

# 부산연안에서 검출된 비브리오속균의 분자생물학적 연구

역학조사과

이 채 남 · 조 현 철

## Molecular Typing of *Vibrio* spp. Isolates in Busan Costal Areas

*Epidemiology Division*

Chae-Nam Lee · Hyeon-cheol Cho

### Abstract

*Vibrio* spp. is a halophilic bacterium frequently involved in human outbreaks of sea food-associated gastroenteritis. For epidemiological purposes in this study, we analyzed the molecular typing *Vibrio* spp. isolates using the PFGE(pulsed-field gel electrophoresis). PFGE was applied to 45 strains of *Vibrio* spp. collected from environmental specimen, fish and patient from 2002 to 2003 in Busan.

The PFGE method using of *Not* I digestion is reliable, achieves high discrimination efficiency, and has been applied to typing of *Vibrio* spp

Environmental isolates showed greater variability than isolates from patient, except Dongsamhari 5(03/05/13) and Minrak 6(03/06/10), Dadaepo 5 (03/05/29) and Dadaepo 6(03/06/10), Mungji 5(03/05/13) and Mungji 6(03/06/10), Chungsapo 5 (03/05/29) and Mipo 6 (03/06/10). Similarly, *V. vulnificus* isolates from patients(Kim and Sok) exhibited different PFGE types from environmental strains.

Therefore molecular typing methods could be used to aid trace-back investigations aimed at determining the source.

**Key Words:** *Vibrio* spp. PFGE,

## 서 론

호염성 비브리오속균은 해양서식 미생물로서 해수, 갯벌 등 해양환경에서 널리 분포되어 있고 어패류 및 해수로부터 직·간접적으로 인체에 감염됨으로 공중보건학상 중요한 의의가 있으며 이 균속에 속하는 30여종 가운데 10여종은 인체 병원균으로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

병원성 비브리오균으로 *V. cholerae* O1, *V. mimicus*, *V. parahemolyticus* 등 장관 감염을 일으키는 것과 *V. vulnificus*와 같은 패혈증, 창상감염을 일으키는 것으로 나뉘어 진다.<sup>8,9)</sup>

식중독 원인균인 장염비브리오균(*V. parahaemolyticus*)은 발생빈도가 높은 감염형 식중독 원인균이고<sup>2)</sup> *V. parahaemolyticus*는 병의 진행이 일반적으로 물설사, 구역, 구토, 미열을 나타내며 무증상으로 지나치는 경우도 있으나 경우에 따라서는 혈액이 섞인 설사를 하며 치명적일 수도 있다<sup>3)</sup>. 비브리오 패혈증균(*V. vulnificus*)은 그람음성의 호염성균으로서 우리나라에서는 서해안 및 남해안 지역의 하절기 동안 고르게 분포되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 비브리오 패혈증은 경구 감염 및 상처를 통한 상처감염에 의하여 부종, 홍반이 급격히 진행되면서 조직괴사 및 창상감염을 일으키고, 만성적인 간질환이나 습관성 음주벽이 있는 사람들에게서 발병율과 치사율이 높은 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>. *V. vulnificus* 균의 감염에 의한 비브리오 패혈증은 기저

질환을 가진 사람들이 *V. vulnificus*균에 오염된 어패류를 생식하거나 외상이 있는 사람이 오염된 해수나 해안 침사물에 접촉하여 감염되는 질환으로 피부조직 괴사, 수포, 고열, 오한 및 쇼크 등 임상증세를 보이고 병증이 급진전되며 약 40% 정도의 높은 치사율을 보이고 있다<sup>4,5)</sup>. 우리나라의 경우 어패류의 생식, 간장질환 및 습관성 음주벽을 지닌 사람들이 비교적 많아 비브리오 패혈증 환자발생 위험성이 상존하고 있다. *V. cholerae* O1은 장관계에 감염되어 발병되는 급성설사질환인 콜레라의 원인이 되는 세균성 병원체로서 콜레라에 감염될 경우 몇차례 설사를 하는 정도의 경증환자에서부터 설사를 시작한지 한시간 이내에 쇼크를 동반하는 중증환자까지 발생하는 급성 소화기계 질환이다.<sup>6,11)</sup>

