

# Infrequent Restriction Site-Polymerase Chain Reaction에 의한 *Vibrio vulnificus* 유전형 분석

백은정, 강정옥, 최태열

한양대학교 의과대학, 진단검사의학과

## Genomic analysis of *Vibrio vulnificus* by Infrequent Restriction Site-Polymerase Chain Reaction

Eun Jung Baek, Jung Oak Kang and Tae Yeal Choi

Department of Laboratory Medicine, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background** : *Vibrio vulnificus* sepsis is one of the notifiable disease(Class 3) in Korea. It is usually acquired through the consumption of raw or undercooked seafood in summer. We studied the clinical findings of *V. vulnificus* septicemia and the genomic patterns of *V. vulnificus* isolates.

**Methods** : Seven patients with *V. vulnificus* septicemia were admitted to Hanyang University hospital from 1998 to 2002. We analysed the clinical findings and the genomic patterns by infrequent restriction site-polymerase chain reaction(IRS-PCR).

**Results** : All patients were over forty years old, and five were male. The patients had underlying diseases: five with liver cirrhosis, two with DM, and four patients with heavy alcoholism. Five of seven patients had history of ingesting raw fish and four had tissue necrosis with bullae or vesicles in their extremities. Four patients who died showed disseminated intravascular coagulation symptoms. We applied IRS-PCR to 6 isolates from blood and 2 isolates from wound. The six isolates from blood showed various genomic patterns that were all different from one another, while the two isolates from wound showed IRS-PCR patterns that were identical to the blood isolates of the same patients.

**Conclusions** : The genomic patterns of IRS-PCR are quite different in 6 cases of *V. vulnificus* isolates in Korea. (*Korean J Clin Microbiol* 2003;6(2):126-131)

**Key words** : *Vibrio vulnificus*, Infrequent restriction site-polymerase chain reaction, Sepsis, Genomic analysis

### 서 론

*Vibrio vulnificus*는 호염성 그람음성 간균이다. 주로 간 질환, 알코올중독 및 당뇨병 등 면역상태가 저하된 기저 질환을 가진 사람에서 오염된 어패류를 생식하거나, 오

염된 해수에 상처가 노출되었을 때 감염을 일으킨다[1]. 우리나라에서는 1979년 처음 *V. vulnificus* 패혈증 환자가 보고된 이래 매년 하절기 때 발생하고 있어 제 3종 법정 전염병으로 보건당국에 보고하게 되어 있다[2]. 주로 여름철에 해안가에서 발생하지만 겨울철이나 내륙지방에서도 환자가 발생하고 있으며[3,4] 질병의 임상경과가 매우 빠르고 위중하여 집중적인 치료에도 불구하고 사망률이 높다. 특히 우리나라에서는 만성 간질환의 유병율이 높고 어패류의 생식을 즐겨하기 때문에 임상양상, 검사 소견의 세심한 분석 및 균 분리 동정에 신속하여야 한다.

세균의 역학적 분류는 전통적으로 균의 생물학적, 생

접수번호: CM 6-2-01

교신저자: 최태열

(133-792) 서울시 성동구 행당동 17번지

한양대학병원 진단검사의학과

TEL : (02)2290-8974 FAX : (02)2298-1735

E-mail : tychoi@hanyang.ac.kr

화학적 특성과 항생제 감수성 검사 및 혈청학적 방법 등이 이용되어 왔다[5]. 최근에는 randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석법, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)법 등으로 대체되고 있지만[5-9], 시간과 비용이 많이 소요되고 너무 복잡한 과정, 낮은 해상도, 결과 해석이 어려운 제한점이 있다[5,8,9].

이에 연구자는 최근 사용되기 시작한 infrequent restriction site-PCR (IRS-PCR)을 *V. vulnificus*의 유전형 분석에 적용하여 분석하였고 좋은 분별력이 있음을 확인하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

1998년부터 2002년까지 한양대학병원에서 *V. vulnificus* 패혈증 7예의 임상양상과 검사소견을 조사하였으며, 혈액에서 분리된 *V. vulnificus* 6주와 피부병변에서 분리된 2주의 유전형을 분석하고자 IRS-PCR을 실시하였다.

