

# 泄瀉患者에서 分離된 腸炎비브리오菌에 關한 研究

微生物科

秦成鉉 · 趙顯哲 · 金美姬 · 鄭久永 · 沈宗煥

## A Study on *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Diarrheal Patients

Microbiology Division

S. H. Jin, H. C. Jo, M. H. Kim, K. Y. Jung, J. H. Shim

### Abstract

Fifty strains of *Vibrio parahaemolyticus* were isolated from 372 stools with diarrheal patients declared to each health center in Pusan. Antibiotic susceptibility test was performed by means of disk diffusion method using 10 kinds of antibiotics.

The results were as follows :

1. LDC, ODC, CIT, IND, GLU and OX were all positive but ONPG, ADH, H<sub>2</sub>S, URE, TDA, INO, SOR, RHA, SAC and MEL were all negative.
2. The isolates were not growth without NaCl, completely. Forty percents of strains grew in 10% NaCl but not in 12% NaCl.
3. The isolates were appeared  $\beta$ -hemolysis on sheep blood agar.
4. Serotypes of the isolates were grouped in order of K-I, K-IV, K-VI and K-II, 56%, 28%, 12% and 4%, respectively.
5. All isolates were appeared sensitivity to tobramycin and gentamicin, but were appeared resistance to carbenicillin and amikacin.

## I. 結 論

*Vibrio parahaemolyticus* (腸炎비브리오)는 1950년 Fujino<sup>1)</sup> 등이 Shirasu (작은멸치의 일종)에 의한 集團食中毒 事件에서 새로운 균을 分離하여 이것을 *Pasteurella parahaemolyticus* 라고 命名하였으며 1958년 Tokikawa<sup>2)</sup>는 오이조림의 食中毒에서 동일한 균을 分離한 以後 1963년 Sakazaki<sup>3)</sup> 등에 의하여 *Vibrio parahaemolyticus*라 命名되었다. 이 균은 元來 海岸海水와 여기에 棲息하는 漁貝類에 寄生하는 好鹽性 細菌으로 腸炎 및 急性胃腸炎症狀를 나타낸다. “腸炎비브리오 食中毒患者는 腹痛과 심한 물과 같은 泄瀉를 주증상으로 하나, 때로는 血便을 排出하여 所謂 痢疾樣症狀를 나타내는 경우도 적지않다. 따라서 腸炎비브리오 食中毒 患者가 臨床적으로 痢疾로 誤診되는 수가 있으며 특히 腸炎비브리오로 인하여 多發하는 夏節期에 痢疾이라고 診斷된 入院患者의 殆半이 腸炎비브리오에 起因하였다는 報告도 있다.” 腸炎비브리오 菌으로 인한 食中毒은 한여름철을 絶頂으로 하여 6~9월에 많이 發生한다. 그러나 海水중에 發見할 수 없는 겨울철이 되면 患者의 發生은 全然 볼 수 없는 것이 特徵이다.<sup>4)</sup> 우리나라에서는 金<sup>5)</sup> 등이 포항근해의 어패류, 海水 등에서 腸炎비브리오의 本포도를 調査하여 報告한 이래 많은 學者들에 의해 이 菌에 대한 分布狀態 및 生物化學的 性狀에 대하여 報告된 바 있다.

그러나 食中毒 患者에서 分離된 腸炎비브리오菌에 대한 報告는 콜레라가 流行한 1970년을 前後한 張<sup>6)</sup> 등, 梁<sup>7)</sup> 등, 襄<sup>8)</sup> 등의 報告가 多少있을뿐 最近들어 食中毒 患者에서 分離된 腸炎비브리오菌의 生物化學的 性狀에 관한 報告는 거의 없는 것으로 思料되어진다. 따라서 本 研究은 釜山市內 各 保健所에 申告된 泄瀉患者 372名의 大便에서 50株의 *Vibrio parahaemolyticus* 菌을 分離하고 細菌學的, 生化學的 性狀과 數種의 抗菌劑에 對한 感受性 試驗을 實施하여 얻은 成績을 여기에 報告하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 使用菌株

釜山市內 各 保健所에 申告된 泄瀉患者 372名의 大便에서 腸炎비브리오菌을 分離하여 -80°C의 Deep freezer에 冷凍 保管하였다가 實驗에 使用하였다.

## 2. 使用培地

### 1) 增菌培地

腸炎비브리오균을 分離하기 위한 增菌培地로서는 3% NaCl含有 Alkaline peptone water (PH 8.4)를 使用하였다.