*V. cholerae non-O1*은 *V. cholerae* O1과 형태학적, 생화학적, 생물학적 성상은 비슷하지만, 콜레라균의 항 혈청에는 응집되지 않는 Non-cholerae Vibrio(NCV) 또는 Non Agglutinable Vibrio (NAG)라고도 불리운다. 비브리오속균의 조기진단을 위해 중합효소 연쇄반응을 이용한 분자생물학적 기법을 활용한 진단방법이 연구되고 있으며<sup>12,13)</sup>, 비브리오속균을 대상으로 생물학적 특성시험과 Multiplex-PCR로 병원인자 및 독성유전자 진단에 관한 이 등<sup>14)</sup>의 보고가 있으나 비브리오속에 의한 감염증은 생활수준의 향상에도 불구하고 각종 환경오염으로 인하여 오히려 증가되고 있으며, 특히 우리나라는 지리적인 여건과 어패류의

생식을 즐기는 식습관 때문에 보다 넓은 범위의 검색이 요구된다. 이에 따라 본 연구는 병원체의 근원과 병원체 사이의 유연관계의 확인은 감염질환의 관리와 발생 예방에 필수적인 기초자료이다. 과거에는 serotyping, biotyping, bacteriophage typing 등의 bacteria의 특성 파악을 통한 실험법이 사용되었으나 1980년대부터는 이런 역학적인 자료를 얻기 위하여 Restriction fragment length polymorphism(RFLP), ribotyping, PCR-based subtyping 등의 분자생물학적 기법을 이용한 실험법들이 많이 이용되고 있다. 그 중 비브리오 패혈증에 대한 RFLP는 김<sup>10)</sup> 등에 의한 보고가 있으며 PFGE(pulsed field gel electrophoresis)는 RFLP 방법 가운데 하나로서 사용자가 gel에 주어지는 전기장의 각도를 다양하게 지정할 수 있기 때문에 보통의 전기영동 장치로는 분리할 수 없었던 큰 size의 DNA를 분리할 수 있고 병원체 전체 유전자를 대상으로 실험이 가능하다. 그래서 본 연구는 2002~2003년간 부산지역에서

분리된 비브리오속균 중에서 45건에 대하여 PFGE를 실시하여 유전적인 양상을 균주별로 분류하여 특성을 파악하고, 향후 부산지역에서 비브리오속균에 의한 질병 발생시 역학의 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험 균주

2002~2003년 부산지역 연안해수, 어류 및 식중독 환자에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 30주, *V. vulnificus* 8건, *V. cholerae non-O1* 6건, *V. cholerae O1* 1건을 사용하였다. 시험균주는 3% NaCl - 20% glycerol Tryptic Soy Broth(Merck)에 분후 -70°C에 저장하여 시험에 사용하였다. 시험균주는 API 20E(biomerieux, France)에 의한 생화학적 시험에 의해 균을 확인하였다. Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE) 실험은 이 등<sup>15)</sup>의 방법으로 실시하였다.

Table 1. Isolation of *Vibrio* spp. from marine specimens and patients collected from Busan district in 2002~2003

Strains	Specimens			Total
	Sea water	Patient	Fish	
<i>V. parahaemolyticus</i>	30	0	0	30
<i>V. vulnificus</i>	3	4	1	8
<i>V. cholerae non-O1</i>	6	0	0	6
<i>V. cholerae O1</i>	0	1	0	1
Total	39	5	1	45

## 2. Agarose plug의 준비

비브리오속균을 3% NaCl Nutrient Agar (Merck)배지에 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 면봉을 이용하여 평판배지로부터 적당량의 균을 문혀낸 다음 TE buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 7.5) 2~3ml에 균을 현탁하여 Special DR 100 colorimeter(bioMerieux.inc U.S.A)로 10~15%의 투명도로 조정하였다. 균 현탁액 200 $\mu$ l과 Proteinase K (20mg/ml) 10 $\mu$ l를 넣어 잘 섞어준 후 1.2% Seakem gold agarose 200  $\mu$ l를 첨가하여 plug mold ((Bio-Rad 1703711)에 넣어 4°C에서 5분간 굳혔다.