### 2. 세균분리 및 동정

혈액 배양은 BATEC NR 660 (Bekton Dickinson, Maryland, USA) 및 BacT/ALERT 3D (Organon teknika, USA)를 사용하였으며, 피부병변검체는 혈액한천배지, thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) 배지에 접종하였다. 균 동정은 전통적 방법과 API 20E (bioMerieux, Marcy-L' Etoile, France)/Vitek GNI card (bioMerieux, MO, USA)를 이용하였다. 항균제 감수성 검사는 amikacin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, aztreonam, carbenicillin, cefepime, ceftazidime, ceftriaxone, cephalothin, gentamicin, ticarcillin/clavulanic acid, tobramycin, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대하여 Vitek GNI card (bioMerieux, MO, France)를 사용하였다.

### 3. Infrequent restriction site-polymerase chain reaction (IRS-PCR)

#### 1) Adaptors와 primers

사용한 adaptor와 primer의 oligonucleotide 염기서열은 Table 1에 수록되어 있다. Adaptors는 *HhaI* 제한효소로 절단된 DNA의 CG-3'와 *XbaI* 제한 효소에 의하여 절단된 DNA의 5'-CTAG에 ligation되도록 고안하였다. *HhaI* adaptor는 AH2가 AH1에 annealing 되게 제작하였고, *XbaI* adaptor는 AX2가 AX1에 annealing되게 제작하였다. AX1의 5'은 인산화시켜 ligation에 사용하였다. Primer로는 AH1과 PX-N을 사용하였다. PX-N은 AX1에 상보적인 염기서열을 가지며, 3'-말단에 nucleotide N (A,C,G,T)를 더 연장하여 제작하였다[10,11].

Table 1. Adaptor and primer oligonucleotides

Oligonucleotide	Sequences
<i>HhaI</i> adaptor	
AH1.....5'	AGA ACT GAC CTC GAC TCG CAC G-3' *
AH2.....3'	TG AGC GT-5'
<i>XbaI</i> Adaptor	
AX1.....5'	PO4-CTA GTA CTG GCA GAC TCT-3'
AX2.....3'	AT GAC CG-5'
<i>XbaI</i> primers	
PX-N <sup>†</sup> ...5'	AGA GTC TGC CAG TAC TAG AN-3'

\*AH1 serves as part of the adaptor and as the *HhaI* primer.

<sup>†</sup>N denotes any nucleotide A, T, G, or C.

### 2) Template DNA

분리된 *V. vulnificus*는 InstaGene (BioRad, Hercules, CA, U.S.A.)을 사용하여 DNA를 분리한 후 제한효소 *HhaI* (10U)과 *XbaI* (10U)으로 절단하였다(총량 12.5μL). T4 DNA ligase (1.5U), ATP (12.6pmol), 10x ligase buffer (2μL), *HhaI* adaptor (20 pmol), *XbaI* adaptor (20 pmol) 및 증류수로 총량 20μL로 맞추어 4°C에서 하룻밤 동안 ligation시킨 후 65°C에서 20분간 T4 DNA ligase를 비활성화시켰다. 검체는 5U *HhaI*와 5U *XbaI*으로 ligation된 restriction site를 다시 한번 37°C에서 20분간 절단하였다[10,11]. 사용된 효소는 모두 BioRad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

### 3) Amplification

PCR mixture는 1μL template DNA, 0.5U *Taq* DNA polymerase, deoxynucleoside triphosphates (200μM 각각), AH1 및 PX-G primer (1.0μM), 10x PCR buffer 및 증류수로 총량이 50μL이 되도록 혼합하였다. 증폭은 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA)을 이용하여 초기 denaturation은 94°C에서 5분간 그리고 denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 62°C에서 30초, extension은 72°C에서 90초로 40cycle 증폭하였다. 증폭 산물은 7% polyacrylamide gel (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 200 볼트로 2시간 동안 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하였다.

## 결 과

### 1. 임상적 특징

1998년부터 2002년까지 7명의 환자가 7월에서 11월 사이에 내원하였다. 환자는 모두 40대 이상이었으며 5명이 남자였다. 모든 환자가 간경화나 당뇨 같은 기저질환을 가지고 있었으며 4명은 심한 음주력이 있었다. 5명은 내원 수일 이내에 각각 아나고회, 봉어조림, 산낙지, 망둥어

