

최근 경북지역 설사환자 검체에서 분리된 *Vibrio cholerae* O1의 분자생물학적 특성

이상조 · 이복권¹ · 이건주² · 이희무²

경북 보건환경연구원 미생물과, 국립보건원 세균질환부 장내세균과¹, 안동대학교 생물학과²

Molecular Biological Characteristics of *Vibrio cholerae* O1 Isolated from Diarrheal patients in the Gyeongbuk province. Lee, Sang-Jo, Bok-Kwon Lee¹, Kon-Joo Lee, and Hee-Moo Lee². Gyeong Sang Buk-Do, Institute of Health and Environment, 1449-1, Sankyuk-Dong, Buk-Gu, Daegu 702-702, Korea, ¹Department of Microbiology, National Institute of Health, Seoul, Korea, ²Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea - This study was carried out to investigate the cause of cholera outbreak in Gyeongbuk province in 2001. 90 strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor serotype Inaba were isolated from diarrheal patients. By multiplex-PCR, all of the isolated strains revealed positive for detection *ctxA*, *hlyA* and *tcpA* genes. There were DNA sequence difference of the cholera-toxin subunit A gene and subunit B gene between isolated *V. cholerae* O1 and the strain of GenBank. In analysis of PFGE patterns, all of the isolated strains were showed the same DNA fragments. We also collected plankton samples in the east coast of Gyeongbuk to isolate *V. cholerae* O1 and *V. cholerae* O139 from August to October 2002. The samples were examined to detect the *rfb* gene and cholera-toxin gene by multiplex-PCR. The cholera-toxin gene was detected and then we tried to isolate *V. cholerae* O1 and *V. cholerae* O139, but they were not isolated.

Key words: *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio*, Cholera, PCR

Vibrio cholerae O1은 장관계에 감염되어 발병되는 급성 설사질환인 콜레라의 원인이 되는 세균성 병원체로서 제1군 법정전염병인 동시에 국제 검역 전염병이다. 그람음성 간균으로서 단 편모를 갖고 있어 활발한 운동성을 보이는 것이 특징이다[1, 2]. 이 균에 감염될 경우 몇 차례 설사를 하는 정도의 경증 환자에서부터 설사를 시작하지 한시간 이내에 쇼크를 동반하는 중증 환자까지 발생하는 급성 세균성 소화기계 질환이다. 잠복기는 대개는 12~48시간이지만 길게는 수 시간에서 5일까지 이른다. 설사 초기에는 복통을 느끼지 못하며 쌀뜨물과 같은 설사를 보이는 것이 특징으로서, 이와 같이 강한 설사를 일으켜 순환장애, 정상이하 체온, 무뇨증으로 이어지며 심한 탈수증이 발생하여 적절한 치료가 요구된다[3-6].

우리나라의 콜레라 유행에서 1960년대 이후부터는 환자 발생 수 및 사망자 수는 물론 치명율도 급속히 감소하고 있다. 유행초기에는 집단 식중독 양식으로 폭발적인 발생을 보이다가 유행말기로 가면서 산발적인 발생을 보이며 교통의 발달과 더불어 전국적인 전파가 빨라지고 있다. 더욱 El Tor형의 *V. cholerae* O1은 전염력이 강하지만 병원력이 비교적 약하여 불현성 감염을 보이는 경우가 많다[7, 8]. 1963년 부산을 통해 El Tor 콜레라가 유행하여 414 명의 환자가 발생

하여 36 명이 사망한 이래[9], 1964년 인천, 1969년 8월 26일부터 전북 군산항에서 발생하여 59일 동안 대유행하여 전국적으로 확산하여 1,586 명의 환자가 발생하여 137 명이 사망하였다. 1970년 경남 마산, 1980년 전남 신안[10], 1991년 충남 서천에서 유행하였고[11], 최근 들어 1995년 경북 포항, 2001년 경북 영천지방을 중심으로 30일 동안 142 명의 환자가 발생하였으나 다행히 사망자 수는 없었다[12]. 이들 중 몇 예를 제외하고는 바다와 인접해 있는 지역 또는 항구도시에서 발생하였다. 발생원인은 1991년 전까지는 외국으로부터 균이 유입되었을 가능성에 대한 설명이 많았으나, 1991년 이후 콜레라 발생원인은 자연 환경계에서 *V. cholerae* 균이 살고 있으며[13], 국내에서도 자연환경에서의 생존에 대해 보고되고 있다[14].

콜레라균의 자연 환경에서의 생존에 대해서는 Huq 등[15]은 copepods에 부착 및 생존에 대해 언급하였고, Huq 등[16] 및 Tamplin 등[17]은 1964년~1980년의 자료에서 방글라데시의 경우 콜레라 유행이 9~11월 사이이며, copepods의 산란 시점이 8~9 월로서 콜레라 유행직전에 이러한 자연현상들은 콜레라의 생존과 전파에 copepods가 일정한 역할을 하는 것이라는 가설을 뒷받침하고 있다. Garay 등[18], Ogg 등[19], Tamplin 등[17]은 수계에 *V. cholerae* O1이 널리 존재하며, 동절기 등 불리한 환경에 직면할 경우 15~300배 정도로 수축되며, 대사율을 저하시켜 pH, 온도, 염도, 영양부족에 견딜 수 있도록 휴지상태로 존재하거나, *Acartia tonsa*

*Corresponding author

Tel: 82-53-602-5321, Fax: 82-53-956-9094

E-mail: micro003@hanmail.net

나 *Gerris spinolae* 같은 Crustacean copepods(요각류) 등에 부착하여 살 수 있고[20-22], 월동하여 수온이 상승되는 하절기에 증식하여 콜레라를 유발할 가능성이 있다고 보고하였다. 이는 *V. cholerae* O1이 기수를 중심으로 자연 환경에 존재시에는 해양환경 변화에 따라 환경조건이 향상되면, 이들의 밀도가 증가하여 어패류 등 오염경로를 따라 인체에 감염에 대해 보고하였다[23-25].