## 3. Agarose plug의 처리

굳은 plug를 꺼내서 ES buffer(0.5 mM EDTA, pH 9.0, 1% sodium-lauroyl-sarcosine) 1.5 ml와 Proteinase K(20mg/ml) 40 $\mu$ l씩 첨가하여 55°C 항온수조에서 45분~60분간 처리하였고, plug를 screen cap(Bio-Rad 1703706)에 각 검체별로 넣고 cap를 column 형태로 조립한 다음 PVC과 이프로 만든 tube에 넣는다. 55°C 정도인 멸균증류수로 15분간 항온수조에서 세척한다. 50°C 정도인 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)로 15분간 3회 세척하고 세척이 완료되면 새로운 TE buffer로 바꾸어서 2ml microcentrifuge tube에 넣어 사용할 때까지 4°C 보관하였다.

## 4. Restriction enzyme 처리

세척이 끝난 plug를 에탄올로 닦은 면도날을 이용하여 1 mm 두께로 절단한 후 절편이 들어있는 1.5 ml microcentritube에 10 $\times$ restriction enzyme buffer 10  $\mu$ l, 100 $\times$ BSA 1  $\mu$ l, Not I (BioLab R0189S) 30 unit, DDW로 최종용량을 100 $\mu$ l가 되도록 한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 제한효소반응이 끝나면 반응용액을 제거하고 PFGE에 사용하거나 plug 절편이 들어있는 tube에 TE buffer를 적당량 넣어 4°C에 보관하였다.

## 5. Gel Running

제한효소 처리가 끝난 plug 절편을 agarose gel 성형용 comb의 끝 부위에 맞춰 올려놓은 후 여과지로 주변의 물기를 제거하고 상온에서 15분 정도 건조시킨다. 건조후 plug의 절편이 붙어있는 comb를 제자리에 위치시킨 다음 1% Seakem gold agarose(FMC Bio Products, USA)를 gel 성형틀 안에 부어 상온에서 30분간 굳힌다. 이 때 agarose 용액을 1~2ml 정도 남겨서 55°C 항온수조에 보관한다. Gel이 굳으면 comb를 빼낸다. comb에 의해 만들어진 빈 well에 남겨 두었던 agarose 용액을 부어 채운다. gel을 전기영동 cell에 넣고 CHEF II/Mapper PFGE( Bio-Rad USA)를 사용하여 *V. parahemolyticus*인 경우는 initial time. 1.0sec, final time 54.2sec. 6 Volt/cm(200V),

14℃, 18시간이며 *V. vulnificus*인 경우는 initial time. 1.0sec, final time 35.0sec. 6 Volt/cm(200V), 14℃, 20시간이고, *V. cholerae*인 경우는 initial time. 1.0sec, final time 40.2sec. 6 Volt/cm(200V), 14℃, 18시간 실시하였다.

전기영동이 끝난 후 ethidium bromide(0.5 µg/ml)에서 30분간 염색하고 증류수로 30분씩 2회 탈색하여 Image Analysis (Vilber Lourmat, France)로 관찰하였다.

## 6. PFGE 결과 분석

PFGE 결과는 Tenover 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 각 균주의 DNA 위치가 다른 절편 수에 따라서 type을 결정하였으며, 균주 간의 유연 관계는 Molecular Analyst Fingerprinting Software(Bio-Rad, USA)로 dendrogram을 작성하여 비교 분석하였다.<sup>16)</sup>