Table 2. Summary of clinical findings of *V. vulnificus* septicemic patients

Case	1	2	3	4	5	6	7
Age	54	86	44	57	42	58	46
Sex	M	M	M	F	M	F	M
Disease	LC	DM	LC	LC	DM	LC	LC
Alcoholism	+	-	+	+	+	-	-
Raw fish	+	-	+	+	+	+	-
Skin wound	+	+	-	-	+	-	+
Blood culture	+	+	+	+	+	+	+
Wound culture	+	-	-	-	+	-	-
Temp (°C)	36.4	39.3	36.7	39	36.8	39.5	39.3
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	27	46	15	40	65	34	27
WBC ( $/\mu\text{L}$ )	10100	6100	14700	2100	14900	3000	3200
Band*(%)	45	27	2	32	2	1	24
Outcome	E	E	R	E	R	R	E

\*Band form neutrophils

Abbreviations: M, male; F, female; Temp, body temperature; PLT, platelet count; DM, diabetes mellitus; LC, liver cirrhosis; E, expire; R, Recover.

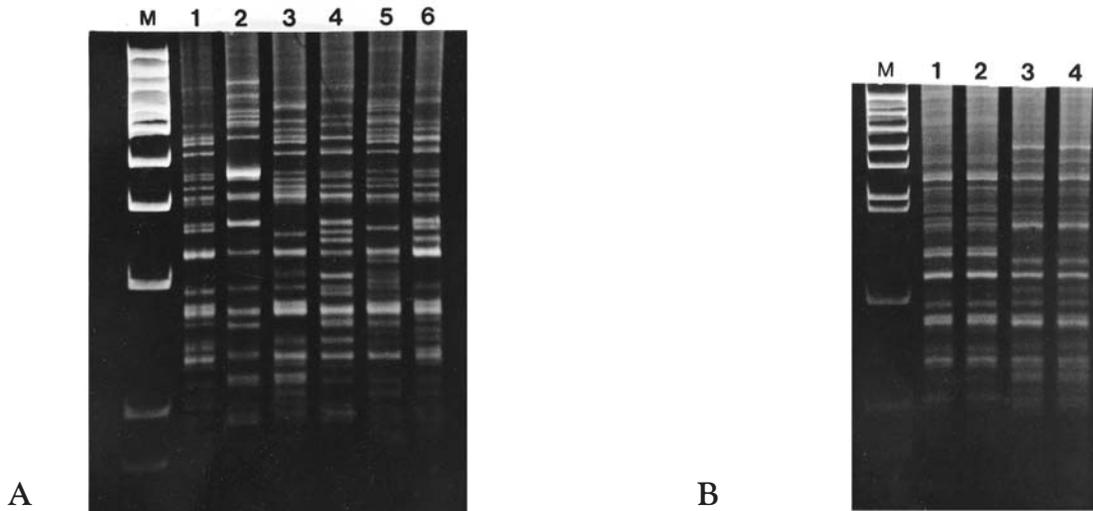


Fig. 1. IRS-PCR electrophoretic patterns of *V. vulnificus* isolates. (A): lane M, 100-bp ladder, lane 1 to 6, *V. vulnificus* isolates from blood of case 1 to 6. (B): lane M, 100-bp ladder, lanes 1 and 2, *V. vulnificus* isolates from blood and wound of case 1, lanes 3 and 4, *V. vulnificus* isolates from blood and wound of case 5. The IRS-PCR annealing temperature was 62°C, and the primers were PX-G and AH1.

회를 먹었다. 혈액에서는 7명 전부 *V. vulnificus*가 분리되었고, 그들 중 수포나 부종 및 홍반 등의 피부 병변을 보인 4명 중에서는 2명에서만 피부 병변에서 *V. vulnificus*가 분리 동정되었다. 응급실로 내원 당시 4명의 환자는 고열이 있었고 6명은 저혈압을 보였다. CBC상 모든 환자가 심한 혈소판 감소증을 보였으며, 백혈구 수는 다양한 수치를 보였지만 간상백혈구수 백분율이 높은 4명의 환자는 모두 수일 이내에 사망하였다. 증례 5의 환자는 다리의 괴사성 근막염으로 사지절단술을 시행하였고 급성신부전과 복수까지 동반되었다가 회복되었다(Table 2).

