

최근 한국에서 유행하는 장염비브리오균의 분자 역학적 특성

† 김 상 숙 · ¹이 희 무 · ¹이 중 복
안동과학대학 간호학과, ¹안동대학교 자연과학대학 생명과학과
(접수 : 2003. 10. 21. 게재승인 : 2003. 12. 23.)

Molecular Epidemiological Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* as Recently wide-spreaded in Korea

Sang-Sook Kim† , Hee-moo Lee¹, Jung-Bok Lee¹

Department of nursing, Andong Science College, Andong 760-822, Korea

¹Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

(Received : 2003. 10. 21. Accepted : 2003. 12. 23.)

The purpose of this study is to inquire into molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*. For this study, 120 strains(120 strains of *Vibrio parahaemolyticus* sampled from diarrhea patients) were examined and analyzed for biochemical characteristics, TDH (thermostable direct hemolysin) antibiotics sensitivity and detection of toxR, gyrB, tdh, and tds genes. G-S PCR (Group Specific Polymerase), PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) methods were performed on the materials from patients were results.

1. *Vibrio parahemolyticus* didn't grow in 0% density of NaCl, but the fact was found that those grew in 8% density of NaCl.
2. O:K serotypes of *Vibrio parahemolyticus* was turned up in domestic patients was 17 types. Among those O3 : K6 was the most, it was 68.3%.
3. In 18 kinds of antibiotic tests resistant against Ampicillin, Ticacillin was comparatively high. the case of resistant against Ampicillin, Ticacillin, Vancomycin at the multiple resistant was 52.5%.
4. Toxin gene tdh had only 109 strains among 120 ones isolated from patients held the genes of 199bp size, and 11 strains was negativity
5. In the test of Kanagawa toxic productivity, 107 strains among strains isolated from patients appeared to be positivity reaction
6. The strain that held trh toxin was only 3, and those among test strains had the genes of 250bp size and that had tdh, trh genes at a time were 3 strains, and TDH toxic productivity of those were 16 times, and it was weak.
7. Group Specific-PCR appeared to be useful in the confirmation of O3 : K6 serotype interrelations.
8. Three strains which showed difference of 7 DNA sequence even in the same serotype were detected by the result of analyzing the regular gene, toxRS DNA sequence. These strains are differ from general strains which carry infection easily.
9. These mutual close epidemiological relations were classified into smaller-parts through PFGE method. As a result of such classify, 3 findings were found. *V. parahaemolyticus* sampled from diarrhea patients were classified into 3 types. And third, the result obtained through PFGE method can be used as a useful tool in a point of molecular-epidemiological view.

Key Words : *Vibrio parahaemolyticus*, G-S PCR, PFGE

서 론

현대 사회가 발전해가면서 국민수준 향상에 따른 경제적

수준과 생활 형태가 변화하면서 식생활의 변화 또한 다양해지며, 고급화되어지고 있다. 이에 따라 식품에 대한 안정성에 대해서 국민들은 더욱 민감해지고 있으며, 보다 좋은 음식문화를 갖으려는 욕망이 있다. 우리나라 식품위생법 상에도 식품위생의 목표를 “식품으로 인한 위생상의 위해를 방지하고 식품영양의 질적 향상을 도모함으로써 국민건강의 증진에 이바지하는 것”으로 정의하고 있다.

† Corresponding Author : Department of nursing, Andong Science College, Andong 760-822, Korea

Tel : +82-54-851-3542, Fax : +82-54-852-9907

E-mail : k1445@andong-c.ac.kr

현재 *Vibrio* 균 속에는 40여 종이 기록되어 있지만 계속해서 새로운 종이 추가되고 있는 추세이다. 이 종들은 대부분 자연환경 등에서 분리되고 있으며, *Vibrio* 균속 증식에는 염분을 필요로 하며 농도는 종에 따라 다양하다(1). *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. vulnificus* 그리고 *V. anguillarum* 균의 대부분과 *V. cholerae*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* 같은 균들은 성장하는데 소량의 염분이 첨가된 Tryptone water에서도 증식이 되며 *V. alginolyticus*와 *V. parahaemolyticus*는 6~8% 염분 농도에서 증식이 된다. 그러나 임상학적으로 중요시되는 모든 균들을 분리하고 동정하는 데는 1% NaCl이 첨가된 배지가 필요하며, *Vibrio* 균은 *Vibrionaceae* 과(科)에 속하며 이 과(科)에는 *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* 및 *Photobacterium* 속이 있다(2).

Vibrio 균의 일반적인 특징은 직경이 0.5~0.8 μm 이며 길이가 1.4~2.6 μm 인 단편모를 가지면서 운동성이 있고 Oxidase 양성, 그람음성 간균이고 약간 굵은 모양이며 포도당은 발효하나 가스를 생성하지 않는 특징을 가지고 있다. 또한 DNA G+C mole % 비율이 38~51% 사이에 있으며 이는 57~60% 사이에 있는 *Aeromonas*와는 다르다(2).

