

한국에서 분리된 *Vibrio cholerae* serovar non-O1 및 non-O139 병독 인자의 분포

성 희 경

인제대학교 부산백병원 임상병리과

한국의 환경에서 분리된 47주와 환자 혈액에서 분리된 18주의 *Vibrio cholerae*(*V. cholerae*) serovar non-O1 및 non-O139를 대상으로 하여 콜레라 독소, 콜레라 독소 유전자, 용혈소, 그리고 혈구응집소 등의 병독인자 분포를 알아 보았다. 시험된 65균주 중 용혈소만 생산하는 균은 29균주(44.6%)였고, 용혈소와 혈구응집소를 생산하는 것은 65균주 중 36균주(53.9%)였다. 용혈소, 콜레라 독소 및 유전자, 그리고 혈구응집소 모두를 가지고 있는 것은 환경에서 분리된 O37형 한 균주이었다. 한편 첨가한 당농도에 따른 혈구응집소 억제시험에서, 1%이하의 mannose와 galactose에서 응집이 억제된 것은 환경분리균주 47균주 중에서 26균주(55.4%)로 내혈구응집소나 외혈구응집소가 비슷한 비율로 분포하였고, 반면 환자분리균주는 18균주 중에서 5균주(27.8%)가 외혈구응집소의 비율이 훨씬 높았다. 따라서 *V. cholerae* non-O1 및 non-O139의 용혈소가 주독소로 병독인자 분포는 다양하게 나타났다. 콜레라 독소가 유일한 병독인자라고 인식하기는 어려웠고 여러 가지 인자들이 복합적으로 작용될 것으로 생각되었다. 특히 환경분리주 O37형에서 콜레라 독소 생성균이 발견된 것은 향후 역학적인 측면에서 많은 연구가 되어야 할 것으로 사료되었다.

Key words □ Distribution, *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139, virulence factor

Vibrio cholerae(*V. cholerae*) non-O1과 non-O139은 사람에게 장내 감염을 일으키거나 또는 균혈증과 창상감염 등의 장외 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다. 최근 *V. cholerae* non-O1 및 non-O139는 동남아시아와 인도대륙에서 유행하기 시작한 이래 식료품역 및 사람들의 빈번한 여행으로 인하여 세계도처에서 발생하고 있으며 지역에 따라서는 대유행을 하기도 하였다(8, 12, 15, 17). 발병시기 및 균의 분리는 주로 수온이 높은 하절기로 담수와 해수가 합류하는 하구부근 등의 기수지역에 많이 검출되는 것으로 알려져 있고, 유행시기에 유럽과 구미 등지에서는 생활하수와 야생동물 중에서 분리된다는 보고도 있다(16). 특히 1992년 10월 인도의 마두라스에서 콜레라 증세를 나타내었던 *V. cholerae* non-O1은 혈청형이 O139로 밝혀졌다. 근년에는 방글라데쉬, 네팔, 파키스탄, 태국, 미국, 영국 등에서 뿐만 아니라 한국이나 일본에서도 이 혈청형이 분리된 바도 있다. O139 이외의 혈청형도 임상환자로부터 유행성을 나타내며 분리되고 있다(8, 10).

한편 *V. cholerae* non-O1의 병독인자는 콜레라 독소에 의해서 장염을 일으키거나 또는 전혀 검출되지 않았는데도 장염환자에게 분리되기도 한다. 그래서 병원성 인자가 과연 무엇인지에 대한 의문점을 해결하기 위하여 이들이 생산하는 병독인자에 관한 많은 관심을 갖게 되었다. 병독인자에 관한 연구는 주로 국외에서 많이 이루어졌는데, 그 연구로는 병독 결정인자인 콜레라 독소에 관한 연구(22, 23), 장독소에 관한 연구(9), 용혈소에 관한 연구(4, 5, 13), 숙주세포의 부착에 관련되는 내의 혈구응집

소에 관한 연구(12, 13) 등의 장염관련 병독인자의 연구들이었다. 반면 국내에서는 단순한 *V. cholerae* O1 및 non-O1의 특정지역의 분포 및 특성에 관한 연구는 있으나 병독인자 중 용혈소에 관한 연구(1) 외 병독인자에 관한 연구는 거의 없는 실정이며, 특히 장외감염환자를 대상으로 한 연구는 없다.