## 2. 세균학적 특징

계대 배양한 혈액한천 평판에는 크고 광택이 나는 용혈성 집락이 관찰되었고, TCBS 배지에서도 전형적인 녹색 집락이 관찰되었다. 균종 동정은 API 20E에서 *V. vulnificus*로 동정되었다. 전통적 감별시험에서 세균은 0%와 7.5% NaCl 배지에서는 증식되지 않았고, triple sugar iron agar의 사면과 고층반응이 산성이었고, H<sub>2</sub>S와 가스는 음성이었으며, 운동성 양성, oxidase 양성이었다. 항균제 감수성 검사에서 대부분 감수성을 보였지만 4번째 예는 amikacin과 gentamicin에, 5번째 예는 carbenicillin에 내성

을 보였다.

### 3. 유전학적 특징

환자 혈액에서 분리된 6주에 대한 IRS-PCR 결과는 증폭된 DNA의 band수와 위치가 모두 서로 달라서 분리된 균주들의 DNA 염기서열이 매우 다양함을 알 수 있다 (Fig. 1A). 피부병변에서도 균이 동정된 증례 1과 5의 경우 각각 혈액과 피부검체의 band 양상이 동일하였다(Fig. 1B). 주로 50bp부터 500bp 사이에서 증폭된 DNA band가 재현성이 좋았으며, 50bp 이하 및 500bp 이상의 DNA band는 결과 판독에서 무시하였다(Fig. 1). AH1과 PX-G를 primer로 사용하였을 경우 증폭된 DNA band 수는 15-20개 사이로 재현성도 우수하였다.

## 고 찰

*V. vulnificus*는 음식을 통한 감염증 중 치명율이 가장 높고 급속히 진행되므로 신속한 진단과 치료가 매우 중요하다. 평균 24-48시간의 잠복기를 거쳐 상처 감염증이나 원발성 패혈증을 유발하며 오한, 발열 등의 전신증상과 설사, 복통, 구토, 하지통증이 동반된다. 이외에도 *V. vulnificus*는 수막염, 근염, 각막염 및 자궁내막염의 원인균으로 보고되고 있지만 국내에서의 보고는 찾을 수 없었다[12-15]. 우리나라의 경우 원발성 창상 감염으로 오는 경우는 드물지만 미국에서는 패혈증과 원발성 창상 감염의 빈도가 비슷하다[16]. 치명율은 원발성 패혈증의 경우 50% 전후이고 원발성 피부감염증의 경우는 20%정도이며 사지절단이나 괴사조직 제거술이 필요한 경우가 종종 있다[16,17]. 연구에서 환자들은 대개 간질환, 당뇨병 등 만성질환이 있거나 면역기능이 저하된 사람들이며 호발연령은 40대 이상이 90% 이상을 차지하며 이는 외국의 경우와 비슷하였다[16]. 다만 외국의 경우 어패류의 종류가 거의 생굴인 반면 어패류의 생식을 선호하는 우리나라는 섭취한 어패류의 종류가 아나고회, 붕어조림, 산낙지, 망둥어회 등으로 매우 다양하였다[1,18]. 비브리오 패혈증은 우리나라에서 법정 전염병 3균으로, 국립보건원과 각 시도 보건환경 연구원 및 국립검역소가 매년 5월 1일부터 비브리오 패혈증 유행예측 조사사업을 펼치고 있으며 발생건수는 매해 23건에서 50여 건에 이르고 주로 서남해안지대에서 많다[2]. 전 세계적으로 해수온도가 올라가는 해안에 위치한 곳에서 산발적인 발병율을 보인다. 이 질병의 역학적인 대유행은 국내외적으로 아직 없으나 1996년과 1997년에 이스라엘에서 같은 감염원을 통해 62명이 감염된 예가 있었다[19]. 아열대에서 빈번하게 발병하지만 온대성 기후인 덴마크, 스웨덴, 네덜란드 등에서도 증례가 보고되고 있다[20-22]. 미 질병통제 및 예방 센터에서는 미국 걸프 해안 지역에서 증례를 수집하며, 플로리다주에서 1981년에서 1992년까지 125명의 환

자를 보고한 예가 있다[23].