Vibrio 균 속 중에는 사람에게 병원성을 일으키는 균으로 많이 알려진 *V. cholerae* O1(3)과 *V. parahaemolyticus*이 있다. *V. parahaemolyticus*균은 TCBS (Thiosulphate citrate bile-salts sucrose) 배지에서 잘 자라며, 배지 상에서 노란색을 나타내는 콜레라균과는 달리 녹색 집락을 나타내는 균으로 sucrose를 발효하지 못하는 특성을 가진다(4).

*V. parahaemolyticus*균의 혈청형에는 O혈청형과 K혈청형으로 나눌 수 있는데 O(somatic) 혈청형은 11가지 혈청군으로 나누어지고, O혈청형을 확인할 때는 O항원을 감싸고 있는 K(capsular) 캡슐 항원을 파괴하여 시험해야만 한다. 장염비브리오균에서 K혈청형은 매우 중요하게 생각되며, 현재 71가지의 K항혈청형이 개발되었다. 따라서 장염비브리오균에서는 O항원과 K항원을 항상 같이 표기하여 구별하며, 설사환자에서 분리되는 *V. parahaemolyticus*는 대부분 O, K혈청형을 결정할 수 있다.

최근 일본, 대만, 한국 등지에서 분리되는 장염비브리오균의 혈청형은 특정 혈청형 (O3:K6)이 범세계적으로 유행하고 있는 것으로 보고되고 있다(5-6).

최근의 분자생물학의 발전으로 Kanagawa 현상을 나타내는 유전자는 thermostable direct hemolysin (*tdh*)이 관여하는 것으로 나타났다(7).

설사환자에서 분리한 장염비브리오균의 *tdh* 유전자 보유 여부를 조사한 결과 대부분의 균들은 *tdh* 유전자를 가지고 있는 것으로 보고되고 있으며, 반면 자연환경에서 분리되는 균은 *tdh* 유전자를 보유하지 않으며, 이러한 결과들은 Kanagawa 현상과 일치하는 것으로 보고되고 있다(8).

또한 일부 설사환자에서 분리한 장염비브리오균에서는 *tdh* 유전자가 검출되지 않고 *tdh*와 유사한 *trh* 유전자를 검출되기도 한다. 이 *tdh* 유전자는 *trh* 유전자와 유전자 염기서열구조가 80% 정도가 비슷하고 그 기능도 유사한 것으로 밝혀지고 있다. *tdh*나 *trh* 독소 유전자를 조절하는 유전자는 *toxR*과 *gyrB* 유전자 존재 여부에 따라 독소 유전자 발현에 관여하는 것으로 보고되고 있다(9-10).

병원체를 감별하는 방법 중에 세균의 염색체 DNA를 특수 제한 효소로 분절하여 그 분절을 전기영동하여 분석하는 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 방법을 진단에 많이 이용하고 있으며, *Salmonella*, *E. coli* O157, *Shigella*, *Vibrio cholerae* O1, *Staphylococcus aureus* 등 많은 균에 사용하고 있다(11).

장염비브리오균은 일본에서 식중독 발생 원인균으로 1950년에 밝혀진 이후 설사증의 주요 병원균으로 작용하고 있으며, 일본에서는 식중독의 70% 정도가 장염비브리오균에 오염된 해산물 섭취가 원인인 것으로 보고하고 있으며, 국내에서도 1999년에는 천여 명이 장염비브리오균에 의한 식중독 발생(12)을 보여주고 있으며 최근 몇 년 동안 장염비브리오균에 의한 식중독 발생환자가 급증하는 추세에 비추어 볼 때 장염비브리오균에 대한 그 중요성이 심각하게 대두되고 있다.

따라서 본 연구는 최근 한국에서 유행하는 장염비브리오균의 특성을 파악하기 위하여 1999년부터 2001년 사이 국내 식중독 발생 환자로부터 채취한 대변 시료로부터 분리 동정된 균주의 세균학적 특성 시험, 항균제 감수성 여부, 독소유전자와 독소 조절유전자의 검출 및 보유여부를 PCR, RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination)로 시험하였으며, 각 지역 간의 분리 세균을 GS-PCR, PFGE 시험으로 병원체 상관 관계를 분석하였으며, 독소조절유전자의 염기서열을 분석하여 국내에서 발생한 병원체의 특성을 파악하여 전염병 방역대책에 필요한 기초 자료를 제공하는데 그 연구 목적을 두었다.

재료 및 방법

시험균주

1999년부터 2001년 사이 전국 보건환경연구원의 보건망을 통하여 국립보건원에 의뢰된 식중독 환자에서 분리한 장염비브리오 120균주를 분양 받아 본 실험 균주로 사용하였다.

생화학적 특성

환자에서 분리한 균주를 TCBS 및 Tryptic soy agar (TSA) 평판배지에 배양하여 녹색집락을 선별하여 FDA(1992), Bergey's manual, Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria와 Manual of clinical microbiology, Tests for identification of medical bacteria 및 감염병 실험실 진단지침(1996) 방법 등에 따라 시험관법을 사용 생화학적 시험을 수행하여 동정하였다.