## 결과 및 고찰

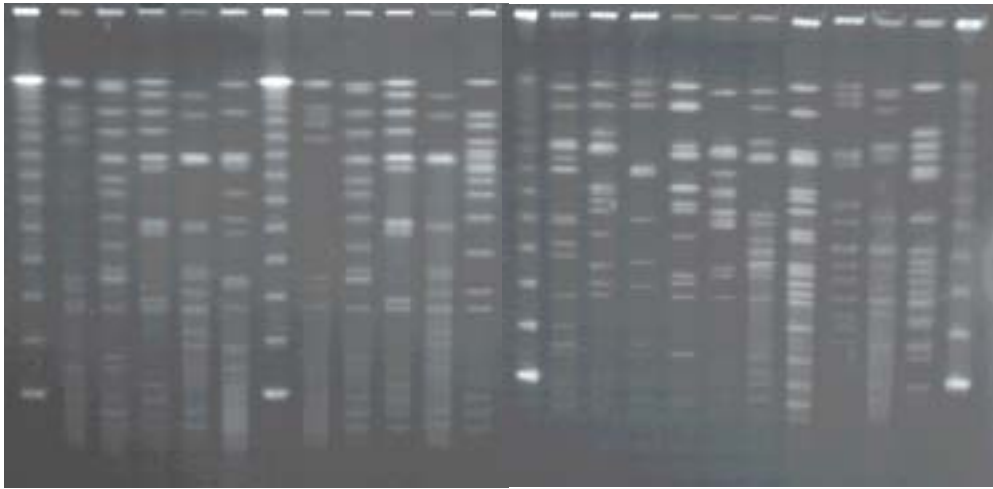
### 1. PFGE 결과

2002년부터 2003년까지 부산지역의 연안해수, 환자, 어류에서 분리한 비브리오속균으로 장염비브리오 30건, 비브리오 콜레라 non-O1 6건, 비브리오 콜레라 O1 1건, 비브리오패혈증 8건을 PFGE를 실시하였으며, 제한효소 *Not* I(5'-GCGGCCGC-3')로 처리한 경우 장염비브리오균에서는 DNA가 11~19개 (Fig. 1) 비브리오콜레라균에서는 17~21개 (Fig. 2), 비브리오패혈증균에서는 18~20개 (Fig.3)로 절단되었다.

### 2. PFGE 패턴 분석

Fig. 4, 5, 6은 pulg를 *Not* I으로 처리한 후 PFGE를 실시하였다. 이 실험법을 이용한 molecular typing은 균주간에 나타난 절단양상이 아종에서만 나타나는 독특한 band pattern을 보여준다. 장염비브리오의 경우 동삼하리5(lane 2, DH0305)와 민락6(lane 7, MR0306), 다대포5(lane 3, DD0305)와 다대포6(lane 8, DD0306), 명지5(lane 1, MJ0305)와 명지6(lane 6, MJ0306), 청사포5(lane 4, CS0305)와 미포6(lane 9, MP0306)는 동일한 패턴을 보였다. 다대포8(lane 12, DD0308)과 다대포9(lane 14, DD0309)는 81.4%의 유사성을 보였다. 유사성이 최소 38%이상으로 부산지역 연안해수의 다양한 장염비브리오의 양상을 보였다. 비브리오 콜레라 7건(non-O1 6건, O1 1건)의 경우는 남천동9(03/09/15)와 대변9(03/09/15)는 동일한 패턴을 보였다. 전체적으로 97%라는 높은 유사성을 보였으며 환자(추○○)와는 75%의 유사성을 보였다. 비브리오 패혈증 8건은 환자로부터 분리한 김○○(03/08/25), 석○○(03/08/25)과 쥐치(02/10/11)와 문○○(03/09/06)은 같은 패턴을 보였다. 김○○(남.62)과 석○○(남.76)은 평소 습관성음주와 흡연으로 인한 빈혈과 간경변의 질환을 가지고 있었으며, 전어회의 섭취로 비브리오패혈증 증세를 보였다. 문○○(남.72)은 간염증세가 있었으며 쥐치와 유사한 오징어회 섭취로 인하여 패혈증세를 보였지만 쥐치가 어디서 채취되었는지, 문○○의 사막은 오징어와는 어떠한 관련이 있는지의 여부가 병원체의 근원과 병원체 사이의 유연관계를 더욱 명확히 할 것이다.

