈청형 시험은 37℃에 하룻밤 배양된 집락을 식염수에 부유시키고 100℃에서 1시간 30분 가열 후 식염수로 2회 씻어낸 항원을 써서, 토끼를 면역시켜 만든 *V. vulnificus* 항혈청 (O1~O14, R)을 이용하여 슬라이드 응집반응을 시행하였다.

3. PCR에 의한 *vwhA* 유전자 검출

Hill 등의 방법 (12,18)에 따라 PCR법을 이용하여 *V. vulnificus* 균주의 *vwhA* 유전자를 검출하였다. Mueller-Hinton 한천배지에서 배양된 집락을 증류수에 부유하여 10분간 끓여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층을 PCR의 주형으로 사용하였다. 사용된 primer의 염기서열은 forward는 5'-ACA AAA GAC TAT CGC ATC AAC AAC C-3'이고, reverse는 5'-GTC ACC GTT CTC ACC ATA AAC ATC C-3'이며, Genotek Co.(Korea)에 의해 합성하였다. *V. vulnificus* ATCC 27562를 대조균주로 사용하였고, forward와 reverse primer Mix 2 µl, PCR master mix (dNTP, Taq polymerase, MgCl₂) 4 µl, 8-MOP 12 µl, DNA 2 µl를 넣어 PCR 반응의 총량을 20 µl로 하여 시행하였다.

PCR 반응은 thermal cycler (GeneAmp PCR system, Perkin-Elmer Cetus, Ca)를 사용하였고, 반응조건은 94℃에서 5분간

반응시켜 주형 DNA를 예비변형 시킨 후, 94℃에서 1분간 변형시켰고, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분간 30회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분간 반응시킨 후 4℃에서 중합반응을 종료시켰다. 반응 후 생성물은 2% agarose gel에서 영동하여 결과를 확인하였다.

4. *vvhA* 염기서열분석

vvhA 유전자의 PCR 산물은 PCR purification kit (CoreBio-System Co., Seoul, Korea)로 처리하였고, DNA 염기서열은 Genotech Co.(Taejon, Korea)에 의뢰하여 시험하였으며, Edit-Seq and SeqMan software (Lasergene System, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)로 alignment를 실시하였으며, 염기서열 분석과 동형 염기서열에 대한 database의 검색은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST network service 프로그램을 이용하였다.

5. PFG에 의한 유전자형

Mold의 제작은 Pulse-Net PFGE (Pulse-Net; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) 방법을 따랐다 (26). Agarose plug 제작을 위해서 각 균주들을 Mueller-Hinton agar (MHA, Difco)에 희석 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 실험을 시작하기 전에 멸균증류수, plug wash TE buffer와 1.2% plug용 agarose (SeaKem gold, Camblex Bio Science Rockland, Inc. Rockland, Me USA)를 준비하여 55℃ 항온수조에 보관하였다. 시험균주 1에 대하여 12×75 mm 시

험관 1개, 1.5 ml과 2 ml 용량의 microcentrifuge 시험관 각 2개, plug mold 2 well 썩을 준비하였다. 멸균면봉으로 MHA

Table 1. Biochemical characteristics of the three biogroup strains of *V. vulnificus*^a

Test	Biogroup ^b		
	1	2	3 (Israeli vibrio)
Oxidase	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	55	-	+
Indole	+	-	+
Citrate (Simmons)	(+)	+	-
ONPG	(+)	+	-
Cellobiose	+	+	-
D-mannitol	45	-	-
Lactose fermentation	(+)	+	-
Salicin fermentation	+	+	-
D-sorbitol fermentation	-	+	-

^a Adapted from Bisharat et al. (1999)

^b Symbols: +, most (90% or greater) strains positive; (+), many strains (75 to 89.9%) positive; -, most strains negative (10% or less are positive), Numbers give the actual percentage of strains that are positive.