혈청학적 특성

*V. parahaemolyticus*의 O항원 및 K항원 진단 (Denka seiken, Japan)은 11가지의 O 항혈청과 9가지의 다가 (Multivalent) K항혈청과 78가지의 단가 (Monovalent) K 항혈청을 사용하여 slide 응집반응으로 혈청형을 확인하였다.

항균제 감수성 시험

항균제 감수성 검사는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2000), Lorian (1996) 등의 디스크 확산법으로 BBL (Baltimore Biological Laboratories,

USA)사의 Ampicillin 등 18종류의 항균제 디스크를 사용하여, 37°C에 18시간 배양, 성장 발육 저지 억제대를 직경으로 측정하여 표준 판독표와 비교하여 감수성 여부를 판독하였다. 항균제 감수성 검사의 정도관리를 위해 표준균주로 *E. coli* ATCC 25922 과 *S. aureus* ATCC 25923을 사용하였고, 감수성 기준은 NCCLS (2000)의 기준에 따랐다.

독소유전자 시험

toxR, *gyrB* 유전자와 *tdh*, *trh*의 유전자 검출은 PCR 방법을 사용하였다. 독소 유전자의 특이 염기배열 부위를 primer (Table 1)로 합성하여 PCR (Fields 등, 1992)을 실시하였다. 시험균주를 TSB 5 ml에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양한 균액을 10분간 가열한 후 균액 5 μ l, deoxynucleoside triphosphate mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP) 2 μ l, 10x PCR용액 5 μ l, primer (100 pmol/ μ l) 1 μ l, Taq polymerase 1.25 U를 혼합하여 총 부피를 50 μ l로 제조하여 Thermal cycler로 증폭과정을 실시하였다.

toxR 유전자 증폭과정은 96°C에서 5분간 예비 가열 후, 94°C에서 denaturation 1분, 63°C에서 annealing 1분 30초, 72°C에서 extension 1분 30초간의 주기로 20회 실시하였다. 이들 primer가 표적으로 하는 DNA의 크기는 368 bp이다. *gyrB* 유전자 검출 PCR은 위에서 언급된 시험과정과 동일하며 60°C에서 annealing 1분 30초로 30회 실시하게 조절하였으며, 이들 primer가 표적으로 하는 DNA의 크기는 285 bp이다.

tdh, *trh*의 유전자 검출은 반응과정은 94°C에서 5분간 예비 가열 후, 94°C에서 denaturation 1분, 72°C에서 extension 1분을 한 주기로 하여 35주기를 시행하였다. 이들 primer가 표적으로 하는 *tdh* DNA의 크기는 199 bp이며, *trh*의 DNA 크기는 250 bp이다. PCR을 통해 얻어진 증폭 산물은 2% TBE agarose gel에 loading하여 100 V로 1시간 전기 영동한 후 ethidium bromide 용액 (0.25 μ l/ml)으로 15분간 염색하여 transilluminator로 밴드 패턴을 확인하고 필터가 부착된 플라로이드 카메라로 촬영하였다.

Table 1. Sequences of primer for polymerase chain reaction for detection of the target DNA fragment

Target gene	Primer pair	Size of amplified product
<i>toxR</i>	5'-GTCITCTGACGCAATCGITG-3'	368 bp
	5'-ATACGAGTGGTGGCTGCATG-3'	
<i>gyrB</i>	5'-CGGCGTGGGTGTTTCGGTAGTA-3'	285 bp
	5'-TCCGCTTCGCGTCATCAATA-3'	
<i>tdh</i>	5'-CCAAATACATTTACTTGG-3'	199 bp
	5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3'	
<i>trh</i>	5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3'	250 bp
	5'-CATTTCGCTCTCATATGC-3'	

독소생성시험

Mannitol Peptone 배지 (Polypeptone 2 g, D-Mannitol 0.5 g, NaCl 5 g, distilled water 100 ml, pH 7.8)에 37°C 18시간 배양한 후 3000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 시험액으로 사용하였다. 독소시험은 KAP-RPLA "Seiken" (Denka Seiken Co., LTD. Japan) kit를 사용하였다.

toxRS 유전자 염기서열 분석 시험

독소 유전자 조절효소인 *toxRS* 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 *toxRS1* (5'-TATCTCCCATGCGCAAACGTA)과 *toxRS2* (5'-ACAGTACCGTAGAACCGTGAT) primer를 이용하여 DNA를 증폭하여 1,406 bp DNA를 얻었다. PCR 용액 100 μ l에 PEG (2.5 M NaCl, 20% polyethylene 8000) 용액 60 μ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 정치시킨 후 1200 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전시키고 상층액을 버린 다음 70%의 알코올로 세척하였다. 침전된 DNA를 건조시킨 후 20 μ l의 증류수에 녹여 사용하였다. 염기서열 반응은 *toxRS1*과 *toxRS2* primer를 사용하여 DNA sequencing kit (BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0)으로 반응시키고 알코올 침전법으로 DNA를 정제하여 자동 염기서열 분석기 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 확인하였다.

