

NAG Vibrio의 檢査에 관한 小考

이 명 원
국립보건원 미생물부

Study on the Identification Methods of the Non-agglutinating Vibrio

M.W. Lee

Department of Microbiology
National Institute of Health

ABSTRACT

The genus *Vibrio* contains some of the most important intestinal pathogens of humans, including *Vibrio cholerae*, the cause of epidemic Asiatic cholera. A group of organisms which have been referred to as the non-agglutinating vibrio (NAG) do not agglutinate in the *Vibrio cholerae* O group 1 antisera, but are indistinguishable from the O-1 group both chemically and genetically. Non-O-1 *Vibrio cholerae* can cause isolated as well as focal outbreaks of diarrhea, but the volume of fluid loss does not approach that of classic cholera, and the disease is usually self-limiting. These free-living organisms are found world-widely distributed in the environment including sewage, contaminated water, estuaries, seafood and animals. These strains involved in several cases were isolated from the environment and some patients of diarrhea, and a few epidemiologic reports indicated the wide distribution of the strains throughout the country, giving an attention to the role the organisms may play in an outbreak of diarrhea in Korea. More research on the epidemiology, serologic typing and virulence of the group of organisms, should be, therefore, done to obtain a complete understanding of their role in human disease.

I. 서론

“NAG”란 “non-agglutinable” 즉 “응집하지않는”의 뜻으로 Cholera균의 0-1

Antisera에 응집하지 않는 Vibrio를 “NAG” Vibrio라고 한다. “NAG” Vibrio는 “NCV” (non-Cholera Vibrio), 혹은 “NCG” (non-choleraogenic) Vibrio 및 Wat

-er Vibrio 라고도 불리워지며 형태학적 및 생화학적으로는 Cholera 균과 구별할 수가 없다.

Cholera 균만이 Cholera 의 원인균이라는 것은 Koch 이래 누구에게도 의심받지 않고 있었으나 Cholera 라고 보이는 환자 (또는 유행) 로 부터 전형적인 Cholera 가 아닌 Vibrio 가 분리된 예는 많다. NAG Vibrio 는 주로 콜레라 유행지에서 설사 환자로 부터 단독 혹은 콜레라균 (Vibrio Cholerae 0-1) 과 같이 분리되는 경우가 많은데 Cholera 성의 설사환자에서 Cholera 균이 아닌 Vibrio 를 발견한 것은 Finkler & Rior(1884) 등의 보고가 아마 처음이고, 이후 Vibrio Cholerae 0-1 이외의 Vibrio Cholerae (NAG Vibrio) 가 원인으로된 설사증에 대하여는 Mc Intyre et al(1965)의 동파키스탄에서 콜레라 유사환자 19명에서의 분리예, Aldova et al(1968)의 체코스로바키아에서의 위장염에 대한 기록, 그리고 Zinnaka (1965) 및 Kamal(1971)의 수단에서 *V. Cholerae*, NAG에 의한 콜레라 유사증의 대유행의 보고 등이 있으며 1978년 및 1979년 일본에서 발생한 콜레라와 관련된 환자 중에는 NAG Vibrio에 의한 설사 환자가 수명 포함 되었다는 보고가 있다. 또한 유럽, 미국 등지 해안의 해저니토 중에서도 다수의 콜레라균이 분리된 보고가 있으며 동기(冬期)에도 워싱턴, 덴마크등지에서 분리 보고된 예가 있다. 이와같이 *V. Cholerae*는 이제 일부 개발 도상국 만의 전유물이 아니고 벌써 세계각지에 번져 분포하고 있다고 보아도 좋을 것이다. 또한 *V. Cholerae*가 존재하는 곳이면 어디든지 NAG Vibrio도 존재 할 수 있으며

로 *V. Cholera* 뿐만이 아니고 他種형의 *V. Cholerae*에 의한 설사증 발생의 염려는 충분히 있으므로 이후로는 설사, 장염의 세균검사에서 NAG Vibrio의 감염에도 주의를 기울일 필요가 있다고 본다.