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



M 21 22 23 24 25 M 26 27 28 29 30

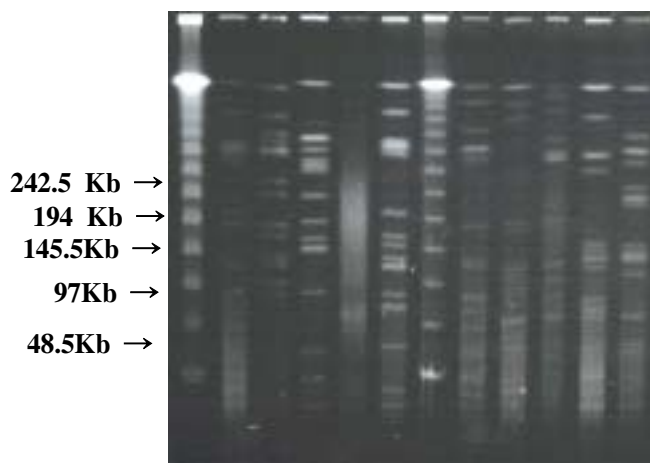


Fig. 1. PFGE profiles of *V. parahaemolyticus* strains obtained with the *Not* I enzyme.

The gel was stained with ethidium bromide. Lanes M, is 48.5 Kb ladder size maker; lane 1, MJ0305; lane 2, DH0305; lane 3, DD0305; lane 4, CS0305; lane 5, CA0306; lane 6, MJ0306; lane 7, MR0306; lane 8, DD0306; lane 9, MP0306; lane 10, CA0307; lane 11, DD0307; lane 12, DD03086; lane 13, DD0308-2; lane 14, DD0309; lane 15, DD0309-2; lane 16, DD0310; lane 17, CA0308; lane 18, CA0308-2; lane 19, CA0310-2; lane 20, CA0311; lane 21, GK0307; lane 22, GK0308; lane 23, GK0309; lane 24, GK0309-2; lane 25, GK0310; lane 26, GK0311; lane 27, GKM ; lane 28, IR; lane 29, IK; lane 30 SJ.

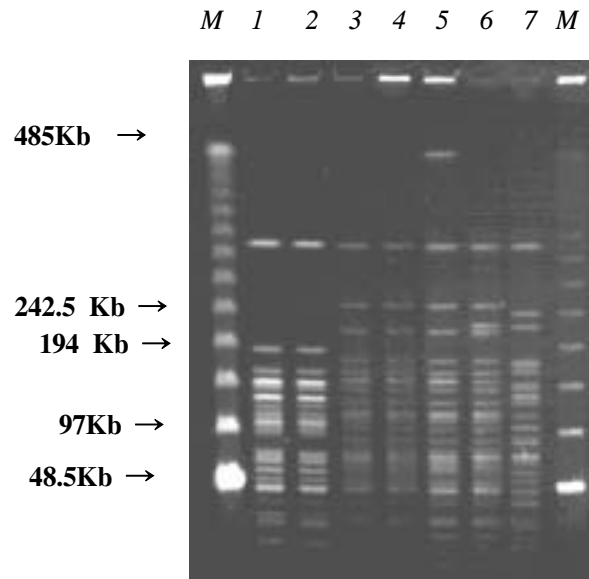


Fig. 2. PFGE profiles of *V. cholerae* non-O1 and *V. cholerae* O1 strains obtained with the *Not* I enzyme. Lanes M,  $\lambda$  ladder; lane 1, NC0307; lane 2, CA0309; lane 3, NC0309; lane 4, DB0309; lane 5, DH0309; lane 6, DH0311; lane 7, P1.

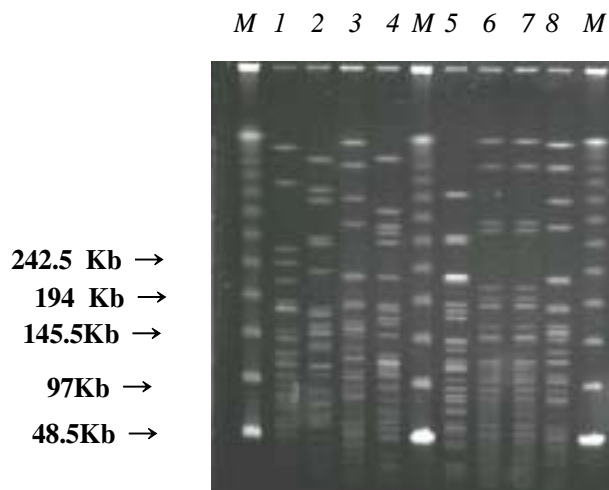


Fig. 3. PFGE profiles of *V. vulnificus* strains obtained with the *Not* I enzyme. Lane M,  $\lambda$  ladder; lane 1, IK0208; lane 2, NK0208; lane 3, FF0210; lane 4, NK0308; lane 5, P1; lane 6, P2; lane 7, P3; lane 8, P4.