Group-specific PCR 시험

Wong 등(11)의 보고에 따라 새로운 O3:K6를 특이적으로 검출할 수 있는 변화된 primer를 제작하여 (5'-TAATGAGGT AGAAACAA-3'), AQ3815균주의 *toxRS* 서열의 561부위로부터 576 영역과 1,211로부터 1,196 영역을 primer 서열로 사용하였고, 다음 방법으로 PCR를 실시하였다. 실험균주는 TSB 5 ml에 접종하여 37°C 18시간 진탕 배양한 균액을 10분간 가열한 후, 균액 5 μ l, deoxynucleoside triphosphate mixture (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP) 2 μ l, 10x PCR용액 5 μ l, primer (100 pmol/ μ l) 1 μ l, Taq polymerase 1.25 U를 혼합하여 총 부피를 50 μ l로 제조하여 Thermal cycler로 증폭과정을 실시하였다. 유전자 증폭과정은 96°C 5분간 예비 가열 후, 96°C에서 denaturation 1분, 45°C에서 annealing 2분, 72°C에서 extension 3분간의 주기로 25회 실시하여, 유전자 증폭산물은 2% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide에서 염색하고 UV상에서 관찰하였다.

PFGE (Pulsed- field gel electrophoresis) 시험

PFGE 실험은 Gautom(13)의 방법을 변형하여 실험하였다. 균을 TSB배지에 접종하여 18시간 배양한 다음 배양액 1 ml을 취하여 균체를 수거하여 wash buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA)로 세척한 다음, wash buffer에 재현탁시키고 재현탁액을 VITEK colorimeter를 이용하여 20% 투명도로 조절한 다음 50°C water bath에 넣고, 미리 준비한 2% agarose와 1 : 1 (v/v)의 비율로 섞은 후 mold에 넣고 4°C에서 15분 동안 굳혔다.

굳힌 plug는 Lysis buffer [1 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 100 mM EDTA, 0.5% Na-deoxycholate, 2 μ g/ml RNase, 1 mg/ml lysozyme, 1 mg/ml Protease K]에 넣어 55°C에서 약 24시간 반응시킨 다음 Lysis buffer를 제거하고 plug를 TE buffer로 30분 4회 세척하였다. 이 plug를 200 μ l의 제한효소 반응용 buffer에 넣어 실온에서 1시간 동안 평형화시킨 후 다시 새로운 200 μ l의 제한효소 반응용 buffer로 교체하고 Not I 25 unit를 넣은 후 37°C에서 4시간 반응시키고 CHEP DR11 system (BioRad, USA)을 이용하여 6 V/cm, pulse time 1초~25초, 22시간, 14°C, 0.5x TBE의 조건으로 전기영동을 실시하였다.

결과 및 고찰

생화학적 특성 시험

설사환자에서 분리된 세균을 시험관 배양 반응법으로 시험한 결과 표준 균주인 *V. parahaemolyticus* ATCC 17803 균주의 반응 결과와 같이 전형적인 장염비브리오균의 생화학적 특성을 가진 것으로 나타났다. ONPG 반응시험, Citrate 이용 시험, VP 반응, Arginine dehydrolase 시험에서는 모두 음성반응을 나타내었으며, Oxidase 시험, Indole 생성시험, 운동성 시험, Lysine decarboxylase, Ornithine decarboxylase, Nitrate 환원 시험에서는 모두 양성반응으로 나타났다. Nutrient broth배지에서 NaCl 농도에 따른 성장시험에서 무첨가에서는 모두 성장을 하지 않았지만, 6% NaCl 첨가에서는 모두 성장, 8% NaCl 첨가에서는 1999년도 80균주 중 2균주, 2001년도 20균주 중 4균주가 성장하지 않았을 뿐 모두 증식하는 차이를 보였다. Urease 생성시험에서 1999년 80균주 중 3균주가 양성반응을 보였다. Glucose을 포함한 12가지 당 발효시험에서 Mannitol, Mannose, Maltose, Arabinose, Glucose을 모두 발효하는 것으로 나타났으며, Sucrose는 발효 음성을 나타내었다 (Table 2).

혈청형별 분류시험

설사 환자에서 분리한 장염비브리오균의 O, K 혈청형 시험 결과는 모두 17가지의 O & K 혈청형을 나타내었다. O3 : K6 혈청형이 82 균주로 68.3%로 가장 많은 혈청형으로 나타났다. 다음으로 O3 : K46 혈청형이 16 균주로 13.3%로 나타났다. 이 결과는 일본, 대만 등지에서 큰 유행을 일으키고 있는 혈청형과도 일치하였다(11, 14).

1999년 분리 균 중에서는 O3 : K6 균이 85%인 68 균주로 가장 많은 형으로 조사되었으며, 2001년도에도 시험 균주 20 균주 중 55%인 11 균주가 O3 : K6 형으로 나타났다. 반면 2000년 분리 균 20 균주 중 80%인 16 균주가 O3 : K46 형으로 나타났으며 다음으로 15%인 3 균주가 O3 : K6 혈청형으로 나타났다.