^c ONPG, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

Table 2. Serotypes, biochemical characteristics and cytotoxin gene of the *V. vulnificus* isolates

Strain no.	Source	Isolation area and year	Serotype	API20 E profile	Acid from		<i>vvhA</i> gene
					Cellobiose	Sucrose	
VV-198	Unknown	Chonnam, 2002	O4A	5146105	+	-	+
VV-205	Unknown	Chonnam, 2002	O4A	5346105	+	-	+
VV-208	Wound pus	Chonbuk, 2003	O4A	5146105	+	-	+
VV-209	Wound pus	Chonbuk, 2003	O4A	5346045	+	-	+
VV-210	Blood	Chonbuk, 2003	O4A	5146105	+	-	+
VV-211	Blood	Chonbuk, 2003	O4A	5146005	+	-	+
VV-212	Blood	Chonnam, 2003	O2	5146125	+	+	+
VV-221	Blood	Chonnam, 2004	O2	5146125	+	+	+
VV-CN1	Unknown	Chonnam, 2003	O4A	5146105	+	-	+
VV-CN2	Unknown	Chonnam, 2003	O4A	5146105	+	-	+
VV-CN3	Unknown	Chonnam, 2003	O4A	5146106	+	-	+
VV-CN4	Unknown	Chonnam, 2003	O4A	5146005	+	-	+

평판배지에 배양된 집락의 일부를 폴리에틸렌 시험관에 2 ml의 cell suspension TE를 넣고 여기에 *V. vulnificus* 집락을 넣어 20% 투과도 (OD 0.5, 625 nm)로 조정하였다. 이 과정이 길어지면 세균이 용균될 수 있으므로 처리능력에 맞추어 한 번에 만들 plug수를 정하였다.

세균 현탁액 200 µl를 1.5 ml microcentrifuge 시험관에 옮긴 다음 proteinase K (20 mg/ml) 10 µl를 넣었다. 이 시험관에 준비한 1.2% plug용 agarose 혼합액 200 µl를 넣고 micropipette로 천천히 4회 정도 섞은 후, 바로 plug mold에 넣었다. DNA가 손상되지 않게 하기 위하여 섞는 횟수를 제한하거나 심하게 섞지 않도록 하였다. Plug mold를 4°C에서 5분 정도 굳혔다. 이 동안에 ES buffer 1.5 ml과 proteinase K 40 µl (20 mg/ml)를 2 ml microcentrifuge 시험관에 준비하였다. 굳힌

plug를 plug mold에서 꺼내어 미리 준비해 둔 ES buffer로 옮기고 55°C 진탕 항온수조에서 45분~1시간 처리하였다. Plug를 미리 55°C로 맞춘 멸균증류수가 든 시험관에 넣고 55°C 진탕 항온수조에서 15분간 세척하였다. 증류수를 버리고 미리 50°C로 가온한 세척용 완충용액인 plug wash TE buffer를 넣어 55°C 진탕 항온수조에서 15분간씩 3회 처리하였다. 이 때 세척용 완충용액의 온도는 50°C로 유지하였으며, 세척시간은 필요에 따라서 각 회당 1시간 까지 연장하였다. 세척이 끝난 plug를 에탄올로 닦은 면도날로 1 mm 두께로 자르고, 2개의 절편을 1.5 ml microcentrifuge 시험관에 넣고, 1.5 ml microcentrifuge 시험관에 NotI이 들어있는 용액 100 µl를 넣고 여기에 1 mm 두께의 plug 절편 2개를 넣은 다음, 2시간 반응시켰다. 제한효소 반응액은 다음과 같이 제조하였