### 2) 分離培地

增菌液을 T.C.B.S(Thiosulfate citrate Bilesalt sucrose, DIFCO)배지에 接種, sucrose 非分解性인 비브리오를 分離하기 위하여 使用하였다.

### 3) 鑑別培地

K.I.Agar(Kligler Iron Agar, DIFCO)를 使用하였다.

## 3. 實驗方法

### 1) 分離方法

(1) 泄瀉患者의 大便을 10:1의 比率로 3% NaCl 含有 Alkaline peptone water에 接種하고 37°C에서 6~7시간 增菌하여 이것을 T.C.B.S 한천배지상 37°C에서 18~24시간 培養하고 Sucrose 非分解性(농녹색집락)인 직경 2~3mm정도의 집락을 觀察하고 그람염색을 實施하여 그람음성간균임을 確認하였다.

(2) 鑑別배지에서 37°C, 18~24시간 培養後 K/A, Gas陰性, H<sub>2</sub>S陰性인 균주를 選擇하였다.

(3) SIM 반유동한천배지(DIFCO)에 천자하여 37°C에서 24시간 培養 後 운동성을 觀察하였다. 그리고 Kovac試藥을 1~2방울 떨어뜨려 인돌시험을 實施하고 유화 수소생성여부를 또다시 觀察하였다. 운동성이 있고, Indole 試驗에서 양성, 유화수소를 생성하지않는 균주를 選擇하여 A.P.L 20E Kit를 使用하여 最終 동정하였다.

### 2) 血清學的 試驗

生化學的 동정 檢査結果가 *Vibrio parahaemolyticus*와 일치하는 균주를 選擇하여 *Vibrio parahaemolyticus* K Antiserum pool(Denka SEIKEN.CO.Japan)에 Slide glass를 利用 凝集反應 여부를 觀察하였다.

### 3) 好鹽度試驗

好鹽度試驗은 食鹽을 각각 0%, 3%, 6%, 8%, 10%, 12% 씩을 添加한 Nutrient Broth (DIFCO)에 接種하여 48시간 후 增殖與否를 接種하지 않은 Nutrient Broth와 比較하여 生長의 有無를 1차 判定하고 제차 T.C.B.S 평판배지에 接種하여 농녹색의 집락을 觀察하였다.

### 4) 溶血反應試驗

溶血反應試驗에 使用된 배지는 Trypticase soy Agar w/5% Sheep Blood (BBL, U.S.A)를 使用하였다. 각각의 분리주를 혈액한천평판배지에 接種하여 37°C에서 24시간 培養한후 溶血

의 有無를 1차 觀察하고 再次 室溫에서 하루밤 放置한후 最終 判定하였다.

5) 化學療法劑에 對한 分離株의 感受性試驗

抗生劑 感受性 試驗은 Kirby-Bauer disc 擴散法으로 gentamicin의 9종의 disc(BBL, U.S.A)를 使用하였으며 이의 역가試驗에 使用한 菌株는 E.coli(ATCC 25922)로서 모든 disc가 許容 範圍에 들어 있음을 確認하였다. (표1) 分離株에 對한 感受性 試驗은 Trypticase Soy Broth(B.B.L)에 分離株를 接種한 後 37°C에서 5시간 培養하여 Macfland NO. 0.5가 되게 滅菌生理食 鹽水로 稀釋한 後 이것을 Muller Hinton II Agar(B.B.L)plate에 도말하여 15분간 放置한 後 disc dispensers를 使用하여 paper disc를 Muller Hinton II Agar plate에 密着시킨후, 37°C에서 18시간 培養하였다. 阻止帶의 測定은 paper discs를 中心으로 하여 菌發育의 阻止帶의 直徑을 測定하였고 判定基準은 표2와 같다.

Table 1. Control limits for inhibitory zone diameters (mm)

Antimicrobial Agent	(code)	disc potency	E. coli (ATCC 25922)	
			Acceptible range	tested range
carbenicillin	(CB-100)	100 mcg	23-29	27-28
Tobramycine	(NN-10)	10 mcg	18-26	25-26
Kanamycin	( K-30)	30 mcg	17-25	24-25
Colistin	(CL-10)	10 mcg	11-15	13-15
Tetracycline	(Te-30)	30 mcg	18-25	22-24
Streptomycin	( S-10)	10 mcg	12-20	18-20
Gentamicin	(GM-10)	10 mcg	19-26	25-26
Cephalothin	(CF-30)	30 mcg	17-22	21-22
Amikacin	(AN-30)	30 mcg	19-26	24-25
Ampicillin	(AM-10)	10 mcg	16-22	20-21