항균제 감수성 시험

항균제 내성 시험 결과 Ampicillin, Vancomycin, Ticacillin에는 높은 내성을 보였으며, Ampicillin에는 1999년 설사환자에서 분리한 장염비브리오균의 경우 93.8%, 2000년과 2001년도 분리 균은 각각 85%의 내성을 보였다. 반면 β -lactamase 억제제가 첨가된 Ampicillin/Sulbactam에는 1999년~2001년 설사환자 분리균 모두 감수성을 나타내었다. 각 항생제의 내성 Pattern은 Ampicillin, Ticacillin, Vancomycin의 3가지 약제에

Table 2. Biochemical characteristics of *V. parahaemolyticus* isolated from human

Biochemical tests	Reference strain	Isolates from human(n)		
	ATCC 17803	1999(n=80)	2000(n=20)	2001(n=20)
ONPG	-	-(80)	-(20)	-(20)
Indole production	+	+(80)	+(20)	+(20)
Simmon's Citrate	-	-(80)	-(20)	-(20)
Oxidase	+	+(80)	+(20)	+(20)
MR	+	+(80)	+(20)	+(20)
VP	-	-(80)	-(20)	-(20)
Motility	+	+(80)	+(20)	+(20)
Growth in NB with 0% NaCl	-	-(80)	-(20)	-(20)
Growth in NB with 6% NaCl	+	+(80)	+(20)	+(20)
Growth in NB with 8% NaCl	+	+(78)	+(20)	+(16)
Lysine decarboxylase	+	+(80)	+(20)	+(20)
Arginine dihydrolase	-	-(80)	-(20)	-(20)
Ornithine decarboxylase	+	+(80)	+(20)	+(20)
Gelatine hydrolysis	+	+(79)	+(20)	+(20)
KCN	-	-(80)	-(20)	-(20)
Urea hydrolysis	-	-(78)	-(20)	-(20)
Nitrate reduction	+	+(80)	+(20)	+(20)
Acid production from; L-Arabinose	+	+(70)	+(18)	+(20)
Cellobiose	-	-(79)	-(19)	-(20)
Dulcitol	-	-(80)	-(20)	-(20)
D-Glucose	+	+(80)	+(20)	+(20)
Lactose	-	-(80)	-(20)	-(20)
D-Mannitol	+	+(80)	+(20)	+(20)
D-Mannose	+	+(80)	+(20)	+(20)
Raffinose	-	-(80)	-(20)	-(20)
Sucrose	-	-(80)	-(20)	-(20)
Salicine	-	-(80)	-(20)	-(20)
D-xylose	-	-(80)	-(20)	-(20)
Maltose	+	+(80)	+(20)	+(20)

동시에 내성을 가진 균주가 52.5%인 63균주가 내성을 나타내었으며, 다음으로 23.3%인 28균주가 Ampicillin, Cephalothin, Ticacillin, Vancomycin의 4가지 다약제에 동시 내성을 나타내었다.

독소유전자 시험

독소조절유전자 *toxR*, *gyrB*는 시험균주 모두 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 독소유전자 *tdh*는 120균주 중 109균주가 독소유전자를 보유하고 있으며, 11균주가 유전자를 보유하지 않는 것으로 나타났다. *trh* 유전자는 시험균주 120균주 중 3균주만이 *trh* 유전자를 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 이들 3균주들은 urease 양성 균주들이었다(Fig. 1, 2, 3).

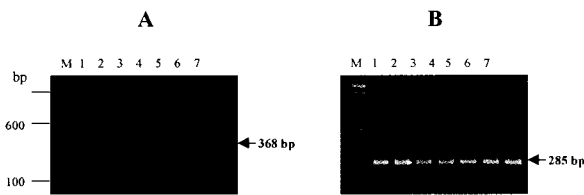


Figure 1. PCR assay detects the *toxR* gene (A) and *gyrB* gene (B) of *Vibrio parahaemolyticus*. Lane M, 100bp DNA ladder, Lane 1 to 7, isolate 161 to 167.

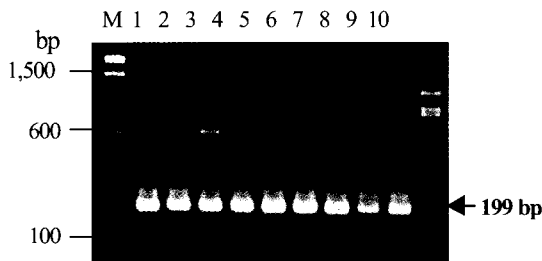


Figure 2. PCR assay detects the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Lane M, 100bp ladder. Lane 1 to 9, isolate 159 to 167; lane 10, isolate 171.