WKHC 221	TGATTTTGATATTTTCATTCGAGCGTGAATTTGGGGAATGTGATGAACTGCGT	710 ^a
YJ016	-----	
L-180	-----	
CMCP6	-----G-----T-----G-----C-----	
WKHC 212	-----G-----T-----G-----C-----	
CDC B3547	-----G-----T-----G-----C-----	
IF Vv10	-----G-----T-----G-----C-----	
CIP 75.4T	-----G-----T-----G-----C-----	
CNRVC970121	-----G-----T-----G-----C-----	
WKHC 221	TGGATGCTATTTTCAACGCCGCTCACTGGGGCAGTGGTTGGGTATTTGATAAGACGAAGTTCAA	773
YJ016	-----C-----	
L-180	-----C-----	
CMCP6	-----G-----	
WKHC 212	-----C-----	
CDC B3547	-----C-----	
IF Vv10	-----C-----	
CIP 75.4T	-----C-----	
CNRVC970121	-----C-----	
WKHC 221	CCCTATCTCTTATTCCAACTTCAAACCGAACTATGACGTTTTGTACGAAGCGCCTGTGTCTGA	836
YJ016	-----A-----C-----A-----	
L-180	-----C-----	
CMCP6	-----C-----	
WKHC 212	-----A-----	
CDC B3547	-----A-----	
IF Vv10	-----A-----	
CIP 75.4T	-----A-----	
CNRVC970121	-----A-----	
WKHC 221	AACTGGCGTAACGGATTTTCGAAATGGGGCGTGAAGCTCAACTATCGTGACGCTTTGGGTACCGT	899
YJ016	-----C-----G-----A-----	
L-180	-----T-----G-----A-----	
CMCP6	-----T-----G-----A-----	
WKHC 212	-----T-----G-----A-----	
CDC B3547	-----G-----A-----G-----	
IF Vv10	-----G-----A-----G-----	
CIP 75.4T	-----G-----A-----G-----	
CNRVC970121	-----C-----G-----A-----	
WKHC 221	TCTTTCCTTTCGCGCTGTTTTTCGGTTTACGGTTCTGCGGGCTCGTCAACCAACAGCAGTACCGT	962
YJ016	-----A-----C-----T-----	
L-180	-----A-----C-----T-----	
CMCP6	-----A-----C-----T-----	
WKHC 212	AA-C-----A-A-C-C-A-----T-----	
CDC B3547	AA-C-----A-A-C-C-A-----T-----	
IF Vv10	AA-C-----A-A-C-C-A-----T-----	
CIP 75.4T	AA-C-----A-A-C-C-A-----T-----	
CNRVC970121	AA-C-----A-A-C-C-A-----T-----	
WKHC 221	GAAACAACGTATTCGCATCGACTGGAATCACCCACTGTTTGAAGCTGAAGCACACGTTTACACT	1025
YJ016	-----T-----G-----G-----	
L-180	-----T-----G-----G-----	
CMCP6	-----T-----G-----G-----	
WKHC 212	-----T-----G-----G-----	
CDC B3547	-----T-----G-----G-----	
IF Vv10	-----T-----G-----G-----	
CIP 75.4T	-----T-----G-----G-----	
CNRVC970121	-----T-----G-----G-----	
WKHC 221	GCAGTCACTGAGCAACAACGATCTCTGCCTGGATGTTTATGG	1067
YJ016	-----T-----A-----	
L-180	-----T-----A-----	
CMCP6	A-----T-----A-----	
WKHC 212	A-----T-----A-----	
CDC B3547	A-----A-----A-----	
IF Vv10	A-----A-----A-----	
CIP 75.4T	A-----A-----A-----	
CNRVC970121	A-----A-----A-----	

Figure 1. Aligned nucleotide sequences of *vvhA* (hemolysin/cytolysin) genes from *V. vulnificus* VV-212, VV-221 and previously reported 7 strains (*V. vulnificus* YJ016, CMCP6, L-180, CDC B3547, IF Vv10, CIP 75.4T and CNRVC 970121).

^aNumber refer to position from the start codon in *vvhA*.

다. 반응완충액 10 µl에 BSA 1 µl와 제한효소 30 Unit을 넣어 혼합한 다음 재증류수로 100 µl 되게 채웠다. 제한효소 처리가 끝난 후 반응용액을 제거하고, plug 절편이 들어있는 시험관에 plug wash TE를 적당량 넣고, plug를 바로 PFGE에 사용하거나 4°C에 보관하였다. 전기영동을 위하여 PFGE용 agarose를 1% 되게 녹인 후 55°C 항온수조에서 보관하였다.

제한효소 처리가 끝난 plug 절편을 꺼내서 agarose gel 성형용 comb의 끝 부위에 맞춰 올려놓은 다음 여과지로 주변의 물기를 제거하고, 상온에서 15분 정도 건조시켰다. 건조시간이 15분 이상이 될 경우 유전자의 손상으로 선명한 결과를 얻을 수 없게 되므로 건조시간을 지켰다. 절편이 건조된 후 항온수조에서 보온하던 1% agarose 용액을 꺼내어 gel 성형틀 안에 부었다. 이 때 agarose 용액을 1~2 ml 정도 남겨서 다시 55°C 항온수조에 보관하였다. 1% agarose 용액이 들어있는 gel 성형틀에 plug 절편이 붙어있는 comb을 제자리에 위치시킨 다음, gel을 상온에서 약 30분 정도 굳혔다. Gel이 굳은 뒤 comb을 뽑고 well의 공간에 남겨 두었던 소량의 agarose 용액을 부어서 채웠다.