병원소는 어패류, 플랑크톤, 해수, 갯벌 등이며 염도는 15-25ppt (part per thousand), 온도는 18°C 이상으로 올라갈 때 균 검출이 용이하지만 9°C에서 31°C에 이르기까지 광범위하게 검출된다[16,24]. 본 연구에서처럼 11월달에도 환자가 발생하고 외국여행 후 귀국한 환자의 혈액에서 1월에 균을 분리한 예도 있으므로 요즘은 계절에 관계없이 주의를 기울여야 할 것이다[4]. 이 질병은 매우 빠르게 진전하여 생존한 환자와 사망한 환자간에 임상상에서 유의한 차이가 밝혀지지 않고 있으나, 백혈구수나 혈소판수 등과 사망률이 밀접한 관련이 있다는 보고가 있다[17]. 본 연구에서 내원시 CBC의 간상백혈구수 백분율이 24-45%로 높았던 네 환자의 경우 수일 내 사망하였고 1-2%로 낮았던 세 환자는 회복되었다. 이것으로 보아 CBC상 간상백혈구의 증가가 예후에 영향을 미치는 것으로 나타났으나, 보다 많은 증례를 관찰하여야 할 것으로 사료된다.

이 균에 대한 역학적 분류로 생물학적, 생화학적 특성과 함께 항생제 감수성 검사, bacteriophage typing 및 혈청학적 방법 등이 이용되어 왔다. Tison 등[25]은 *V. vulnificus*를 주로 사람에게 감염을 일으키는 것을 biogroup 1로, 병든 밴장어에서만 분리되는 균을 biogroup 2로 분류하였다. 1996년 이스라엘에서 크게 유행한 균주를 biogroup 3으로 새롭게 분류하였다[19]. *V. vulnificus* 균의 항원에는 O항원과 H항원이 있고 O항원을 다시 O1-O3, O4A, O4AB, O5-O14의 15종으로 세분할 수 있는데, 우리나라에서는 O4A형이 유행한다고 보고되었다[5, 26]. 본 연구에서는 혈청형을 분석하지는 못했으나 혈청형에 의한 분류는 일부 균주가 항혈청에 중독반응을 일으키는 단점이 있다[5].

IRS-PCR은 임상 미생물 분야에서 역학적 연구시 분별력과 재현성이 높은 분자역학적 검사로, 일반 PCR을 수행할 수 있는 검사실이라면 기술상에 어려움 없이 사용할 수 있다. 또한 사용한 제한효소, adaptor, primer 종류에 따라 시행자의 의도대로 실험을 기획할 수 있으며, 다양한 제한효소의 구성을 통해 해석하기 쉬운 패턴을 찾아낼 수 있다. 사용된 adaptor의 DNA 염기서열을 알기 때문에 분석할 DNA의 염기서열에 대한 정보가 없어도 primer를 제작하여 증폭을 할 수 있는 장점이 있다[10,11]. 뿐만 아니라 모든 과정이 하루 내에 이루어져 신속성 면에서는 기존의 다른 분자역학적 방법보다 더 우수할 것으로 사료된다[27]. 특히, 가장 신뢰성 있는 방법으로 인정받아 온 분석법인 PFGE에 비하여 시간과 노력이 크게 단축되었고 비슷한 정도의 변별력과 재현성을 보였다[10].

아직 IRS-PCR을 적용해본 세균은 많지 않으나 대부분 균들의 경우 PFGE보다 해상도와 재현성이 뛰어나며 신속성, 기술의 간편함 등이 보고되고 있다[11,29-32]. IRS-PCR을 *Vibrio parahaemolyticus*[28], *Escherichia coli*[27], *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains[29], pathogenic

*Bartonella*[30], *Yersinia ruckeri* serovar O1과 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*[31], non-tuberculous mycobacterium[11]에 사용하였을 경우 재현성과 변별력이 매우 효과적이었다. 그러나 *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*의 경우는 높은 재현성에도 불구하고 변별력이 낮았지만 각 균에 효과적인 제한효소를 선택하면 변별력을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다[11,27,32]. 국내 모병원 중환자실에서 *Flavobacterium odoratum*의 유행시 IRS-PCR로 유전형질을 분석한 결과 동일 균주에 의한 병원 감염을 증명하는 경우도 있다[33]. *V. vulnificus* 유전형 감별을 위하여 IRS-PCR을 사용한 결과 각각 고유의 유전형을 나타내어 변별력이 우수하였다. 그러나 적용예가 너무 적어 전국적인 균주 수립이 필요하리라 생각된다.