따라서 본 연구는 경북지역 설사환자에서 분리된 *V. cholerae* O1을 대상으로 *ctxA*, *tcpA*, *hlyA* gene에 대한 multiplex-PCR시험으로 검색하였으며, 콜레라를 일으키는 주원인인 콜레라 독소를 생산하는 *ctxA* 및 *ctxB* 유전자의 염기서열 분석을 통한 균주간의 유형의 차이를 확인하였으며, PFGE typing을 수행하였다. 또한, 환경가검물 중 콜레라균 서식가능성을 규명하기 위해 경북 동해안 일대에서 플랑크톤을 채취하여 *V. cholerae* O1 및 *V. cholerae* O139의 *rfb* 및 CT gene를 이용하여 균 분리를 시도하여 콜레라 예방대책 수립에 기여코져 하였다.

재료 및 방법

시험 균주

2001년 경북지역 콜레라 유행 때 관내 보건망을 통하여 수집된 설사환자로부터 분리·동정된 *V. cholerae* O1을 대상으로 하였으며, 대조로서는 *V. cholerae* ATCC 14033, *V. cholerae* ATCC 9458, *V. cholerae* O139(KNIH) 등을 사용하였다.

Multiplex-PCR에 의한 *ctxA*, *tcpA*, *hlyA* gene 검색

분리된 *V. cholerae* O1에 대한 *ctxA*, *hlyA* gene 및 TCP protein을 표적으로 하는 *tcpA* gene 등을 multiplex-PCR로 시험하였으며, 이때 사용한 primer는 Table 3에 나타내었다. 시험균의 DNA는 TSA에 12시간 배양한 배양액을 원심분리(9000×g 10 min.)하고 균체를 약 10⁹(595 nm에서 O.D 0.6/ml)되게 현탁하여, 95°C에서 10분간 가열한 추출액을 원심분리하여 template DNA로 시험에 사용하였다.

PCR 반응은 10×PCR buffer용액 10 µl, dNTP mixture (2.5 mM each) 8 µl, 2.5 U *Taq* DNA Polymerase 0.5 µl, primer pair 각 1.0 µl(20 pmol/µl, Table 1), template DNA 5 µl를 넣어 D.D.W.로 최종용량을 50 µl로 조정하였다. PCR system-2700(Applied Biosystems Co. USA)을 이용하여 반응조건은 95°C에서 5분 예비 가열한 후 94°C에서 1분 denaturation, 55°C에서 1분 annealing, 72°C에서 1분씩 extension으로 35 cycles로 증폭시켰다. 각각의 유전자 검출을 위하여 5 µl의 증폭산물과 molecular weight marker (100 bp ladder, Bioneer Co.)를 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide 용액으로 염색하여 위치를 확인하였다.

Table 1. Synthetic oligonucleotides used in this study

Target gene	DNA sequence of primer (5'- 3')	Amplicon size (bps)
<i>ctxA</i>	F: ACT CAG ACG GGA TTT GTT AGG CAC	302
	R: TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG	
<i>tcpA</i>	F: GAA GAA GTT TGT AAA AGA AGA ACA	471
	R: GAA AGC ACC TTC TTT CAC GTT GAT	
<i>hlyA</i> *	F: AAC GCG TTT TGG TTG ATT TC	223
	R: AAA CCA GAG CGC GCT AAT AA	

*: product =hemolysin

플랑크톤 채취 및 콜레라 독소유전자 확인시험

콜레라균의 자연 환경에서의 서식가능성을 규명하기 위하여 2002년 해수온도가 높은 8 월에서 10월 사이에 플랑크톤 채취는 동해안 일대 3개 지점에서 수심 2 m에서 표층까지 0.5~1 m/sec 속도로 배를 이동하면서 직선으로 끌어 이 기간 동안 시료 14 건을 채집하였다. 채취한 플랑크톤은 φ200 µm 망체로 여과하여 멸균생리식염수로 가볍게 수세하고 5 ml정도 농축하여 tissue grinder로 균질화 시킨 후 2×APW에 접종하여 6~8시간 증균하였으며, 증균시킨 APW에서 1 ml를 채취하여 tube에 넣고 원심분리(14,000 rpm, 1분)하여 균을 수거하고, 수거된 균을 멸균증류수 1 ml로 현탁한 후 원심분리하고, 다시 멸균증류수에 재현탁하였다. 균 현탁액을 10 분간 끓인 후 원심분리(14,000 rpm, 1분)하여 그 상층액을 PCR 반응용 template DNA로 시험에 사용하여 cholera toxin(CT) gene 및 혈청형 확인시험을 하였다. 한편, APW 증균액을 10¹~10⁶ 계단 희석하여, TCBS 배지에서 35°C, 18~24시간 배양하였다.