II. 본 론

1) "NAG Vibrio"의 분류학상의 위치
"NAG Vibrio"를 분류학상 어떤 위치에 두는가에 대해서는 상당히 오래 전부터 Cholera 학자들 간에 논의되어 있었다고 생각되나 그것에 관한 공표논문은 1960년 이전에는 없었다. 다만 1935년에 Gardner & Venkatraman가 콜레라균 및 그것과 같은 H항원을 갖는 유사Vibrio를 포함하여 "Cholera group Vibrio"라고 기재 하면서 이 group을 O항원에 의해서 5종류의 O항원군으로 나누어 O군1에 Cholera균을 해당 시켰다. 이후 1967년 Sakazaki 등의 연구와 1970년 Citarella & Colwell의 연구에 의해 Cholera균과 NAG Vibrio와의 사이에는 밀접한 DNA 상동성이 있음이 밝혀졌다.

*Vibrio Cholerae*는 세 group으로 구분하여 말할 수 있는데 그 첫번째 group은 고전적인 아시아지역 유행성균으로 0-1 antisera에 응집되고 enterotoxin을 생성하는 Cholera원인균으로 여기에는 *V. Cholerae*와 Cholera의 생물학적형인 *V. El Tor*가 있다. 두번째 group은 첫번째 group과는 생화학적으로는 유사하지만 Cholera enterotoxin을 생성하지 않는 group을 말한다. 세번째 group은 O-1 antisera에 응집하지 않지만 생물학적 및 유전학적으로는 O-1 group

과 거의 구별되지 않는 group이다. 이 세번째 group은 non-agglutinating Vibrio (NAG) 또는 non-Cholera Vibrio (NCV) 라고 불리워 지기도 한다. 이들 세 group을 각 (1) *V. Cholerae* O-1, (2) atypical *V. Cholerae* O-1, (3) non-O-1 *V. Cholerae* 라고 한다.

2) NAG Vibrio의 형태학적및 생화학적 성상.

NAG Vibrio는 형태학적및 생화학적으로 Cholera균과 거의 구별할 수 없다. 다만 Mannose는 모든 Cholerae균이 이것을 발효하나 소위 NAG Vibrio의 발효성은균주에 따라 다르다. Vibrio Cholerae와 NAG Vibrio의 생화학적 성상의 차이점은 표1과 같다.

<표1>. *Vibrio cholerae*와 NAG Vibrio의 생화학 특성 비교

생화학 실험	구 분	
	NAG vibrio	V. cholerae
반 응	표 시	표 시
Motility	+	+
Growth in KCN medium	d	d
Citrate as C source	+	+
Gluconate	d	d
Gas from glucose	-	-
Glucose	+	+
Lactose	(+)	(+)
Sucrose	+	+
Inositol	-	-
Voges-Proskauer	d	-(V)47%
ONPG	+	+
Indole	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Arginine hydrolysis	-	-

Chitin hydrolysis	d	d
Nitrates reduced	+	+
Lysine decarboxylase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+
Growth in; 0% NaCl	(+)	(+)
6% NaCl	d	-
Growth at 37°C	+	+
Growth at pH9	+	+
Swarming surface growth	-	-

(표시) + : 양성 - : 음성
 (V) : Variable
 (+) : 3~4일 이후에 양성
 d : [+ , (+) , -] 여러가지 반응

3) NAG Vibrio의 혈청학적 성상

NAG Vibrio의 혈청형별은 일본 국립예방 위생연구소에서 연구 실험한 결과 05,017, 024,034,037,064,069,080,082, 합계 10개의 혈청형으로 나누어 지고 있다.

4) NAG Vibrio의 병원성 및 역학

NAG Vibrio에 의한 설사의 증상은 대략 콜레라와 같은 기전에 의한다고 생각되며 모든 균주로 증명된 사유는 아니나 Cholerae균의 기전과 닮은 enterotoxin을 산출하는 것으로 알려졌을뿐, 사람에게 어떻게 질병을 일으키는가는 아직까지 알려지지 않았다. non O-1 *V. Cholerae*에 의한 것으로 보이는 병원성의 네가지 pattern을 살펴보면 ; (1) 어떤 model은 독성이 없다. (2) Cholera-like enterotoxin의 생성. (3) heat-stable toxin의 생성. (4) 독소 생성의 증거없이 감염된 장염. 등의 네가지 pattern이 있다. 이 group(non-O-1 *V. Cholerae*)의 epidemiology, serologic typing and Virulence에 대하여는 좀더 연구 되어야 하고 인간에게 질병

을 일으키는 이들의 범칙에 대해 좀더 복합적인 이해가 따라야겠다.