본 연구에는 frequently cutting 제한효소인 *HhaI*과 infrequently cutting 제한효소인 *XbaI*을 사용했으며 IRS-PCR 상 50-500bp 사이에서 증폭되는 DNA band 수는 15-20개 정도였으며 재현성이 우수하였다. PX-G 대신에 PX-C, PX-A, PX-T를 이용해 각 primer에 따른 증폭의 특이성을 높일 수가 있는데 본 연구에서는 PX-G에 의한 band가 가장 뚜렷하게 나타났다[Data not shown]. 본 연구에서 여섯 환자에서 분리된 *V. vulnificus*의 DNA 유전형을 IRS-PCR로 분석한 결과 50-500bp 사이에서 다양한 형태의 DNA 증폭을 나타내어 *V. vulnificus*의 유전적 다양성을 알 수 있었다. 또한 상처 감염을 동반했던 두 환자의 경우 각각 혈액과 피부검체의 DNA 양상이 동일하므로 같은 균주에 의한 감염임을 알 수 있었다.

결론적으로, 연구자는 IRS-PCR법을 이용하여 특별한 장비나 probe 없이 *V. vulnificus*의 유전형의 다양성을 확인할 수 있었다.

## 요 약

**배 경 :** 국내에서 비브리오 패혈증은 매년 하절기에 부적절하게 조리한 해산물을 섭취함으로써 발생하는 제 3군 법정전염병 중의 하나이다. 연구자는 국내에서 발생하는 *Vibrio vulnificus* 패혈증의 임상양상과 이 세균의 유전형을 연구하였다.

**방 법 :** 한양대병원에 1998년부터 2002년까지 내원한 비브리오 패혈증 환자 7명을 대상으로 임상적인 특징과 함께 분리된 균주들에 대하여 infrequent restriction site-polymerase chain reaction (IRS-PCR)에 의한 유전형 분석을 실시하였다.

**결 과 :** 환자는 모두 40대 이후였으며, 남자가 5명 여자가 2명이었다. 대부분 환자가 간경화(5명) 및 당뇨(2명)를 가지고 있었으며, 이중 4명은 알콜 중독자였다. 환자 7명 중 5명은 생선회를 먹은 기록이 있었으며, 4명은 사지의 피부에 수포를 동반한 조직괴사 현상이 있었다. 환자 중 사망한 4명은 DIC 증상을 동반하였으며, 백혈구 백분

율에서 간상 백혈구 수가 20%이상 증가하였다. 혈액에서 분리한 6주와 수포에서 분리한 2주의 *Vibrio vulnificus*를 IRS-PCR을 이용하여 유전자 분석을 한 결과 혈액에서 분리된 6주는 각기 서로 다른 유전자 형태를 나타내었으나, 수포에서 분리된 균주는 각기 혈액에서 분리된 균의 유전자 형태와 동일하였다.

**결 론 :** 국내 환자에서 분리된 *Vibrio vulnificus* 6주를 IRS-PCR로 분석한 결과 각기 서로 다른 유전형을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. 신영학, 이점규, 오경수, 유정식, 이상원, 이근영 등. 1998년 세균학적으로 확인된 *Vibrio vulnificus* 감염증 (National Surveillance of *Vibrio vulnificus* Infections in 1998). 감염 1999;31:232-6.
2. 보건복지부 국립보건원 방역과 보도자료(2002; 5월14일).
3. 정화령, 정윤섭, 이삼열, 이상인. 동남아시아 여행 중 감염된 환자에서 *Vibrio vulnificus*를 겨울철에 분리한 1예. 감염 1990;22: 109-14.
4. 도윤정, 김미향, 정윤섭, 이삼열. 임상검체에서의 *V. vulnificus* 분리 8예 보고. 대한임상병리학회지 1989;9:459-67.
5. 조지현, 양동욱, 문영희. 호남지역에 유행한 *Vibrio vulnificus*의 염색체 DNA의 제한효소 분해양상과 혈청형. 대한임상병리학회지 1995;15:240-9.
6. Warner JM and Oliver JD. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other vibrio species. Appl Environ Microbiol 1999;1:82-101.
7. 안병옥, 조지현, 문영희. *Vibrio* 균종들의 염색체 DNA의 제한효소 분해양상 분석 법. 대한임상병리학회지 1995;17:1038-47.
8. 조상원, 김수현, 신명근, 신종희, 서순팔, 양동욱. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 분석법을 이용한 *Vibrio vulnificus*의 분류. 대한임상병리학회지 1997;17:1038-47.
9. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.
10. Mazurek GH, Reddy V, Marston BM, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. J Clin Microbiol 1996;34:2236-390.
11. Choi TY and Kang JO. Application of infrequent-restriction-site amplification for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacterium. J Korean Med Sci 2002;17:593-8.