CT gene 및 혈청형 확인시험에 사용한 primer는 해양환경에서 분리되는 *V. cholerae* O1 및 O139에 대한 CT 음성 균 모두를 확인할 수 있도록 특이적 다당체를 암호화하는 *rfb* gene과 CT gene를 표적으로 하는 primer를 Table 2에서 보는바와 같이 제작하여 사용하였다. *rfb* 및 *ctxA* gene band가 확인 될 경우에는 이와 별도로 동시에 배양된 TCBS 배지의 전형적인 콜레라균 집락을 무작위로 선별하여 TSA 평판배지에 이식하여 다시 35°C, 18~24시간 배양하여 콜레라

Table 2. Synthetic oligonucleotides used as primer in *rfb* and *ctxA* gene detection

Target gene	5'→3'DNA sequence of primer	Amplicon size(bps)
<i>rfb</i>	F: GTT TCA CTG AAC AGA TGG G	192
	R: GGT CTA CTG TAA GTA CAA C	
<i>rfb</i>	F: AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG	450
	R: GCT AAA CCC GAT CGT AAA GG	
<i>ctxA</i>	F: ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC	308
	R: ATA CCA TCC ATA TAT TTG GGA G	

혈청으로 응집시험을 실시하였으며[26], DNA 추출 및 PCR 반응조건은 앞에서와 동일한 방법으로 수행하였다.

CtxA, *ctxB*, *hlyA* gene 염기서열 분석

V. cholerae O1의 유전자 염기서열 결정은 CT 생성을 암호화하는 것으로 알려진 *ctx* gene의 subunit A 및 B 부분의 single band가 확인된 PCR 증폭산물을 Qiaex PCR purification kit(QIAGEN Hilden Germany)를 이용하여 분리하고 이를 template로 하여 direct sequencing을 시행하였다.

사용한 primer는 Table 3을 기초하여 합성하였으며, DNA sequencing은 유전자 염기서열 자동분석(ABI 3100 DNA analyzer system, Perkin-Elmer USA)을 채택하여 시행하였으며, 유전자 염기서열 분석을 위한 PCR 반응조건은 96°C에서 5분 예비 가열한 후 96°C에서 20초 denaturation, 58°C에서 40초 annealing, 72°C에서 1분씩 extension을 35 cycles을 반복하여 실시하였다. 본 실험에서 읽은 CT 유전자 subunit A, B부분과 상동성 검사는 NCBI GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 의해 실행하였다[27-32].

Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) 실험

PFGE 실험은 Gautam[33]의 방법을 다소 변형하여 실시하였다. 시험균주를 TSA 배지에 접종, 35°C, 18~24시간 배양한 후 1.5 ml의 cell suspension TE buffer(100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 균을 현탁하여 BioMerieux vitek colorimeter 15%의 투광도로 균 농도를 조절하였다. 현탁액 200 µl를 10 µl의 proteinase K(20 mg/ml stock)와 준비된 1.2% seakem gold agarose(FMC Bio productions, USA) 200 µl와 섞어 plug mold에 분주하여 굳혔다. 굳은 plug mold를 1.5 ml의 ES buffer(0.5 M EDTA, pH 9.0, 1% sodium-lauroylsarcosine)와 40 µl의 proteinase K 혼합액에 넣어 55°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 전 과정은 55°C의 온도로 진탕 항온수조에서 행하였다. 반응이 끝난 plug mold를 증류수에 넣어 55°C에서 15 분간 세척한 후 plug wash TE buffer(100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)로 교체하여 다시 55°C에서 plug를 4회 세척하였다. 세척한 plug mold는 바로 사용하거나, 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

세척이 끝난 plug을 1 mm 두께로 절단한 후 1.5 ml E-

tube에 옮겨 100 µl의 반응혼합액(10×restriction enzyme buffer 10 µl, 0.1% BSA 10 µl, NotI 30 unit, 멸균증류수로 최종부피까지 채움)을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응후 바로 반응액을 제거하고 plug wash TE buffer로 교체한 다음, PFGE를 실시하거나 4°C에 보관하였다. Enzyme 처리가 끝난 plug는 gel comb에 올려놓고 물기를 제거한 다음 틀에 넣고 여기에 1.0% seakem gold agarose를 부어 굳혔다. 이때 agarose solution을 조금 남겨서 굳지 않도록 보관하였다. gel이 굳으면 comb를 제거하고 comb의 제거로 생긴 빈 well에 보관하고 있던 남은 agarose solution을 넣어 매꾸었다. 이렇게 만들어진 gel을 CHEF DR[®] III System(BIO RAD Co. USA)을 이용하여 0.5x TBE, 6 V/cm, 14°C, 1.0~40.2 sec switch time 의 조건으로 18시간 동안 전기영동을 하였다.

결과 및 고찰

Multiplex-PCR에 의한 *ctxA*, *tcpA*, *hlyA* gene 검색

2001년 경북지역의 콜레라 유행에서 분리된 CT를 code 하는 유전자 검색에서는 시험군 모두에서 *ctxA* gene을 확인할 수 있었다. 대조인 *V. cholerae* ATCC14033, *V. cholerae* ATCC9458, *V. cholerae* O139에서도 302 bps의 band를 형성하였다.

확인하는 방법에는 과거에는 면역학적 방법이 많이 사용되었으나, 최근에는 CT 유전자를 대상으로 하는 PCR 방법이 사용되고 있다[34, 35]. Albert 등[36]은 대변 검체 또는 분리균에서 콜레라균의 *ctxA* 혹은 *ctxB*를 탐색하기 위해 primer를 제작하여 빠른 방법으로 콜레라균을 진단하였다.