Table 2. Zone diameter Interpretative Standards (mm)

Antimicrobial Agent	(Code)	disc potency	Zone diameter, nearest whole			
			Resistant	intermediate	Moderately susceptible	Susceptible
Carbenicillin	(CB-100)	100 mcg	<19	-	20-22	>23
Tobramycine	(NN-10)	10 mcg	<12	13-14	-	>15
Kanamycin	( K-30)	30 mcg	<13	14-17	-	>18
Colistin	(CL-10)	10 mcg	< 8	9-10	-	>11
Tetracycline	(Te-30)	30 mcg	<14	15-18	-	>19
Streptomycin	( S-10)	10 mcg	<11	12-14	-	>15
Gentamicin	(GM-10)	10 mcg	<12	13-14	-	>15
Cephalothin	(CF-30)	30 mcg	<14	-	15-17	>18
Amikacin	(AN-30)	30 mcg	<14	15-16	-	>17
Ampicillin	(AM-10)	10 mcg	<13	-	14-16	>17



産하지 않았으며 Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Saccharose, Melibiose등은 모두 分解하지 않았으며, 그리고 Manitol은 분리주의 88% 이상이 分解하는 것으로 나타났으며 Amylose와 Arabinose는 生物型에 따라서 差異가 있었다. 食鹽耐性試驗은 無鹽加 Nutrient broth에서는 發育하지 않았고, 3-6% 食鹽加 Nutrient broth에서는 대단히 發育이 旺盛하였으며 10% 食鹽加 Nutrient broth에서는 40% 發育, 12% 食鹽加 Nutrient broth에서는 분리주 모두 發育되지 않았다. (표4)

그런데 V.parahaemolyticus菌의 好鹽性試驗에 있어서 Sakazaki<sup>2)</sup>의 報告에 의하면 10%에서는 増殖 못한다고 하여 腸炎비브리오菌의 好鹽性的 基準으로 하였으나 Twet<sup>1)</sup>등은 10% 食鹽에서는 増殖할 수 있는 균주가 있음을 報告하고 있어 本 研究의 成績과 一致하고 있다.

그런데 V.parahaemolyticus菌의 好鹽性試驗에 있어서 Sakazaki<sup>2)</sup>의 報告에 의하면 10%에서는 増殖 못한다고 하여 腸炎비브리오菌의 好鹽性的 基準으로 하였으나 Twet<sup>1)</sup>등은 10% 食鹽에서는 増殖할 수 있는 균주가 있음을 報告하고 있어 本 研究의 成績과 一致하고 있다.

Table 4. The results of Halophilism test of strains Isolated

concentration of NaCl (%)	V.parahaemolyticus Isolated
0	- 50
3	+ 50
6	+ 50
8	+ 50
10	+ 20 (40%)
	- 30 (60%)
12	- 50

+ : positive reaction, - : negative reaction

## 2. 溶血反應

Trypticase soy Agar W/5% Sheep Blood (BBL, U.S.A) 평판배지上的 溶血反應의 成績은 표5와 같다. 즉 분리주 50주에서 모두 陽性으로 나타났다. 腸炎비브리오는 多樣한 性狀이 있으나 그중에서도 중요한 性狀의 하나로서 溶血性的 興否가 중요시 되는데, 急性胃腸炎 患者에서 由來한균주는 사람이나 토끼의 血液구를 溶血하나 해양유래균주는 溶血性이 없다고 하였다. 또 Sakazaki<sup>2)</sup>는 患者에서 由來한 비브리오 2720주, 海水와 漁貝類에서 由來한 비브리오 650株에 대한 Kanagawa溶血 現象실험에서 病原性이 있는 균주는 96%가 陽性이었고 海水와 漁貝類에서 由來한 균주는 1%만이 陽性이었다고 報告하였다. 그리고 Sakurai<sup>3)</sup>등은 腸炎비브리오는 血清型 및 生化學的 性狀에 關係없이 病原性, 非病原性的 구별은 Kanagawa

溶血現狀 陽性 혹은 陰性에 의하여 決定지을수 있다고 報告하였지만 寺本<sup>10</sup>, 善養寺<sup>11,12</sup>은 Kanagawa 現狀이 陰性인 腸炎비브리오 菌株에 의하여 數例의 食中毒을 報告하여 Kanagawa 現狀 陽性株 만이 病原性이 있다고는 할 수 없다고 하였다. 그러나 本 實驗結果에서는 瀉瀉便에서 分離한 50株의 *V. parahaemolyticus*가 100% hemolytic activity가 있는것으로 나타나 이 溶血素가 本菌의 病原성과 關聯이 있음을 알 수 있었다.