12. Katz BM. *Vibrio vulnificus* meningitis in a boy with thalassemia after eating raw oysters. *Pediatrics* 1988; 82:784-6.
13. Kelly MT and McCormick WF. *Acute bacterial myositis caused by Vibrio vulnificus*. *JAMA* 1981;246:72-3.
14. Penland RL, Boniuk M, Wilhelmus KR. *Vibrio ocular infections on the U.S. Gulf Coast*. *Cornea* 2000;19:26-9.
15. Tison DL and Kelly MT. *Vibrio vulnificus endometritis*. *J Clin Microbiol* 1984;20:185-6.
16. Strom MS, Paranjpye RN. *Epidemiology and pathogenesis of V. vulnificus*. *Microbes and infection* 2000;2:177-88.
17. 백강우, 문범, 박창환. *Vibrio vulnificus* 감염증으로 확진된 92예의 임상적 고찰. *감염* 1995;27:355-64.
18. CDC. *Vibrio vulnificus infections associated with eating raw oysters-Los Angeles, 1996*. *MMWR* 1996;45:621-4.
19. Bisharat N, Agmon V, Finkelstein R, Raz R, Ben-Dror G, Lerner L, et al. *Clinical, epidemiological, and microbiological features of Vibrio vulnificus biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel*. *Israel Vibrio Study Group. Lancet* 1999;354:1421-4.
20. Dalsgaard A, Frimodt-Moller N, Bruun B, Hoi L, Larsen JL. *Clinical manifestations and molecular epidemiology of Vibrio vulnificus infections in Denmark*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:227-32.
21. Melhus A, Holmdahl T, Tjernberg I. *First documented case of bacteremia with Vibrio vulnificus in Sweden*. *Scand J Infect Dis* 1995;27:81-2.
22. Veenstra J, Rietra PJ, Coster JM, Slaats E, Dirks-Go S. *Seasonal variations in the occurrence of Vibrio vulnificus along the Dutch coast*. *Epidemiol Infect* 1994; 112:285-90.
23. CDC. *Vibrio vulnificus infections associated with eating raw oysters-Florida 1981-1992*. *MMWR* 1993;42:405-7.
24. Kaspar CW and Tamplin ML. *Effects of temperature and salinity on the survival of Vibrio vulnificus in seawater and shellfish*. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:2425-9.
25. Tison DL, Nishibuchi M, Greenwood JD, Seidler RJ. *Vibrio vulnificus biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels*. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:640-6.
26. 김신무, 박열, 정윤섭. *Vibrio vulnificus*의 생물학적 성장과 혈청형. *대한미생물학회지* 1991;26:404-15.
27. 김상일, 유진홍, 이동건, 위성현, 최정현, 김양리 등. *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus* 균주들에서 유전자형별 분류 방법의 비교 연구: Pulsed-field Gel Electrophoresis, Amplified Fragment Length Polymorphism, 및 Infrequent Restriction Site-Polymerase Chain Reaction 방법의 비교. *감염* 1999;31:474-80.
28. 금동국, 강정옥, 최태열. Infrequent Restriction Site 중합효소연쇄반응을 이용한 *Vibrio parahaemolyticus*의 유전자형. *대한임상미생물학회지* 2002;5:119-23.
29. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. *Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of Legionella pneumophila serogroup 1 strains*. *J Clin Microbiol* 1998;36:161-7.
30. Handley SA and Regnery RL. *Differentiation of pathogenic Bartonella species by infrequent restriction site PCR*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3010-5.
31. Lucangeli C, Morabito S, Caprioli A, Achene L, Busani L, Mazzolini E, et al. *Molecular fingerprinting of strains of Yersinia ruckeri serovar O1 and Photobacterium damsela subsp. piscicida isolated in Italy*. *Vet Microbiol* 2000;76:273-81.
32. Garaizar J, Lopez-Molina N, Laconcha I, Lau Baggesen D, Rementeria A, Vivanco A, et al. *Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of Salmonella enterica serovar enteritidis*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:5273-81.
33. 유진홍, 강지민, 신완식, 김상일, 강경희, 유동호 등. *Molecular epidemiologic analysis of an outbreak of Flavobacterium odoratum by infrequent Restriction Site-Polymerase Chain Reaction: The First Report in Korea*. *대한화학요법학회지* 1997;15:313-8.