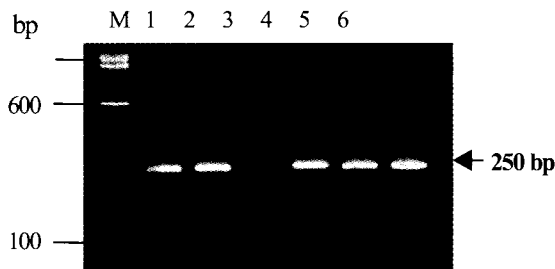


Figure 3. PCR assay detects the *trh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Lane M, 100bp DNA ladder. Lane 1, ATCC 17802; lane 2, ATCC 17803; lane 3, ATCC 27519; lane 4, isolate 86; lane 5, isolate 91; lane 6, isolate 125.

toxR 유전자 368 bp와 *gyrB* 유전자 285 bp을 증폭산물을 이용하여 PCR을 시험한 결과 장염비브리오균 120 균주 모두가 *toxR*과 *gyrB*에 양성반응을 보여 장염비브리오 조기진단에 도움이 될 것으로 사료된다.

또한 *tdh* 유전자 199 bp을 나타낸 유전자로 PCR 시험에서 식중독환자 유래 분리균은 120 균주 중 90.8%인 109 균주가 *tdh* 유전자를 가지고 있는 것으로 나타났으며, TDH 독소 발현은 89.1%인 107 균주로 나타났다. 즉 *tdh* 유전자는 가지고 있으나, KP 시험이나 TDH RPLA 시험에서 음성반응으로 독소단백질 발현은 나타나지 않았다. 이는 Shirai 등(15)의 결과보다 매우 높은 *tdh* 유전자 보유를 나타낸 결과이다.

250 bp 크기의 *trh* 유전자를 검출하기 위하여 PCR법으로 확인한 결과 120 균주 중 3 균주가 확인되었으며, *trh* 유전자만 보유하고 있는 균주는 검출되지 않았으며, 사람유래 식중독 환자에서 분리된 국내 장염비브리오균의 위장관염 원인은 *tdh* 유전자에 의한 것으로 확인되었다. 본 시험에서 특이한 것은 urease 양성균이 120 균주 중 3 균주가 나왔으며, 이 균주들은 *tdh*, *trh* 유전자를 동시에 가지고 있으며, Kanagawa 현상에서 양성반응으로 나타났으나, TDH 역가에서는 다른 균의 역가가 2,048배에 비해서 매우 낮은 16배 정도를 나타내었다.

Kelly 등(16), Kaysner와 Hill(17), Park 등(18)은 장염비브리오균에서 생화학 특성시험에서 urease (ure+) 양성 균은 병원성을 나타내는 TDH+ 양성균으로 예측할 수 있는 지표로 사용할 수 있다고 하였으나 본 시험에서는 3개의 urease 양성균이 모두 *tdh*와 *trh*유전자를 갖고 TDH 독소를 나타내었지만 TDH 역가에서는 다른 urease 음성인 균보다도 낮게 나와서 위의 Kaysner와 Hill(17)의 시험 결과를 확인하는 데는 좀 더 많은 urease 양성균으로 시험을 해야 될 것으로 사료된다.

Kanagawa 현상시험

5%의 양 혈액이 첨가된 Wagatsuma 배지에서 시험균주 모두 음성반응으로 나타났으며, 2균주가 약한 용혈반응을 나타내었다. 사람혈액을 첨가한 반응시험에서 120균주 중 89.1%인 107 균주가 Kanagawa 양성반응을 보였다.

TDH 독소 생성시험

상층액 독소와 항독소를 감작시킨 라텍스비드 반응시험에서 120 균주 중 107 균주가 독소생성 양성반응으로 나타났으며, 25 균주를 선별하여 독소생성 역가를 시험한 결과 urease 양성반응을 보였으며, *tdh*, *trh* 유전자를 가진 3 균주는 16배에서 32배로 매우 낮은 독소생성 역가를 보였으나, 그 외에 다른 시험 균주는 512배부터 4096배까지 높은 독소 생성역가를 나타내었다. 512배 역가를 나타낸 균주는 3균주, 1024배 역가를 나타낸 균주는 13균주, 2048배 역가를 나타낸 균주는 4균주이였으며, 4096배 높은 독소 생성 역가를 나타낸 균주도 2균주나 나타났다. 이 연구결과는 Nishibuchi와 Kaper(7)의 결과와도 비슷하게 나타났다.

toxRS 유전자 염기서열 분석시험

NCBI의 Gen Bank에 1993년도에 등재된 장염비브리오균의 *toxRS*유전자의 염기서열과 비교 분석하였을 때 시험균의 대부분이 576번째 guanine이 adenine으로 900번째 guanine이 adenine으로 1002번째 cystosine이 thymine으로 1196번째 cystosine이 thymine으로 1214번째 adenine이 thymine으로 1244번째 guanine이 adenine으로 1463번째 adenine이 thymine

으로 바뀐 결과를 보였으며, 이 중 시험균주 91, 125, 175번 균주는 7개의 염기서열이 위에서 언급한 서열 번호처럼 1993년도에 등재된 염기서열과 같은 결과를 나타내었다.