여기서 *V. Cholerae* 의 발병 기전에 대하여 간략히 알아보면; Cholera enterotoxin 또는 Cholera toxin은 분자량이 대략 84,000 dalton의 복합 분자이다. Cholera toxin은 98%의 단백질과 대략 1%의 지질 1%의 탄수화물로 되어있다. Cholera toxin은 두개의 주요 subunit로 구성 되는데 subunit A는 biologic activity에 관여하고 Subunit B는 cell membrane에 결합 하는데 관여한다. 또 Subunit A는 하나의 single disulfide bond에 의해 결합된 두개의 다른 Peptide로 구성된다. A₁(mol wt 23,000)은 toxic activity에 관여하고 A₂(mol wt 5,000)는 Subunit B에의 결합에 관여한다. Subunit B는 5개의 똑같은 Peptide로 구성되어 있는데 각각의 molecular weight가 11,500 dalton이다. 이 Subunit B는 small intestine에서 GM-1-monosialoganglioside molecules에 결합 한다. 결합 후에 Subunit A가 Subunit B로부터 분리되고, 그리고 cell membrane 속으로 들어간다. A₁ Peptide의 활성화는 disulfide bond의 환원에 의해서 일어난다. A₁ Peptide는 nicotinamide adenine diphosphate (NAD)로부터 adenylyl cyclase의 활성을 조절하는 guanosine triphosphate (GTP) binding Protein에 adenosine dinucleotide (ADP)-ribose를 전달하는 효소이다. 이 결합은 GTP "turnoff" mechanism을 억제 하고 adenylyl cyclase의 활성을 증가시켜 세포내에 Cyclic AMP (cAMP)가 증가 된다. cAMP의 증가는 소장 및 대장 내에

electrolyte의 빠른 분비를 가져 온다. 이 증가는 sodium-dependent chloride secretion의 증가와 brush border에서 sodium chloride cotransport mechanism에 의한 sodium과 chloride의 흡수가 억제되어 증가 한다. 그 결과 정상 plasma 농도의 두배의 bicarbonate와 4~8배의 potassium과 함께 isotonic fluid의 분비가 있다. Fluid loss는 1 liter per hour 정도 인것 같다. 3~4 시간 전에 maximum fluid secretion인 lag period에 도달하고 그것은 8~12 시간 정도 지속 된다. 이 fluid loss의 특성은 환자 모두에 영향을 있다.

5) 세균학적 진단

임상적인 소견만 가지고는 설사질환에 대한 여러가지 유사한 증상에 대해 판단을 내리는 것은 부정확 하며 최종적인 진단은 실험실에서 환자 및 가검물 (Specimen)로 부터 원인균을 찾아서 확인하는 일이다. *Vibrio* 균속은 해수에서 생존하는 특징이 있어 해수중에서 필연적으로 어패류에 오염되므로 의심이 되는 생선의 아가미 및 내장에서, 또 감염된 환자의 대변 및 구토물, 음료수 또는 오염 가능성물, 식품, 하수구 및 해수, 사체 등에서 균을 분리할 수 있다. 이것이 가검물의 재료가 된다. *Vibrio* 균속의 균주를 형태학적 생화학 적 성상에서 보면 대개 NaCl이 포함되어 있는 보통 한천배지에서 잘 자라며, 증균용 배지로는 Alkaline peptone water (PH8.4)를 사용하며 6~8 시간 증균 시켜 감별 선택 배지 (TCBS agar 등)에 배양한다. 이들 배지에는 대장균 및 기타 세균은 억제되어 잘 자라지 않는다. 대개 37°C에서 18~24 시간 배양 시킨후 plate 성상을 보면 moist,

smooth, circular, opaque 한 yellow colony (*V. cholerae*, NAG Vibrio) 및 green colony (*V. parahaemolyticus*) 를 형성한다. TCBS agar 에서 *V. cholerae*, NAG Vibrio 는 sucrose 를 분해 하므로 yellow colony 를 형성하고 *Vibrio parahaemolyticus* 는 sucrose 를 분해하지 않으므로 green colony 를 형성한다. 위의 분리배지에서 자란 colony 를 pick-up 하여 KIA Slant 배지에 접종한다. Vibrio 균속은 전혀 H₂S 를 생성하지 않고 배지 밑 (butt) 에서는 산 (acid) 을 생성하나 개스 (gas) 생성은 전혀 없다. (K/A, H₂S⁻, Gas⁻). Vibrio 균속은 운동성이 있으며 Gram negative bacilli로서 단간형이며 다(多) 형태성 이다. 단재성 F1-agella 로 운동성이 활발함을 볼 수 있으며 통

성 혐기성이다. (표 2 참조).