본 실험에서는 Shirai 등[37]의 방법을 다소 변형하여, CT 유전자를 보유한 *V. cholerae*균을 대상으로 multiplex-PCR을 실시하여 효과적인 결과를 얻었다(Fig. 1).

또한, TCP protein를 code하는 유전자 중에서 *tcpA* gene

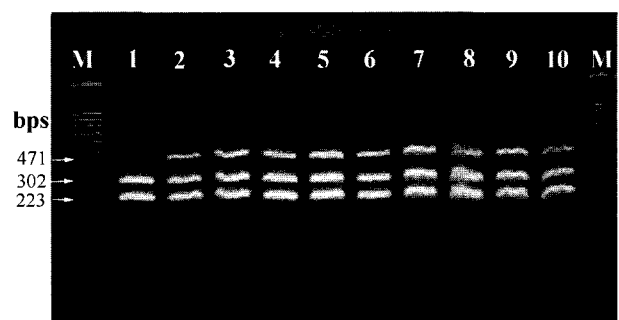


Fig. 1. Multiplex-PCR assay detects the *ctxA*, *hlyA* and *tcpA* gene of *Vibrio cholerae* O1 isolated from diarrheal patients in Gyeongbuk province. Product size(bps): 223, *hlyA*; 302, *ctxA*; 471, *tcpA* gene. Lane M, Molecular weight ladder; lane 1, *V. cholerae* ATCC 9458; lane 2, *V. cholerae* O139; lane 3 to 10, *V. cholerae* O1 isolated.

Table 3. Synthetic oligonucleotides used as *ctxA* and *ctxB* gene primer in PCR or sequencing.

Target gene	Primer sequence (5'- 3')	positions
<i>ctxA</i>	F: GTT TTG ATC AAT TAT TTT TCT G	474-495
	R: GAG GTG TTC CAT GTG CAT ATG	1338-1358
<i>ctxB</i>	F: GGT TGC TTC TCA TCA TCG AAC CA	1147-1170
	R: AAA CCA GAG CGC GCT AAT AA	1719-1697

검출에서는 *V. cholerae* O1의 Inaba 형 및 *V. cholerae* O139에서는 증폭산물이 검출되었으나, 대조인 *V. cholerae* O1 Ogawa 형에서는 *tcpA* gene 부분 염기서열 차이로 DNA band를 확인할 수 없었으며, hemolysin을 code하는 *hlyA* gene 검출에서도 시험균 모두에서 band를 확인할 수 있었다. Keasler 등[43]은 이러한 DNA 염기서열의 차이를 이용해서 *V. cholerae* O1의 생물형을 구분할 수 있다고 보고하였다. 한편, Hemolysin 유전자는 초기에 Honda 등[44]에 의해 정제되어 다양한 적혈구와 포유류의 배양세포 병변에 대한 보고와 Ichinose 등[45], Spira 등[46]은 세포독성 및 토끼 회장루프 세포병변에 관해 보고하였다.

콜레라 독소유전자 및 혈청형 확인시험

동해안 일대에서의 콜레라균 서식가능성을 규명하기 위하여 플랑크톤 시료 채취는 콜레라 유행이 발생된 이듬해인 2002년 수온이 높아지는 8 월에서 10월 사이에 포항 연안의 3개 지점에서 6회에 걸쳐서 실시한 결과 Table 4와 같았다.

본 실험은 이 등(1999) 및 국립보건원(2002) 해양환경 콜레라 감시 방법에 의거하여 시험하였으며, 이는 *V. cholerae* O1 및 *V. cholerae* O139에 대한 CT 양성균과 음성균 모두를 확인할 수 있도록 특이적 다당체를 암호화하는 *rfb* gene과 CT를 code 하는 *ctxA* gene을 표적으로 multiple-PCR시험 결과로서 조사지점 14 건에 대한 시험에서 2건에서 *ctxA* gene의 band는 확인되었으나, *rfb* gene의 band는 검출되지 않았고, 배양검사에서도 *V. cholerae* O1 및 *V. cholerae* O139는 분리되지 않았다.

한편, 1995년 9월 인천 강화지역 해수에서 Ogawa 형의 콜레라 독소 생성균을 분리된 이래, 1997년 9월 광주에서

Inaba형의 독소 생성균을 1998년 7, 8월 순천 및 강화에서 Hikojima, Ogawa 형의 독소 음성균을 각각 분리하였고, 1999년 전북 김제에서 2000년 9월 충남 아산에서 계속 균 이 분리되었고, 2001년 9월 울산 울주의 하수에서 Inaba 형의 독소 생성균을 그리고 경북 포항 어시장의 꼬막에서 Ogawa 형의 독소 음성균을 경남 통영의 해수에서 Inaba 형의 독소 생성균이 분리되고 있어, 콜레라 발생 원인이 환경 병원소에 대한 관련성이 점점 높아지고 있다[26, 47, 48]. Blake 등[49], Rogers 등[50], Motes 등[51]은 환경 병원소의 존재를 부각시키는 역할을 하였다. *V. cholerae* O1 균이 방글라데시, 유럽 및 호주 동북쪽 멀리 떨어진 강에서 그리고 미국 걸프만을 따라 염분이 있는 습지에서 분리되며, 1980년 들어 *V. cholerae* O1 균은 염분이 있는 물에 잘 적응하는 것으로 알려져 있어 갯벌이나 큰 강 어귀에서 상존하는 정상 균주일 가능성이 높다는 것이다. 순수하게 균을 배양하는 경우는 콜레라균은 0.25~3%의 염분 농도를 유지하고 pH 8.0을 유지하여 주면 영양분이 없어도 장기간 생존하는 것으로 알려져 있으며, 적당한 영양소가 있으면 급속한 성장을 하는 것으로 알려져 있다. Miller 등[22]은 수중에서 콜레라가 도착한 지역에서 유행을 계속 유지시키는 기전일 수 있다는 가설을 제시하였다[20-22]. 환경 병원소로서 해수온도(sea surface water temperature)의 상승으로 영양물질이 풍부한 copepods의 수적인 증가로 콜레라균의 숙주 환경의 조성으로 설명되며[15-19], Diseases in Man에는 좀더 구체적으로 환경 병원소가 동물성 플랑크톤과 관련되어 있다는 것을 보고하였다[52].