Gel을 PFGE System (CHEF DRIII; Bio-Rad Laboratories, USA)의 전기영동 cell에 넣어, initial time 1.0 sec, final time 35.0 sec으로 18시간 전기영동 하였다. 전기영동이 완료된 후 500 ml의 ethidium bromide 용액 (0.5 µg/ml)에 gel을 넣어 30분간 염색하고, 증류수로 30분씩 2회 탈색한 후 자외선 조명으로 확인하여 Gel Doc 2000 system (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italy)으로 촬영하였다.

촬영된 디지털 영상은 TIFF 파일로 저장하였고, Fingerprinting II Informatix Software (Bio-Rad)를 사용하여 DNA 유전자형을 정하였다.

결 과

1. *V. vulnificus*의 생물군과 혈청형 분류 및 *wahA* 유전자 검출

임상검체에서 분리된 *V. vulnificus* 12주는 생물군 1이었으나 2주 (16.7%)는 sucrose 발효 양성이었고, API 20E profile은 5146105가 5주 (41.7%), 5146125와 5146005는 각각 2주 (16.7%), 5346045와 5146106은 각각 1주 (8.3%)이었다. 혈청형은 O4A가 10주 (83.3%)로 가장 많았으며, sucrose양성 *V. vulnificus* 2주 (16.7%)는 O2이었다. 한편 *wahA* 유전자는 시험된 12균주 모두에서 PCR로 검출되었다 (Table 1~2).

2. Sucrose 발효 *V. vulnificus* 균주에 대한 *wahA* 유전자의 염기서열분석

Sucrose 발효 양성인 *V. vulnificus* WKHC 212주와 221주의 *wahA* 유전자의 DNA 염기서열을 GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.)에 이미 보고된 7균주 YJ016, CMCP6, L-180, CDC B3547, IF Vv10, CIP 75.4T 및 CNRVC 970121과 비교한 바 94~97%의 유사성을 보였다 (Fig. 1).

3. PFGE에 의한 유전자형

V. vulnificus 12주의 염색체 DNA를 NotI 제한효소로 절단하여 PFGE를 시행한 바 48.5~873 kb 크기인 12~18개의 절편을 보였고, 5가지 (A~E)의 유전자형으로 분류되었으며, sucrose 발효 2주 (VV212와 221)는 유전형이 D이고, VV212와 VV221 균주 사이의 유사성은 95%이었으며, 한 환자에서 분리된 2주 (W209과 W211주)는 유전형이 E, 유사성이

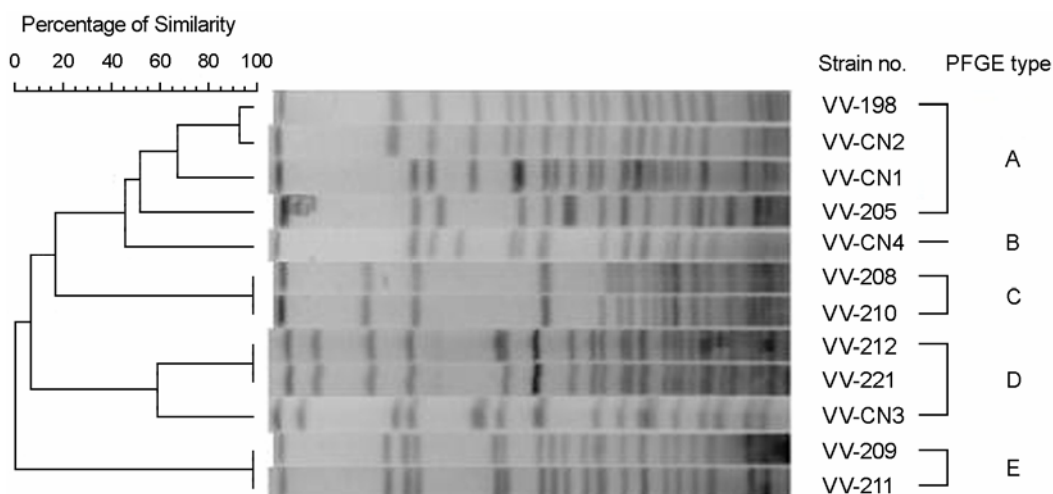


Figure 2. Dendrogram generated with Fingerprinting II informatix software showing the PFGE types (A~E) of NotI-digested chromosome DNA of 12 *V. vulnificus* isolates.