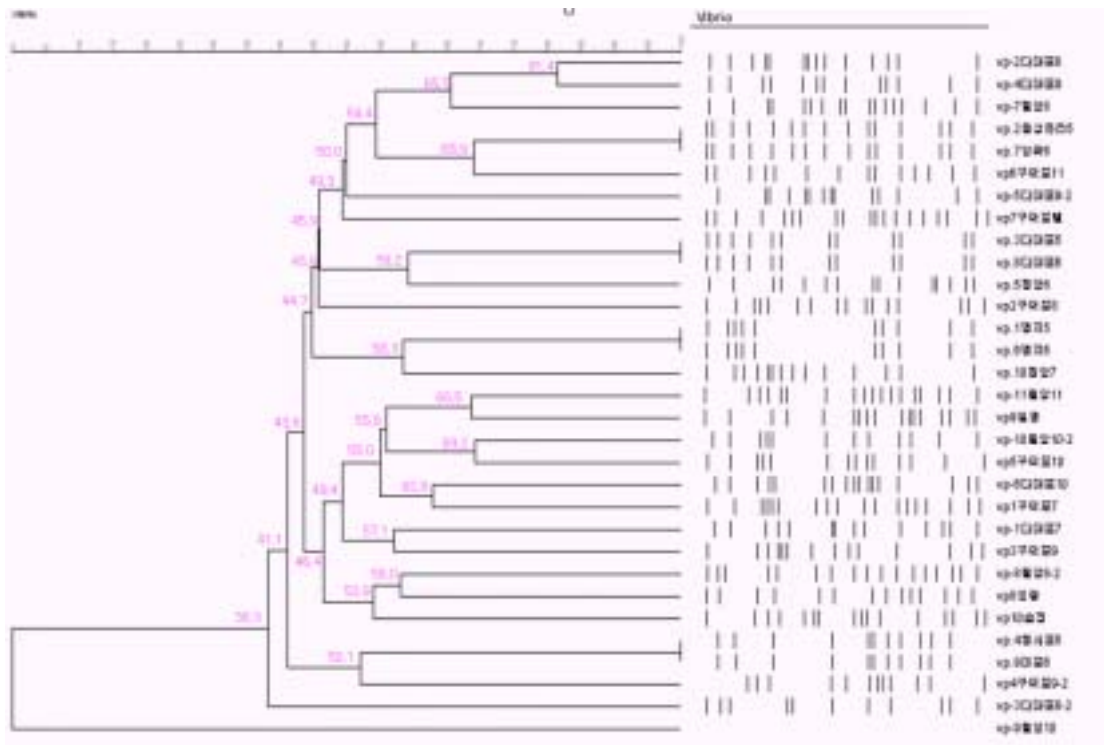


Fig. 4 Dendrogram generated by the average percentage of matched bands summarizing the degree of similarity of *Not I* restriction patterns of genomic DNAs of *V. parahaemolyticus*.