콜레라 독소를 code 하는 유전자 중에서 *ctxA* gene 염기서열은 Fig. 2와 같이 결정되었으며, GenBank에 수록되어 있는 Li 등[27]의 *V. cholerae* strain 203-93과 분리균의 염기서열 비교 분석에서 100% homology를 보였다. 그러나 Yamamoto 등[28]의 *V. cholerae* O139(strain 854) 및 Dams 등[29]의 *V. cholerae* El Tor(strain 2125), Rui 등[30], Heidelberg 등[31]의 분리균과는 137번 adenine(A) 위치에 guanine(G)으로 염기서열 비교 분석에서 차이가 있었다(Fig. 2). 또한, Shin 등[32]의 *V. cholerae* KNIH002의 비교 분석에서는 156번 T 위치에 A, 327번 A위치에 C의 두 곳에 유형의 차이를 보였다.

분리균의 *ctxB* gene를 PCR 증폭시킨 결과 모두 572 bps의 반응산물을 확인하고, 증폭된 유전자를 분리 정제하여 유전자 염기서열 자동분석기로 분석하여 375 bps의 *ctxB* gene의 염기서열을 분석한 결과는 Fig. 3과 같았다. 읽은 부위의 염기서열 정보는 nucleotide 115 위치에 C, 138 위치에 T, 203 위치에 C로서 Olsvik 등(1993)이 분석한 *ctxB* gene의 염기서열과의 비교 분석에서 classical worldwide 및 El Tor, U. S. gulf coast와 동일한 genotype 1의 pattern을 보였다. *V. cholerae* O1의 CT gene의 염기서열이 밝혀지면서 *ctxB* gene의 염기서열 중 115번, 138번, 203번 염기가 일부

Table 4. Detection of *V. cholerae* O1 in Environmental samples collected from Pohang area from August to October 2002.

Year & Month	Sample	Site	Genes as determined by PCR		
			<i>rfb</i>		<i>ctxA</i>
			O1	O139	
2002. 8.	Plankton	Pohang No.1	-	-	-
		Pohang No.2	-	-	-
		Pohang No.3	-	-	+
		Pohang No.4	-	-	-
2002. 9.		Pohang No.5	-	-	-
		Pohang No.6	-	-	+
		Pohang No.7	-	-	-
		Pohang No.8	-	-	-
		Pohang No.9	-	-	-
2002. 10.		Pohang No.10	-	-	-
		Pohang No.11	-	-	-
		Pohang No.12	-	-	-
		Pohang No.13	-	-	-
		Pohang No.14	-	-	-

```
O139-bengal* ATGGTAAAGA TAATATTTGT GTTTTTTATT TTCTTATCAT CATTTCATA TGCAAATGAT GATAAGTTAT ATCGGCAGA 80
KNIH002** .....
Isolated*** .....

TTCTAGACCT CCTGATGAAA TAAAGCAGTC AGGTGGTCCT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC 160
.....A.....
.....A.....T.....

AAATGAATAT CAAOCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACTCA GAOCGGATTG GTTAGGCACG ATGATGGATA TGTTCOCACC 240
.....

TCAATTAGIT TGAGAAGTGC CCACCTTAGTG GGTCAAATA TATTGCTGG TCATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC 320
.....

CACTGCACCC AACATGTTA ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATACAGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCTGCCT 400
.....C.....
.....A.....

TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTTATTTC GGGTGCCTTG ATGAACAATT ACATCGTAAT 480
.....

AGCGCCTACA GAGATAGATA TTACAGTAAC TTAGATATTG CTCACGACC AGATGGITAT GGATTGCGAG GTTTCOCACC 560
.....

GGAGCATAGA GCTTGGAGGG AAGACCCGTG GATTCATCAT GACCCCGCGG GTTGTGGGAA TGCTCAAGA TCATCATGTA 640
.....

GTAATACTTG CGATGAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAG ATTCCTTAC GAATACCAAT CTAAGTTAA AAGACAATA 720
.....

TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA TTAAGGATGA ATTATGA 800
.....
.....
```

O139-bengal*: Yamamoto et al. (1994) of *V. cholerae* O139 (strain 854)
 KNIH002** : Shin et al. (1999) of *V. cholerae* KNIH002.
 Isolated*** : Isolated from diarrheal patients in Gyeongbuk province.