Table 5. Hemolytic activity of *V. parahaemolyticus* on the Blood Agar Plate<sup>※</sup>

strains isolate from	Hemolytic activity		Total
	positive	negative	
Feces of diarrheal patients	50 (100%)	0	50

<sup>※</sup>Trypticase soy Agar W/5% Sheep Blood (BBL, U.S.A)

### 3. 血清凝集反應

分離菌株 50株에 대한 K混合 血清別 分離成績은 표6과 같다. K-I이 28株(56%)로 가장 많은 數를 차지 하였고, K-IV가 14株(28%), K-VI이 6株(12%), K-II가 2株(4%)의 순으로 K 混合 血清에서 凝集反應 陽性이었으며 K-III, K-V, K-VII, K-VIII, K-IX 混合血清에는 凝集이 되지 않았다. 染<sup>9</sup>의 報告에 의하면 생선회를 材料로 하여 分離한 菌株에 대한 K항원 混合血清 凝集反應은 K-II에서 6例, K-III에서 2例, K-IV에서 6例, K-V에서 11例 및 K-VI에서 2例로 陽性으로 나타나 本 實驗成績과는 多少 相異하였다. 한편 食中毒 患者에서 分離한 Kanagawa 陰性인 菌株에서 特定の 血清型이 原因菌 일것이라고 생각하는 報告도 있으나 이와같은 特定の 血清型이 病原성과 關係가 있는것인지는 앞으로 더욱더 檢討되어져야 할것으로 思料 된다.

Table 6. Occurrence of individual serotypes of the isolated *V. parahaemolyticus*

NO. of pooling K Anti-serum	NO. of positive strains	rate (%)
I	28	56
II	2	4
III	—	—
IV	14	28
V	—	—
VI	6	12
VII	—	—
VIII	—	—
IX	—	—
Total 9	50	100

#### 4. 抗菌劑에 對한 分離株의 感受性 試驗

*Vibrio parahaemolyticus* 50주에 대한 抗菌劑 感受性 試驗 成績은 표7과 같다. Susceptible인것은 Tobramycin(100%), Gentamicin(100%), Tetracycline(60%), Streptomycin(40%), Amikacin(28%), Cephalothin(12%), Kanamycin(8%)의 順位였으며, 抗菌劑에 對한 resistant한것은 carbenicillin(100%), Ampicillin(100%), Colistin(80%)의 順位였다. 染<sup>毒</sup>등의 泄瀉 患者에서 分離한 29株의 *vibrio parahaemolyticus*의 抗菌劑에 對한 感受性試驗 成績은 bacterim, tetracycline, chlorampenicol등이 100% sensitive율을 나타냈으며 colistin의 境遇 判定 基準은 paper disk를 中心으로 하여 菌發育의 阻止 直徑值35mm 혹은 그 이상을 very sensitive, 20~34mm를 sensitive, 16~19mm를 slightly sensitive, 13~15mm를 very slightly sensitive 그리고 12mm이하를 resistant라 하였을때 이것은 16~19mm의 阻止帶가 84.1%, 12mm이하의 阻止帶가 15.9% 이었다고 한다. Tetracycline의 경우 本 實驗에서는 60% susceptible하였으며 Colistin은 88% resistant로 나타나 70年代에 染<sup>毒</sup>등이 分離한 *V. parahaemolyticus*와 比較해 볼때 Tetracycline과 colistin의 境遇 多少 resistant한 傾向을 보이는데 하였다. 이와같은 傾向은 抗生劑의 頻繁한 使用으로 耐性菌이 增加 한것으로 思料된다.

Table 7. Comparative Sensitivity Test of *V. parahaemolyticus* to various chemotherapeutic Agents

result	CB	NN	K	CL	Te	S	GM	CF	AN	AM
susceptible	-	50 (100%)	4 (8%)	-	30 (60%)	20 (40%)	50 (100%)	6 (12%)	14 (28%)	-
Moderately Susceptible	-	-	-	-	-	-	-	44 (88%)	-	-
Intermediate	-	-	46 (92%)	6 (12%)	20 (40%)	30 (60%)	-	-	36 (72%)	-
Resistant	50 (100%)	-	-	44 (88%)	-	-	-	-	-	50 (100%)
No. of tested strains	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Abbreviation CB=Carbenicillin NN=Tobramycin K=Kanamycin  
 CL=Colistin Te=Tetracycline S=Streptomycin  
 Gm=Gentamicin CF=Cephalothin AN=Amikacin  
 AM=Ampicillin

#### IV. 結 論

釜山市內 各 保健所에 申告된 泄瀉患者 372名의 大便에서 50株의 *Vibrio parahaemolyti-*



cus를 分離하여 生化學的인 特性 및 10種의 抗菌劑를 使用하여 感受性試驗을 實施하여 얻은 成績은 다음과 같다.