100%이었고, 또 다른 한 환자의 2주 (VV208과 210)는 유전형이 C이고, 유사성은 100%이었다. 한편 서로 다른 임상 검체이나 같은 지역에서 분리된 2주 (VV198과 CN2)는 유전형이 A이고, 유사성은 93%이었다 (Fig. 2).

고 찰

*Vibrio vulnificus*는 흔히 원발성 패혈증과 원발성 창상감염을 일으키지만, 이 밖에도 위장염, 폐렴, 뇌막염, 복막염, 자궁내막염, 각막결막 등의 다른 여러 가지 감염도 일으킨다고 보고되었다 (3,17,21,23,27,33~35). 이 세균의 동정과 역학조사를 위해서 API 20E system 등의 상품화된 키트를 이용한 생화학적 성상 (1,3,10), 혈청형 응집반응 (1,29), 신속한 유전자 검출을 위한 PCR (12,18,25), 균종이나 균종의 특이 DNA 염기서열의 동정 (24), 역학조사를 위한 PFGE 방법 (29)과 같은 분자생물학적 방법이 이용되고 있다. 혈청형 시험은 *V. vulnificus*의 신속한 동정을 가능케 하기도 하고, 이 세균의 역학적 자료도 제공한다. Shimada와 Sakazaki (1984)는 임상 검체에서 분리된 *V. vulnificus* 균주 가운데 O4형이 30%, O1형이 28%로 가장 많다고 하였고, Ryang 등 (1999)도 환자에서 분리된 95균주 중에 O4A형이 84.2%라고 하였으며, 김 등 (1991) 역시 O4A형이 임상검체에서 64%, 자연환경 균주에서는 49%로 가장 많다고 보고하였는데, 본 연구에서는 균주수가 많지 않아서 그 빈도수가 정확한 것이지는 의문이나 O4A형이 83.3%로 가장 많아 다른 보고자와 비슷한 결과를 보였다. Sucrose 발효 양성 2주는 모두 O2형이었다.

김 등 (1991)은 25명의 환자에서 분리한 *V. vulnificus* 균주 중의 3%가 sucrose를 발효하였음을 처음 보고한 이래, 김 등 (2004)이 1예의 증례보고를 하였으나 우리나라에는 이러한 성상의 균주가 매우 드문 것으로 생각된다. 외국에서는 Hollis 등 (1976)이 미국에서 분리한 38주 중에 3%, Farmer 등 (1985)은 15%, Biosca 등 (1997)은 530균주 중의 1주 (0.2%)가, Arias 등 (1998)은 20%가 sucrose 양성 균주라고 하였고, 이외에도 여러 보고가 있었다 (15,32,34). 본 연구에서 전통적 방법과 API 20E system으로 *V. vulnificus* 12주를 동정한 바 indole 양성, cellobiose 양성, ONPG 양성, sorbitol 양성 등 (Table 1~2)의 성상으로 보아 모두 전형적인 생물군 I에 속하였으나 2주 (16.7%)는 sucrose 양성이었다고, 이 세균의 분리 시기는 2003년과 2004년으로 서로 달랐으나 전남 지역에서 분리되었으며 API 20E profile 5146105, 혈청형이 O2로 각각 서로 같았으며, PFGE에 의한 유전형도 D로 같았고 유사성이 95%로 유전적으로도 같은 클론일 가능성이 높았으며, 우리나라에서도 이러한 비전형적인 sucrose 발효균주가 분리될 가능성이 있기 때문에 임상검체에서 분리되는

Vibrio 균종 동정시에는 sucrose가 양성일 때 API 20E system 등 키트나, 자동화 기계 등의 전통적 방법뿐만 아니라 PCR에 의한 *vvhA* 유전자 검출 등의 여러 시험으로 확인을 해야 하겠다.