Group specific PCR시험

최근에 전 세계적으로 유행하는 장염비브리오균의 O3 : K6혈청의 특성을 조사한 결과 1996년 이전에 분리된 O3 : K6와는 다른 *toxRS* 염기서열을 기초로 650 bp 증폭산물을 가지는 특이 Primer 염기 서열을 나타내었다(Fig. 4). 혈청형 O3 : K6 균은 대부분 같은 유행 그룹에 포함되나 일부에 O3 : K6, O3 : KUT 혈청형은 오염원에 따라 그 결과가 과거에 유행한 원인균으로 나타났으며, O3 : K46 혈청형은 새로운 유행을 일으키는 O3 : K6 혈청형 그룹에 포함되기도 하였다. Urease 양성균은 GS - PCR 시험에서 음성반응을 보여 다른 유형으로 판단되며 O3 : K46 혈청형도 GS-PCR에서는 양성 반응을 보여 같은 그룹 유래에서 시작된 것으로 사료된다. Matsumoto(10)은 1980년도에서 1998년까지 여러 나라에서 분리한 장염비브리오균의 혈청 형별에 대한 GS-PCR을 시험한 결과 1995년 이후 분리된 O3 : K6와 O3 : K68 균에서 GS-PCR 양성 반응을 나타내어 최근에 유행하는 균은 새로운 형의 출현이라고 제시하고 있다. 따라서 국내에서 분리된 대부분이 새로운 형의 장염비브리오균에 의한 유행을 일으킨 것으로 사료된다.

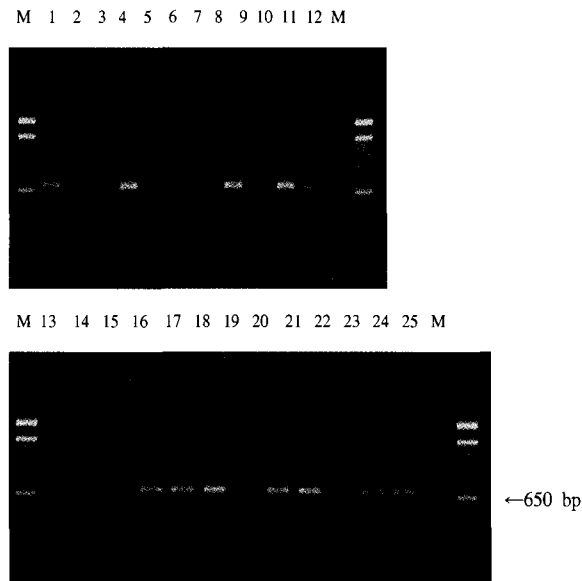


Figure 4. GS-PCR results for representative strains. Lane M, Molecular weight marker (100bp DNA ladder); lane 1, 61; lane 2, 67; lane 3, 86; lane 4, 90; lane 5, 91; lane 6, 93; lane 7, 96; lane 8, 117; lane 9, 125; lane 10, 134; lane 11, 135; lane 12, 143; lane 13, 144; lane 14, 147; lane 15, 149; lane 16, 150; lane 17, 151; lane 18, 153; lane 19, 154; lane 20, 158; lane 21, 165; lane 22, 166; lane 23, 167; lane 24, 172; lane 25, 175.

PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) 시험

식중독 환자 유래 25균주 PFGE 시험결과 16~19개의 DNA 밴드를 나타내었다. 이들 밴드 결과를 기초로 Tenover 등(19)의 방법에 따라 *V. parahaemolyticus* 균들의 유형이 가장

많이 나오는 A type을 중심으로 나누었다.

식중독 환자 장염비브리오균은 모두 크게 3가지 type으로 나타났다. O3 : K6 및 O3 : K46 형은 A type으로 나타났으며, 같은 O3 : K6 혈청형이라도 Urease 양성인 균은 C type으로 나타났으며 역학적으로 서로 관련성이 있는 균은 같은 type으로 나타났다.

요 약

본 연구는 식중독 환자로부터 분리한 장염비브리오균 120 균주를 세균학적 특성시험, 항균제 감수성 여부, 독소 유전자와 독소조절유전자의 검출 및 보유 여부를 PCR, RPLA 로 시험하였으며, 각 지역간의 분리 세균을 GS-PCR, PFGE 시험으로 병원체 상관 관계를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 장염비브리오균은 0%의 NaCl 농도에서는 성장을 보이지 않았고, 8% NaCl이 첨가된 농도에서는 성장을 보였다. 국내 설사환자의 장염비브리오균의 O, K 혈청형은 17가지로 나타났으며, 이 중 O3 : K6형이 68.3%로 가장 많았다. Ampicillin 등 18가지 항균제 시험에서 Ampicillin, Ticacillin 에 높은 내성을 보였으며, Ampicillin, Ticacillin, Vancomycin 에 동시 내성을 나타낸 경우가 52.5%로 나타났다. 독소조절 유전자 *toxR*은 PCR시험에서 시험균주 모두 368 bp 크기의 유전자를 가지고 있었으며 장염 비브리오균의 조기진단에 유용한 것으로 확인되었고, 독소유전자 *tdh*는 120균주 중 109 균주만이 199 bp 크기의 유전자를 보유하고 11균주가 음성이었다. *trh* 독소 유전자를 보유한 균주는 시험균주 중 3 균주만이 250 bp 크기의 유전자를 보유하고 있었으며, *tdh*, *trh* 유전자를 동시에 가지고 있는 균주는 3균주로 이 균주의 TDH 독소 생성능은 x16 정도로 독소 생성능이 미약했다. 독소생성 Kanagawa 시험에서 120균주 중 107균주가 양성반응을 나타내었으며, Kanagawa 양성반응을 보인 균주는 모두 *tdh* 유전자를 보유하고 있었다. Group Specific-PCR에서 최근에 유행을 일으키는 O3 : K6 혈청형의 유연관계를 찾는데 유용한 것으로 나타났다. 조절유전자 *toxRS* 염기서열을 분석한 결과 같은 혈청형이라도 3균주는 7개의 염기서열 차이를 나타내었으며, 이는 현재 유행을 일으키는 균주와는 다른 균주임을 확인하였다. PFGE로 보다 더 세분화하여 혈청관계를 분류할 수 있었으며, 식중독 환자 유래 장염비브리오균은 3 가지 type으로 나타났으며, 이들 균주 사이에는 상호 밀접한 상관관계를 나타내었다. 따라서 PFGE 기법으로 얻어진 결과는 분자 역학적으로 유용한 도구로 사용될 수 있음을 확인하였다.