- 1) API20E KIT에 의한 LDC, ODC, CIT, IND, GEL, GLU, OX試驗은 100% 陽性으로 나타났으며 ONPG, ADH, H<sub>2</sub>S, URE, TDA, INO, SOR, RHA, SAC, MEL 試驗은 100% 陰性으로 나타났다.
- 2) 本菌은 食鹽없이는 生育이 불가능하므로 나타났으며 NaCl 10% 濃度에서는 40%가 生育되었으며 12% 농도에서는 100% 生育 불가능하였다.
- 3) 本菌은 羊血球를 溶血시키고 있어 細菌毒素의 일종인 溶血素를 分泌하는것으로 나타났다.
- 4) 抗血清試驗에 있어 K-I에 56%, K-II에 4%, K-IV에 28%, K-VI에 12%가 凝集되었다.
- 5) 抗生劑 感受性試驗에서는 Tobramycin과 Gentamicin이 100% sensitive한것으로 나타났으며 Carbenicillin과 Amikacin은 100% resistant로 나타났다.

## 參 考 文 獻

- 1) Fujino, T., et al, Taxonomic of the bacterial strains isolated from cases of "shirasu" food poisoning (*Pasteurella parahaemolyticus*) and related microorganisms, Biken Journal, 8, 63(1965)
- 2) Takikawa, I., Studies on pathogenic halophilic bacteria, Yokohama Med. Bul., 2, 313 (1958)
- 3) Sakazaki, R., *Vibrio parahaemolyticus* Isolated and Identification, Nihon Eiyokagaku Co., Ltd(1965)
- 4) Thomson, W.K., and Trenholm, D.A., The isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic bacteria from canadian Atlantic shellfish, can. J. Microbiol., 17, (1971)
- 5) 齋藤 誠, 好鹽菌(腸炎ビブリオ) 食中毒의 臨床, 日本傳染病學會雜誌, 37, 9(1963)
- 6) 金永權, 病原性好鹽菌의 細菌學的 性狀 및 病原性에 關한 研究, 中央醫學, 14, 6(1968)
- 7) 具種守, 全薰基, *Vibrio parahaemolyticus* 및 콜레라菌의 繁殖에 關한 研究, 中央醫學, 20, 5(1971)
- 8) 全壽基 外, 韓國에서의 *Vibrio parahaemolyticus*의 分離, 現代醫學, 6, 1(1967)
- 9) 張鶴來 外, 食中毒患者에서 分離된 腸炎비브리오에 關한 研究, 中央醫學, 17, 4(1969)
- 10) 染學道 外, 1970年度 釜山市 및 慶南地方에서 콜레라 流行時 泄瀉患者에서 分離한 *V. parahaemolyticus*에 對한 研究, 中央醫學, 22, 3(1972)
- 11) 襄丁東 外, 入院患者中 泄瀉患者에 있어서 *V. parahaemolyticus* 分離에 關한 研究, 中央醫學, 27, 4(1974)
- 12) Twedt, R. M. et al, Morphological, cultural, biochemical and serological comparison of Japanese strains of *vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the united states, J. bacteriol., 98, 2(1969)
- 13) Sakurai J., et al, Existence of two distinct hemolysins in *vibrio parahaemolyticus*, Infection and Immunity, 9, 5(1974)

- 14) 寺本志司, 外 腸炎ビブリオ 02:K不明神奈川 現象 陰性株によると推定される食中毒 について, *Media circle*, 16, (1971)
- 15) 善養寺 浩 外, いわゆる神奈川現象陰性腸炎 ビブリオ 食中毒の 1 集團發生例について, *Mordern media*, 15, (1969)
- 16) 善養寺 浩 外, 神奈川現象陰性 腸炎ビブリオ 04:K<sub>12</sub>と 推定される食中毒 について, *Media Circle*, 16, (1970)
- 17) 梁學道, 釜山市 重要 飲食店の 초밥에서 腸炎Vibrio 菌의 分離에 對한 研究, *釜山醫大雜誌*, 12, 2(1972)
- 18) 梁學道 外, 1970年度 釜山市 및 慶南地方에서 콜레라 流行時 泄瀉患者에서 分離한 *V. parahaemolyticus*에 對한 研究, *中央醫學*, 22, 3(1972)