병원 환자에서 분리되는 *V. vulnificus*는 주로 Vitek GNI 카트나 상업용 키트에 의해 동정되는데 이러한 방법들은 표현형적 특성 및 생화학적 특성의 동정법으로, 비전형 생화학적 성상인 경우에 한계가 있다. 따라서 DNA 염기서열의 분석 (sequencing)법이 균종의 동정, 변이, 독력인자, 분자역학, 항균제 내성 연구에 이용되고 있다. Yamamoto 등 (1990)은 *V. vulnificus*의 세포용해소 유전자인 *vvhA*를 이용한 염기서열을 보고하였다.

본 연구에서는 sucrose 발효균주 WKHC 212와 221의 *vvhA* 염기서열과 이미 *V. vulnificus*로 동정되어 GenBank에 등록된 7균주, 즉, YJ016, CMCP6, L-180, CDC B3547, IF Vv10, CIP 75.4T 및 CNRVC 970121의 *vvhA* 염기서열을 비교한 바 9균주는 94~97%의 유사성을 보였다.

한편 발효 음성인 염색체 DNA를 NotI 제한효소로 처리한 PFGE에서 D형이었고, 95%의 유사성을 보여 유전학적으로 밀접한 관련이 있는 클론으로 추정되었다. 또한 같은 환자의 혈액에서 분리된 2주 (VV-209와 211)는 API 20E 키트의 동정 profile이 다른 *V. vulnificus*이었으나 혈청형은 O4A로 같았으며, PFGE에 의한 유전형은 E였고 유사성이 100%로 유전적으로 같은 클론으로 확인할 수 있었다. 또 다른 2주 (VV-198과 CN2)는 같은 전남지역의 서로 다른 검체에서 분리되었으나 API 20E profile은 5146105로 같았고, 혈청형 역시 O4A로 동일하였으며, PFGE에 의한 유전형은 A로 동일하였고, 유사성이 93%이었다. 자연환경의 1개의 굴검체에서 분리된 *V. vulnificus* 여러 균주에 대한 PFGE 형은 다양한 것으로 알려졌으나 (13), 본 연구의 결과에서는 같은 환자나 같은 지역에서 분리된 *V. vulnificus* 균주는 PFGE의 유사성이 95% 이상을 보여 유전적으로 밀접한 관련이 있는 클론으로, 동일한 균주에서 유래했을 것이라는 것을 밝히는 중요한 방법으로 활용할 수 있을 것으로 생각되었다. 본 연구에서 2002~2004년에 전남지역 환자의 임상검체에서 분리된 *V. vulnificus* 12주의 생물학적 성상, 혈청형, PCR에 의한 *vvhA* 유전자 검출, DNA 염기서열분석 및 NotI 처리 염색체 DNA의 PFGE 유전자형 시험에서 다음과 같은 결론을 얻었다. *V. vulnificus* 12주는 모두 biogroup 1이었고, API 20E profile은 5146105가 5주 (41.7%)로 가장 많았으며, sucrose 발효 양성인 2주의 profile은 5146125이었으며, 혈청형은 O4A가 10주 (83.3%)로 가장 많았고, sucrose 발효 양성인 2주는 O2형이었으며, 모든 균주에서 *vvhA* 유전자가 PCR로 검출되었다. *vvhA* 유전자 염기서열 비교에서, sucrose 발효 양성인 VV-