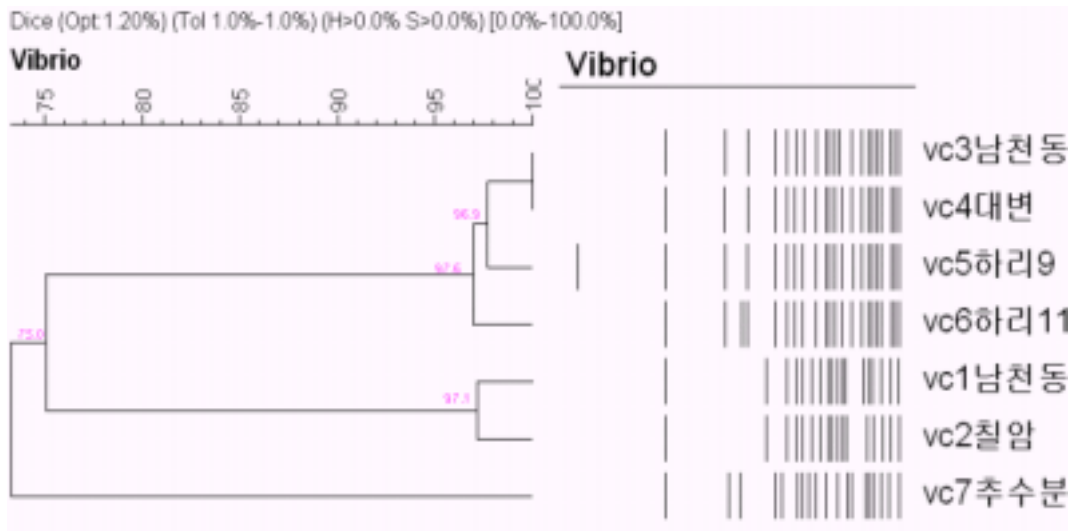


Fig. 5. Dendrogram generated by the average percentage of matched bands summarizing the degree of similarity of *Not I* restriction patterns of genomic DNAs of *cholerae* non-O1 strain and *V. cholerae* patient.

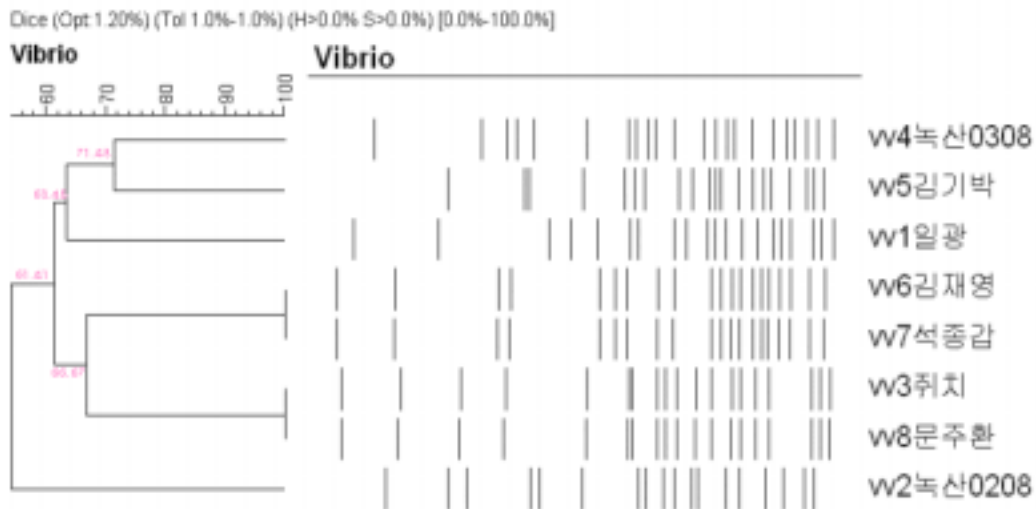


Fig. 6. Dendrogram generated by the average percentage of matched bands summarizing the degree of similarity of *Not I* restriction patterns of genomic DNAs of *V. vulnificus*.

본 연구를 통하여 부산지역에서 분리되는 비브리오감염증에 대한 유전자 유형분석 결과를 데이터베이스화하고 식중독의 집단 발생 또는 산발적인 질병 발생이 있을 경우 분자생물학적 특성을 비교하는 것은 역학조사 자료로서 매우 중요하다. 이와같이 분자생물학적인 특성을 연구함에 있어 실험방법이 다양하기 때문에 식중독 발생양상 및 전염경로를 확인할 수 있는 더 많은 노력 즉, 동일 유형일 경우는 채취 지역간의 거리, 채취시기, 환경가검물인 경우는 조류, 균분리지역의 육상기원의 영양염류의 유입가능성 등 역학적, 환경적 요인을 근거로 연관성에 대한 자료 수집과 비교실험이 요구되어 진다.