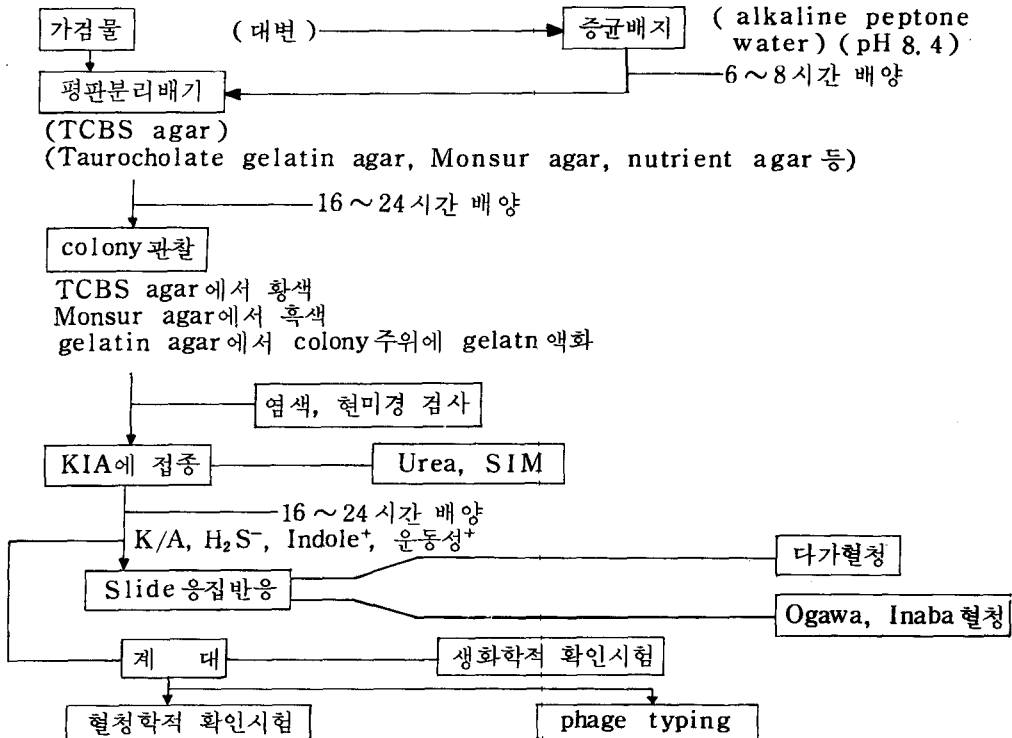
생화학적 성상 및 탄수화물 분해 여부는 표 3 과 같고, 이상과 같은 특징의 생화학 특성과 진단용 혈청과 반응하여 최종 진단을 내린다. 분리 과정 및 생화학적 시험은 Vibrio 균속과 거의 실험이 같으나 혈청학적 실험은

Vibrio cholerae 는 Cholera antiserum poly, Inaba, Ogawa 에 응집을 걸어보면 Inaba 형인지 Ogawa 형인지 구분이 된다. NAG Vibrio 는 Antiserum 에 응집이 전혀 안된다.

Vibrio parahaemolyticus 는 최종 검사로써 혈청학적 검사를 실시한다. 표 4 와 같은 Vibrio parahaemolyticus 균에 대한 K 항원 진단용 항혈청 (Antiserum) 으로 슬라이드응집 반응 시험을 한다.

<표 2> .

콜레라균 검사과정



〈표 3〉. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*,
Vibrio vulnificus 의 생화학 특성 차이점