212주와 221주는 다른 7균주 *V. vulnificus* YJ016, CMCP6, L-180, CDC B3547, IF Vv10, CIP 75.4T 및 CNRVC 970121과 상동성이 94~97%이었다. NotI 제한효소로 절단한 염색체 DNA의 PFGE에서 48.5~873 kb 범위의 절편을 보이고 5가지 (A-E)의 유전자형으로 분류되었으며, sucrose 발효인 VV-212와 VV221주의 유사도는 95%이었고, 유전형이 D이었으며, 한 환자 분리 2주, 즉 VV208과 VV210주의 유사도가 100%이었고, 유전형은 C이었으며, 또 다른 한 환자분리 2주인 VV-209와 211주도 유사도가 100%이었고, 유전형은 E이었다. 이상의 결과로 우리나라에서도 임상검체에서 비정형적인 sucrose 발효 양성인 *V. vulnificus* 균주가 분리됨이 확인되었고, API 20 E system의 사용과 PCR에 의한 *vvhA* 유전자 검출로 균종 동정이 가능하며, sucrose 발효 양성 2주는 *vvhA* 유전자의 DNA 염기서열과 NotI 제한효소 처리에 의한 PFGE로 분석 결과로 볼 때 유전적으로 같은 클론일 가능성이 높았고, 동일한 근원에서 유래한 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- 1) 김신무, 송계민, 김승아, 최수연, 임효빈, 성치남: A Case of Sucrose-Positive *Vibrio vulnificus* Isolation from Blood Culture. 대한임상감사학회지 **36**: 69-75, 2004.
- 2) 신중희, 신명근, 양동욱: *Vibrio vulnificus* 동정에 있어서 ATB32 GN system의 유용성 검토. 대한임상병리학회지 **13**: 281, 1993.
- 3) 원동일, 이경원, 정윤섭, 권오현, 김준명: *Vibrio vulnificus*에 의한 원발성 창상감염 1예. 감염 **26**: 93-97, 1994.
- 4) CDMR: 2003년 비브리오패혈증 환자의 역학 및 분리주의 특성. Communicable disease monthly report. Korea Center for Disease Control **15(5)**: 93-94, 2004.
- 5) Amaro C, Biosca EG: *Vibrio vulnificus* Biotype 2, Pathogenic for Eels, Is Also an Opportunistic Pathogen for Humans. Appl Environ Microbiol **62(4)**: 1454-1457, 1996.
- 6) Amaro C, Sanjuan E: Protocol for specific isolation virulent strains of *Vibrio* serovar E (biotype 2) from environmental samples. Appl Environ Microbiol **70(12)**: 7024-7032, 2004.
- 7) Arias CR, Pujalte MJ, Garay E, Aznar R: Genetic relatedness among environmental, clinical, and diseased-eel *Vibrio vulnificus* isolates from different geographic regions by ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR. Appl Environ Microbiol **64(9)**: 3403-3410, 1998.
- 8) Arias CR, Verdonck L, Swings J, Garay E, Aznar R: Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. Appl Environ Microbiol **63**: 2600-2606, 1997.
- 9) Arias CR, Aznar R, Pujalte MJ, Garay E: A comparison of strategies for the detection and recovery of *Vibrio vulnificus* from marine samples of the western Mediterranean coast. Syst Appl Microbiol **21(1)**: 128-134, 1998.
- 10) Biosca EG, Amaro C, Larsen JL, Pedersen K: Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio vulnificus*: proposal for the substitution of the subspecific Taxon biotype for serovar. Appl Environ Microbiol **63(4)**: 1460-1466, 1997.
- 11) Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, Raz R, Ben-Dror G, Lerner L, Soboh S, Colodner R, Cameron DN, Wykstrta L, Swerdlow DL, Farmer JJ 3rd: Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteremia in Israel. Israel *Vibrio* Study group. Lancet **354**: 1421-1424, 1999.
- 12) Branus LA, Hudson MC, Oliver JD: Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. Appl Environ Microbiol **57(9)**: 2651-2655, 1991.
- 13) Buchrieser C, Gangar VV, Murphree RL, Tamlin ML, Kaspar CW: Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oysters as demonstrated by clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol **61**: 1163-1168, 1995.
- 14) Cho JH, Ryang DW, Moon YH: Restriction enzyme analysis of chromosomal DNA and serotype of *Vibrio vulnificus* prevailed in Honam area. Korea J Clin Pathol **15**: 240-249, 1995.
- 15) Dalsgaard A, Dalsgaard I, Hoi L, Larsen JL: Comparison of a commercial biochemical kit and an oligonucleotide probe for identification of environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. Lett Appl Microbiol **22**: 184-188, 1996.
- 16) Farmer JJ III, Hickman-Brenner FW, Kelly MT: *Vibrio*. In Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Shadomy HJ EJ, eds. pp282-301 in Manual of clinical microbiology, 4th ed. ASM press Inc, Washington D. C., 1985.
- 17) Hill MK, Sanders CV: Localized and systemic infection due to *Vibrio* species. Infect Dis Clin North Am **1**: 687, 1987.
- 18) Hill WE, Keasler SP, Trucksess MW, Feng P, Kaysner CA, Lampel KA: Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. Appl Environ Microbiol **57(3)**: 707-711, 1991.
- 19) Hoi L, Dalsgaard A, Larsen JL, Warner JM, Oliver JD: Comparison of ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR for characterization of *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol **63**: 1674-1678, 1997.