## 결 론

1. 2002년부터 2003년까지 부산지역에서 분리한 비브리오속균 45균주에 대해 제한효소 Not I를 사용하여 PFGE를 실시하였다.
2. 장염비브리오의 경우 동삼하리5와 민락6, 다대포5와 다대포6, 명지5와 명지6, 청사포5와 미포6은 동일한 패턴을 보였고, 다대포8과 다대포9는 81.4%의 유사성을 보였다. 유사성이 38%이상으로 부산지역 연안해수의 다양한 장염비브리오의 양상을 보였다.
3. 비브리오 콜레라 7건(non-O1 6건, O1 1

건)의 경우는 남천동9 와 대변9는 동일한 패턴을 보였다. 전체적으로 97%라는 높은 유사성을 보였으며 환자(추오)와는 75%의 유사성을 보였다.

4. 비브리오 패혈증 8건은 김○○(03/08/25), 석○○(03/08/25)과 쥐치(02/10/11)와 문○○(03/09/06)은 같은 패턴을 보였다. 김(남.62)과 석(남.76)은 평소 습관성음주와 흡연으로 인한 빈혈과 간경변의 질환을 가지고 있었으며, 전어의 섭취로 비브리오패혈증 증세를 보였다.

## 참고문헌

1. Baumann, P. *et al*, Re-evaluation of taxonomy of *Vibrio*, Current Microbiology, 4, 127~132, 1982
2. Iida, A. and Takagi. M: Investigation of an intracellular hemolytic agent of *Vibrio parahemolyticus*, Lipid fraction of dried cells. Microbiol. Immun., 23:305, 1979
3. Honda. S. L.. and Goto, I: Gastroenteritis due to Kanagawa Negative *Vibrio parahemolyticus*, Lancet., 7:33, 1987
4. Blake, P. A., M. H. Merson D. G. Hollis and P.C. heublein. disease caused by a marine *Vibrio*: Clinical characteristics and epidemiology. N. Engl. J. Med. 300 1~5, 1979
5. Oliver, J. D. The pathogenicity and

- Ecology of *Vibrio vulnificus*. J. Mar. Tec. Soc. 15: 45~52, 1981
6. 유천권, 강원숙, 조수열, 이영희, 김기상, 이명원, 김호훈, 박기덕. 1991년 한국의 콜레라 유행기간중 분리된 *V. cholerae* O1의 생화학적 성상 및 장독소 유전자에 관하여 대한미생물학회지. 27(4) 325~330, 1992
  7. 국내비브리오 패혈증의 역학적 특성연구. 국립보건원, 2003
  8. Honda, T. Pathogenesis gene and toxins of genus *Vibrio* Medical Immunology, 21(3) 313~318 . 1991.
  9. Chan, K. Y., Woo, M. L. and G. L. French. Occurrence and distribution of halophilic *Vibrio* in subtropical coastal waters of Hong Kong. Appl. Environ Microbiol. 52, 1407~1441, 1986.
  10. 김호훈, 강연호, 박미선, 유재연, 김성한, 전정훈, 조상래, 임동균. 국립보건원보 33. 16~24, 1996
  11. 김호훈, 신영학, 강연호, 유천권, 박미선, 김동숙, 유재연, 전정훈, 이복권, 박기덕, 김동진, 정태화, 이종구, 박기동, 김상순, 이동모, 김문식, 조병율. 최근 국내 유입 *V. cholerae*균 및 1995년도 국내 집단발생 콜레라의 역학적 양상. 대한감염학회지 28(6), 473~479.
  12. Concomitant infection of *Enterotoxigenic Escherichia coli* in an Outbreak of Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Ahmedabad, India J. Clin. Microbiol. 39:3241~3246. 2001
  13. Hill, W. E., Keasler, S. P., Truck, M. W., Feng P., Kaysner, C. A. and Lampel, K. A. Polymerase chain reaction identification of *V. vulnificus* in artificially contaminated oyster. J. Clin. Microbiol. 33:2872-2875, 1991
  14. 이상조, 김미정, 정종교, 이도영. 경북 지역에서 분리된 *Vibrio*속의 분자생물학적 특성연구(2000~2001). 경북보건환경연구원보 9~47
  15. Comparison of Molecular Methods for Typing *Vibrio parahaemolyticus* J. Clin. Microbiol. 37:2473~2478. 1999
  16. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233-2239, 1995