Fig. 2. DNA sequence of *V. cholerae* *ctxA* operon nucleotides (777 bps).

```
Genotype1 ATGATTAAT TAAAATTTGG TGTTTTTTTT ACAGTTTAC TATCTTCAGC ATATGCACAT GGAACCTC AAAATATTAC 80
Genotype2 .....
Genotype3 .....
Isolated* .....

TGATTTGTG GCAGAATCAC ACAACACACA AATA C ATAG CTAAATGATA AGATATT T TC GTATACAGAA TCCTAGCTG 160
***** C ..... G .....
***** T .....
***** C ..... T .....

GAAAAGAGA GATGGCTATC ATTACTTTTTA AGAATGGTGC AA C TTTTCAA GTAGAAGTAC CAAGTAGTCA ACATATAGAT 240
***** C *****
***** T *****
***** C *****

TCACAAAAA AAGCGATTGA AAGGATGAAG GATACCTGA GGATTGCATA TCTTACTGAA GCTAAGTGC AAAAGTTATG 320
.....

TGATGGAAT AATAAAAAGC CTCATGOGAT TGCCGCAATT AGTATGGCAA ATTA 375
.....
.....
.....

Nucleotide at position 115 138 203
Genotype1 Classical worldwide C T C
El Tor, U. S. Gulf coast
Genotype2 El Tor, Australia C G C
Genotype3 El Tor, seventh pandemic T T T
El Tor Latin american epidemic
```

Fig. 3. DNA sequence of the *V. cholerae* O1 toxin operon (*ctxB* gene) from diarrheal patients in Gyeongbuk province. *: Isolated from diarrheal patients in Gyeongbuk province.

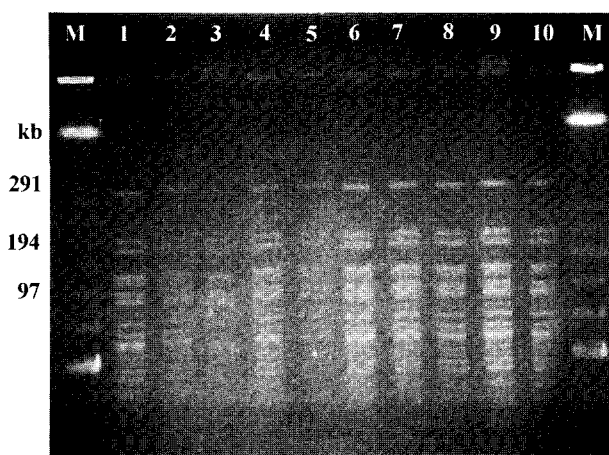


Fig. 4. PFGE banding patterns of *V. cholerae* O1, lane M DNA size std.. 1 to 10, Isolated from diarrheal patients specimens in Gyeongbuk province.

classical 및 El Tor 형의 두 생물형 사이에서 서로 다르다는 것이 밝혀졌다(Takao 등, 1985). 그 후 Olsvik 등(1993)은 최근 70 년에 걸쳐 전세계에 유행된 콜레라균에 대한 *ctxB* gene에 대한 염기서열을 분석하여 El Tor 사이에서도 위의 세 위치에 변이가 있음을 확인하여 3가지 유전형으로 분류하였다. 1817년 이후 현재까지 전세계적으로 7번째 대유행은 *V. cholerae* O1 El Tor와 O139에 의해 진행되고 있고, 우리나라도 노출되어 있는 상태에 있으므로 이의 확인 결과에서 이(2000)의 보고에서와 같이 1991년 이후 해외 유입 또는 국내에서 발생되었던 균주와 *ctxB* 유전자 염기서열 배열이 동일하였다.

PFGE 실험

PFGE 실험에서 분리균에 대한 시험에서 Not I으로 절단하여 PFGE pattern을 분석한 결과에서 모두 동일한 type으로 나타났다(Fig. 4). 2001년 콜레라 유행에서 경북지역 분리균에 대한 감염경로 및 감염원 규명에서 79건은 오염경로가 동일한 것으로 조사되었으나, 11건은 이와 직접적인 관련성이 없었으나(양 등, 2001; 임 등, 2002), 이들 분리균에 대한 PFGE 실험 결과에서 동일한 유형의 pattern을 확인 할 수 있었다. 결론적으로 이들 분리균에 대한 분자역학적 분석자료를 토대로 감염원, 감염경로를 규명하고 이들 유행의 근절을 유도하는데 있어 필수적인 도구로서 PFGE typing법을 활용하여 효율적인 방역대책 수립은 매우 중요하리라 생각된다.

요 약

2001년 경북지역 콜레라 유행시 설사환자에서 *V. cholerae* O1 El Tor형 90주를 분리하였다. 분리균을 대상으로 *ctxA*, *tcpA*, *hlyA* gene에 대한 multiplex-PCR 시험에서는 분리균

모두에서 302, 223, 471 bps 크기의 DNA 증폭산물 band를 확인하였다. *ctxA* 및 *ctxB* gene 부위의 유전자 염기서열 비교에서 분리균과 GenBank에 수록된 균간의 유형의 차이를 보였다. PFGE typing 실험에서는 분리균 모두에서 동일한 amplicon 단편을 나타내었다.

또한, 2002년 8월부터 10월까지 콜레라균 서식가능성 규명을 위해 경북 동해안 일대에서 plankton 시료채취 및 *V. cholerae* O1 및 *V. cholerae* O139의 *rfb* 및 CT gene 검출을 위한 multiplex-PCR 확인실험에서는 *ctxA* gene의 DNA band는 일부 검출되었으나, *V. cholerae* O1 및 *V. cholerae* O139는 분리되지 않았다. 힘에서 *ctxA* gene DNA band는 검출되었으나, *V. cholerae* O1 및 *V. cholerae* O139는 분리되지 않았다.