- 20) **Hollis DG, Weaver RE, Baker CN, Thornsberry C:** Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* **3**: 425, 1976.
- 21) **Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL:** Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin Microbiol Rev* **1**: 245, 1988.
- 22) **Kim SM, Park Y, Chong YS:** A study on biological characteristics and serovar of *Vibrio vulnificus* isolated in Korea. *J Korea Soc Microbiol* **26**: 403-415, 1991.
- 23) **Koenig KL, Mueller J, Rose T:** *Vibrio vulnificus*. Hazard on the Half Shell. *West J Med* **155**: 400, 1991.
- 24) **Lee CT, Amaro C, Sanjuan Eva, Hor L:** Identification of DNA sequence for *Vibrio vulnificus* biotype2 strains by suppression subtractive hybridization. *Appl Environ Microbiol* **71**(9): 5593-5597, 2005.
- 25) **Lee SE, Kim SY, Kim SJ, Kim HS, Shin JH, Choi SH, Chung SS, Rhee JH:** Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by Nested PCR. *J Clin Microbiol* **36**: 2887-2892, 1998.
- 26) **Martinez-Urtaza J, Iozano-Leon A, Depaola A:** Ishibashi M, Shimada K, Nishibuchi M, and Liebana E. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J Clin Microbiol* **42**: 4672-4678, 2004.
- 27) **Mehtar S, Bangham L, Kalamatovitch D, Wren M:** Adult epiglottitis due to *Vibrio vulnificus*. *Br Med J* **296**: 827, 1988.
- 28) **Reichelt JL, Baumann P, Baumann L:** Study of genetic relationships among marine species of the genera *Beneckea* and *Photobacterium* by means of in vitro DNA/DNA hybridization. *Arch Microbiol* **110**(1): 101-120, 1976.
- 29) **Ryang DW, Cho SW, Shin MG, Shin JH, Suh SP:** Molecular typing of *Vibrio vulnificus* isolates by random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. *Jpn J Med Sci Biol* **50**: 113-121, 1997.
- 30) **Ryang DW, Koo SB, Shin MG, Shin JH, Suh SP:** Molecular typing of *Vibrio vulnificus* isolated from clinical specimens by pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis. *Jpn J Med Sci Biol* **52**: 38-41, 1999.
- 31) **Shimada T, Sakazaki R:** On the serology of *Vibrio vulnificus*. *Japanese K Med Sci Biol* **37**: 241-246, 1984.
- 32) **Shin MG, Shin JH, Ryang DW:** Clinical characteristics of *Vibrio vulnificus* infection. *Korea J Clin Pathol* **13**: 287-293, 1993.
- 33) **Shin MG, Shin JH, Suh SP, Ryang DW, Bae KS:** Cellular fatty acid profiles of ninety-five strains of *Vibrio vulnificus* isolated from clinical specimens in Korea. *J Gen Appl Microbiol* **43**: 317-324, 1997.
- 33) **Tamplin M, Rodrick GE, Blake NJ, Cuba T:** Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1466-1470, 1982.
- 34) **Woo ML, Patrick WGD, Simon MTP, French GL:** Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio vulnificus*. *J Clin Pathol* **37**: 1301, 1984.
- 35) **Wright AC, Miceli GA, Landry WL, Christy JB, Watkins WD, Morris JG:** Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* **59**: 541-546, 1993.
- 36) **Yamamoto K, Wright AC, Kaper JC, Morris Jr JG:** The cytotoxin gene of *Vibrio vulnificus* sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene. *Infect Immun* **58**: 2706-2709, 1990.
- 37) **Yang DO, Kim HS, Kim HW, Shin DH, Kim SJ:** Clinical characteristics in fifty-eight cases of micro-biologically confirmed *Vibrio vulnificus* septicemia. *Korea J Int Med* **41**: 383-391, 1991.