REFERENCES

1. Isenberg, H. D. (1992), Clinical Microbiology Procedures Handbook, pp.384 American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Murray, P. R., E. J. Baron, A. M. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (1995), Manual of clinical microbiology, 6th ed., 678-685 ASM Press. Washington, D.C.

3. Albert, M. J. (1994), Minireview *Vibrio cholerae* O139 Bengal, *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2345-2349.
4. Kelly, M. T., F. W. Hickman-Brenner, and J. J. Farmer III (1991), *Vibrio* in Manual of Clinical Microbiology. (Ed.)
5. Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, N. G. Balakrish, and M. Nishibuchi (1997), Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and Isolation of strains from the same clonal group from southeast asian travelers arriving in Japan, *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3150-3155.
6. Bag, P. K., S. Nandi, P. K. Bhadra, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, M. Nishibuchi, T. Hamabata, S. Yamasaki, Y. Takeda, and G. B. Nair (1999), Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread, *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2354-2357.
7. Nishibuchi, M. and J. B. Kaper (1995), Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* : a virulence gene acquired a marine bacterium. *Infect. Immun.* **63**, 2093-2099.
8. Tada, J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi, and Y. Takeda (1992), Detection of the thermostable direct hemolysin gene (tdh) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (tdh) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction, *Mol. Cell. Probe.* **6**, 477-487.
9. Vuddakul, V., T. Nakai, C. Matsumoto, T. Oh, T. Nishino, C. H. Chen, M. Nishibuchi and J. Okuda (2000). Analysis of *gyrB* and *toxR* gene sequences of *vibrio hollisae* and development of *gyrB*- and *toxR*- targeted PCR methods for isolation of *V. hollisae* from the environment and its identification, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(8), 3506-3514.
10. Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaka, P. Garg, and T. Rammamurthy (2000), Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analysis, *J. Clin. Microbiol.* **38**, 578-585.
11. Wong, H. C., S. H. Liu, T. K. Wang, C. L. Lee, C. S. Chiou, D. P. Liu, M. Nishibuchi, and B. K. Lee (2000). Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia, *App. Environ. Microbiol.* **66**(9), 3981-3986.
12. Kim, Y. B., J. Okuda, C. Mastumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi (1999), Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene, *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1173-1177.
13. Gautom, R. (1997), Rapid PFGE protocol for typing of *E. coli* O157:H7 and other gram-negative organism in 1 day, *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2977-2980.
14. Okuda, J., M. Ishibashi, S. L. Abbott, J. M. Janda, and M. Nishibuchi (1997a), Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *trh*-related hemolysin (*trh*) genes in the urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States, *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1965-1971.
15. Shirai, H., H. Ito, T. Hirayama, Y. Nakamoto, N. Nakabayashi, K. Kumagai, Y. Takeda, and M. Nishibuchi (1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (THD) and THD-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis, *Infect. Immun.* **58**(11), 3568-3573.
16. Kelly, M. T. and E. M. D. Stroh (1989), Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest, *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2820.
17. Kaysner, C. A., and W. E. Hill (1994), Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in food and water, In I. K. Wachmuth, P. A. Blake and Olsvick (Eds.), *Vibrio cholerae and cholera*, ASM Press, Washington, D.C.
18. Park, K. S., I. Tetsuya, Y. Yoshiharu, O. Tomohito, Y. Koichiro, and H. Takeshi (2000), Genetic Characterization of DNA Region Containing the *trh* and *ure* Genes *Vibrio parahaemolyticus*, *Infect. Immun.* **68**(10), 5742-5748.
19. Tenover, F. C., D. A. Robert, V. G. Richard, A. M. Patricia, E. M. Barbara, H. P. David, and S. Bala (1995), Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by PFGE : criteria for bacterial strain typing, *J. Clin. Microbiol.* **33**(9), 2233-2239.