REFERENCES

- Murray, P.R., Baron E.J., Michael, A., Tenover F.C., and Tenover, R. H. 1995. *Manual of clinical microbiology* 6th. ed. ASM press. Washington, D. C. p.465-476.
- Farmer, J., J. Michael, T. Kelly, and F. W. Hickman-Brenner. 1985. *Vibrio manual of clinical microbiology* 4th Edit. pp.282.
- 이복권. 2000. 국내에서 분리된 *V. cholerae* O1과 O139 균의 분자역학적 특성. 안동대 대학원 박사학위논문.
- 김호훈, 신영학, 강연호, 유천권, 박미선, 김동숙, 유재연, 전정훈, 이복권, 박기덕, 김동진, 정태화, 이종구, 박기동, 김상순, 이동모, 김분식, 조병률. 1996. 최근 국내 유입 *V. cholerae* 균 및 1995 년도 국내 집단 발생 콜레라의 역학적 양상. *대한감염학회지* 28(6): 473-479.
- 유천권, 강윤숙, 조수열, 이영희, 김기상, 이명원, 김호훈, 박기덕. 1992. 1991년 한국의 콜레라 유행기간중 분리된 *V. cholerae* O1의 생화학적 특성 및 장독소 유전자에 관하여. *대한미생물학회지* 27(4): 325-331.
- 이복권, 강연숙, 정태화. 1981. Phage type of *Vibrio cholerae* cultures isolated in Korea (1980). *국립보건원보* 18: 461-469.
- Feeley, J. C. and Margaret P. 1963. Study on the haemolytic activity of El Tor *Vibrio*. *Bull. Wld. Hlth Org.* 28: 347-356.
- 김정순. 1991. 우리나라 콜레라 유행의 역학적 고찰. 1991년도 보건학종합학술대회지 p70-93.
- 이종승, 박기덕. 1966. 세균검사사업-1963 년도 콜레라 방역 보고. *국립보건원보* 3: 44-52.
- 정희영. 1980. 콜레라의 자연사. *한국역학회지* 2(1): 5-9.
- 김한중, 오희철, 서일, 박종구, 김규상, 지선하, 문종국. 1991. 1991년. 서천, 군산지역 콜레라 유행의 전파경로와 발생근원. *한국역학회지* 13(2): 123-139.
- 국립보건원. 2001. 2001년 발생한 콜레라 유행의 역학적 특성- 전국. *감염병 발생정보* 12(10): 119-121.
- Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.R. Roszak, S.A. Huq, and L.M. Palmer. 1985. Viable, but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for release of genetically engineered microorganisms. *Bio. Technology* 3: 817-820.