생화학 특성	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>		<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. vulnificus</i>	
	표시	양성 %	표시	양성 %	표시	양성 %	표시	양성 %
H ₂ S	-	0	-	0	-	0	-	0
Indole	+	99	+	100	V	90	+	97(3)
Methyl red			+	(95)	V	19		
Voges-Proskauer	-	0	V	47	+	93	-	0
Simmons' citrate	+	100	V	(74)	V	66	V	76(11)
Urease	-	0	-	0	-	4	-	0
Motility	+	100	+	97	+	100	+	97
Gelatinase	+	100	+	96	+	94	+	97
Lysine	+	97	+	100	+	100	+	100
Arginine	-	0	-	0	-	0	-	0
Ornithine	+	96	+	99	V	57	V	66(26)
Malonate	-	0	V					
Glucose, acid	+	100	+	100	+	100	+	100
Glucose, gas	-	0	-	0	-	0	-	0
Lactose	-	0	+	(99)	-	0	+	81(16)
Sucrose	-	1	+	100	+	100	-	3
Mannitol	+	100	+	100	+	100	V	66
Dulcitol	-	0	-	0				
Salicin	-	0	-	0			+	100
Adonitol	-	0	-	0				
Inositol	-	0	-	0				
Sorbitol	-	5	V	64				
Arabinose	V	81	-					
Rhamnose	-	0	-	0				
Maltose	+	100	+	100	+	100	+	100
Xylose	-	0	-	6				
Cellobiose	V	54	V	38			+	100
Mannose	+	100	+	100			+	100
Oxidase	+	100	+	100	+	100	+	100
Catalase	+	100	+	100	+	97		
Oxidation-Fermentation	F	100	F	100			F	100
Nitrate to nitrite	+	100	+	100	+	100	+	100
Growth in: 0% NaCl	-	0	+	100	-	0	-	0
3% NaCl			+	100				
6% NaCl					+	100	+	100
3-7% NaCl	+	100			+	100		
8% NaCl	+	99	-	0	+	100	-	8
10% NaCl	-	0	-	0	+	100	-	0

+ : 양성, - : 음성, V : 여러가지 반응 () : 24시간 이후 양성반응

〈표 4〉. *Vibrio parahaemolyticus* 균의 9 가지 다가 K 항 혈청의 구성

K 다가 항혈청 (K pooled antiserum)	K 단일 항혈청 (K monovalent antiserum)
I	1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8
II	9. 10. 11. 12. 13. 15. 17
III	18. 19. 20. 21. 22. 23. 24
IV	25. 26. 28. 29. 30. 31. 32
V	33. 34. 36. 37. 38. 39. 40
VI	41. 42. 43. 44. 45. 46. 47
VII	48. 49. 50. 51. 52. 53. 54
VIII	55. 56. 57. 58. 59. 60. 61
IX	63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71

Ⅲ. 결 론

가. 소위 “NAG” *Vibrio* 라는 말은 불명확한 표현이고 분류학적인 입장에서 그 성격을 확실히 할 필요가 있다.

나. “NAG” *Vibrio* 는 생화학적으로도 혈청학적으로도 많은 형으로 갈라져 있는 것이 명확하나, 혈청학적 성상을 제외하면 콜레라균과 거의 구별되지 않는 것이 있다.

다. 과거에 있어서의 소위 “NAG” *Vibrio* 의 병원성에 대한 보고중에는 명확하게 *Vibrio* 이외의 균으로 보고 있는 경우가 있으나 *Vibrio* 라는 것을 부정할 수 없다.

라. 명확하게 *Vibrio* 라는 균에 의하여 설사가 일어나는 예도 있고 콜레라균에 의하여도 장염비브리오도 아닌 병원성의 비브리오가 있는 것은 명확하다. 그러나 이러한 병원성의 *Vibrio* 에 까지 [Cholera]의 정의를 확장할 것인가에 대하여는 콜레라의 설사의 본태와 그것을 일으키는 인자가 확실히 될 때까지 결론을 내릴 수는 없다.

참 고 문 헌

1. Joo-Won, Lee. M. D. NAG. *Vibrio* (non-agglutinable)에 대한 논문집. p 3 ~ 80. 114, 보건사회부 발행, Seoul, Korea. 1982.
2. Lennette, Balows, Hausler, Shadomy: Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition. p 282 ~ 295. American society for Microbiology, Washington. D. C. 1985.
3. 金慶浩외 18人: 병원미생물검사 기준, p 143 ~ 159. 국립 보건원. 1985.
4. Joklik, Willett, Amos: Zinsser Microbiology, Eighteenth Edition. p 623 ~ 630. Appleton-Century-Crofts, Norwalk, Connecticut.
5. 孫準鏞외: 장염 *Vibrio* 및 NAG *Vibrio* 분포에 관한 연구, 국립 보건원보 Vol 20, p 45 ~ 59, 1983.