14. 오희철, 김문식, 이종구, 김상순, 박기동, 김호훈, 황창용. 1996. 우리나라 1995, 1996년 콜레라 발생 근원에 대한 연구. *한국감염학회* **18**(2): 182-190.
15. Huq, A., E.B. Small, P.A. West, M.I. Huq, R. Rahman, and E.E. Colwell. 1983. Ecological relationship between *V. cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(1): 275-283.
16. Huq, A., P.A. West, E.B. Small, M.I. Huq, and R.R. Colwell. 1984. Influence of water temperature salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *V. cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(2): 420-424.
17. Tamplin, M.L., A.L. Gauzens, A. Huq, D.A. Sack, and R.R. Colwell. 1990. Attachment of *V. cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6): 1977-1980.
18. Garay, E., A. Arnau, and C. Amaro. 1985. Incidence of *V. cholerae* and related *Vibrios* in coastal Lagoon and sea water influenced by lake discharges along an annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(2): 426-430.
19. Ogg, J.E., R.A. Ryder, and H.L. Smith, Jr. 1989. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(1): 95-99.
20. Grimes, D.J., R.A. Atwell, P.R. Brayton, L.M. Palmer, D.M. Rollins, D.B. Roszak, F.L. Singleton, M.L. Tamplin, and R.R. Colwell. 1986. The fate of enteric bacteria in estuarine and marine environment. *Microb. Sci.* **3**: 324-329.
21. Hood, M.A., G.E. Ness and G.E. Roderick. 1981. Isolation of *Vibrio cholerae* O1 from the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 559-560.
22. Miller, C.J. 1985. Cholera epidemiology in developed and developing countries: new thoughts on transmission, seasonality, and control. *Lancet.* **326**: 261-263.
23. Araujo, D.B., S.C. Martins, L.M. Albuquerque, and E. Hofer. 1996. Influence of the copepod *Mesocyclops longisetus* (Crustacea: Cyclopidae) on the survival of *Vibrio cholerae* O1 in fresh water. *Cad Saude Publica.* **12**(4): 551-554.
24. Chowdhury, M.A., A. Huq, B. Xu, F.J. Madeira, and R.R. Colwell. 1997. Effect of alum on free-living and copepod-associated *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(8): 3323-3326.
25. Dumontet, S., K.B. Krovacek, S.B. Aloda, R. Grottoli, V. Pasquale, and S. Vanucci. 1996. Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **19**(3): 245-254.
26. 국립보건원. 2002. 2002년도 해양환경 콜레라감시.
27. Li, M., Y. Chen, M. Kotetishvili, O.C. Stine, J.G. Jr. Morris, A. Sulakvelidze, and S. Sozhamannan. 2001. Genetic analysis of the virulence regions, CTX f prophage and *Vibrio* pathogenicity island (VPI), in Diverse, Non-epidemic serogroup strains of *Vibrio cholerae*. *Department of Epid. and Preventive Medi., USA.*
28. Yamamoto, K., V.G. Do, M. Xu, T. Iida, T. Miwatani, M.J. Albert, and T. Honda. 1994. Comparison of cholera toxin genes (*ctxAB*) of non-O1 *Vibrio cholerae* strains 854 (O139-bengal) and S7 (O37) from two outbreaks. *Department of Bacterial. Infections.* **3**(1): 565.
29. Dams, E. M. De Wolf, and W. Dierick. 1991. Nucleotide sequence analysis of the CT operon of the *Vibrio cholerae* classical strain 569 B. *Biochem. Biophys. Acta.* **1090**(1): 139-141.
30. Rui, Y., B. Kan, and S. Gao. 2002. *ctxAB* gene of strains of *Vibrio cholerae* isolated from China. *Institute of epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, P. O. Box 5.*
31. Heidelberg, J.F., J.A. Eisen, W.C. Nelson, and O. White. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *The Institute for Genomic Research, 9712, USA.*
32. Shin, H.J., Y.C. Park, and Y.C. Kim. 1999. Cloning and nucleotide sequence analysis of the virulence gene cassette from *Vibrio cholerae* KNIH002 isolated in Korea. *J. Misain-murhag Hoiji* **35**(3): 205-210.
33. 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.
34. Mitra, R.K., R.K. Nandy, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, S. Yamasaki, T. Shimada, Y. Takeda, and G.B. Nair. 2001. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **50**(3): 268-276.
35. Fields, P.I., P. Tanja, W. Kate, and O. Orjan. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 stain from the latin american cholera epidemic. *J. Clin. Microbiol.* **30**(8): 2118-2121.
36. Albert, J.M., I. Dilara, N. Shamsun, Q. Firdausi, F. Susanna, and W. Andrej. 1997. Rapid detection *Vibrio cholerae* O139 bengal from stool specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**(6): 1633-1635.
37. Shirai, H., M. Nishibuchi, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, S.K. Pal, and Y. Takada. 1991. Polymerase chain reaction for detection of cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2517-2521.
38. Wachsmuth, K., P.A. Blake, and O. Olsvik. 1994. *Vibrio cholerae and cholera-molecular to global perspectives.* ASM Press. Washington, D.C. 3135, 145203, 293371.
39. Mekalanos, J.J., D.J. Swartz, G.D. Pearson, N. Harford, F. Groyne, and M. de Wilde. 1983. Cholera toxin genes, nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *J. Nature,* **306**(5943): 551-557.
40. Baudry, B., A. Fasano, J. Ketleyand, and J.B. Kaper. 1992. Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **60**: 428-434.
41. Johnson, J.A., J.G. Morris, Jr. and J.B. Kaper. 1993. Gene encoding zonula occludens toxin (*zot*) does not occur independently from cholera enterotoxin gene (*ctx*) in *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 732-733.
42. Michele, T., J.E. Galen, J. Michalski, A. Fasano and J.B. Kaper. 1993. Accessory cholerae enterotoxin (*ace*), the third

- toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 5267-5271.
43. Keasler, S.P. and R.H. Hall. 1993. Detection and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with Multiplex chain reaction. *Lancet* **341**, 1661.
44. Honda, T., N.A. Hata, K. Lerpocasombat, and T. Miwatani. 1985. Production of monoclonal antibodies against a hemagglutinin/protease of *Vibrio cholerae* Non-O1. *FEMS. Microbiol. Lett.* **62**(23): 227-230.
45. Ichinose, Y., K. Yamamoto, N. Nakasone, M.J. Tanabe, T. Takeda, T. Miwatani, and M. Iwanaga. 1987. Enterotoxigenicity of EI Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **55**: 1090-1093.
46. Spira, W.M., D.A. Sack, P.J. Fedorka-Cray, S. Sanyal, J. Madden and B. McCardell. 1986. Description of a possible new extracellular virulence factor in nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1. *KTK Scientific Publishers, Tokyo.* Vol. 3.
47. 이복권, 강연호, 박미선, 유재연, 김성한, 김준영. 1999. 플랑크톤 등 해양생물체 및 연안 해·하수에 대한 콜레라균 오염도 및 서식가능성 연구. *국립보건원보* **36**: 311-312.
48. 임현술. 2002. 콜레라 : 해양 토착문제. 대한감염학회·대한화학요법학회 추계학술대회 pp.41-51.
49. Blake, P.A., R.E. Weaver, and Hollis. 1980. Cholera-a possible endemic focus in the United States. *N. Engl. J. Med.* **302**: 305-309.
50. Rogers, R.C. 1980. The Queens Land cholera incident of 1977. 2. *The epidemiological investigation.* Bulletin of the WHO **58**: 665-669.
51. Motes, M.L., S.R. Zywno, A. DePaola, R.E. Becker, and M.W. Presnell. 1983. Isolation of *V. cholerae* serotype Ogawa from Florida estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(1): 321-322.
52. Benenson, A.S. 1990. Control of Communicable Disease in Man. 15th ed. *American Public Health Association.*

(Received Aug. 4, 2003/Accepted Nov. 20, 2003)