본 연구에서는 한국의 연안 해수와 어패류에서 분리된 균주와 환자의 혈액으로부터 분리된 균주간에 어떠한 병독인들이 분포되어 있는지를 알기 위하여 분리원에 따른 콜레라 독소의 생성, 유전자의 존재 여부와 그 외 용혈소나 혈구응집소 등을 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에는 *V. cholerae* non-O1 및 non-O139 균주는 1992년 4월부터 11월까지 한국 연안의 해수나 어패류에서 분리된 47 균주와 1984년부터 1995년까지 환자의 혈액에서 분리된 18 균주 등 총 65균주가 사용되었다.

역수동 라텍스 응집법에 의한 콜레라 독소 시험

VET-RPLA(Denka Seiken, Japan) 키트를 사용하여 아래와 같이 역수동 라텍스 응집(reverse passive latex agglutination: RPLA) 방법을 사용하였다(5, 24). *V. cholerae* non-O1 및 non-O139를 CAYE-3배지에 정치배양하여 생산된 콜레라 독소는 항체 감작 라텍스와 반응하여 응집이 일어나는 원리로 그 과정은 시험균을 CAYE-3배지에 접종하고 37°C에서 18-24시간 동안 정치배양하였다. 배양한 배지표면에 polymixin B 0.1 ml를 적하

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-051-890-6648, 6696. Fax : 82-051-893-1562
E-mail :

하여 다시 37°C에서 3시간 이상 배양하여 콜레라 독소 추출 완충액 1 ml를 배지에 가한 후 vortex mixer로 교반하였다. 이를 1000×g로 20분간 원심분리 후 상층액을 회수하고, microtiter용 tray(V형)의 각 well에 균액을 micropipette으로 25 µl씩을 적하하고 다시 항체감각 라텍스액을 각각 25 µl씩 넣어 mixer로 잘 혼합하여 3시간 정치 후 응집유무를 확인하기 위하여 흑지를 바닥에 깔고 그 위에 tray의 well내 라텍스 침강상을 육안으로 관찰하였다.

GM₁-ELISA법

Sack 등(18)의 방법으로 RPLA시험에서와 같은 방법으로 배양하여 원심분리 후 상층액을 0.2 µm membrane filter로 여과하여 여액을 시료로 사용하였다. GM₁-ELISA법(Denka Seiken, Japan) 키트를 사용하여 microtiter plate의 well에 GM₁액을 결합시키고, 균주 여과액, rabbit anti-CT 그리고 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G와 alkaline phosphate인 기질액의 순서로 반응 후 발색을 정지시킨 다음 음성 well을 대조로 하여 발색정도를 육안 판독하거나 육안판독이 어려울때는 OD 490 nm의 분광광도계(Shimadzu CL-750, Japhan)를 이용하여 판독하였다.

Polymerase chain reaction법에 의한 콜레라 독소 유전자의 검출

콜레라 독소 유전자의 존재는 Saiki 등(20)의 방법에 따라 Table 1의 primer들을 사용하여 PCR법으로 확인하였다. *ctxA*는 10×buffer 5 µl, 2.5 mM dNTP 8 µl, 5 U *Taq* DNA polymerase 0.25 µl과 10 µM primer를 각각 1 µl씩 넣었다. Template DNA는 1 ml의 증류수에 시험균 한 집락을 넣은 후 5분간 95°C로 가열한 DNA추출액을 5 µl 취하고 증류수로 50 µl로 조정하여 thermal cycler 9600(Perkin-Elmer Cetus, USA)에 95°C에서 2분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 으로 30 cycles로 증폭시킨 것을 2% agarose gel을 써서 전기 영동한 후 380 bp를 확인하였다(3). *ctxA1* 검출용 template DNA의 추출은 *ctxA*와 같은 방법으로 추출하여 5 µl 취하고 250 pmol의 primer를 1 µl, 1.25 mM dNTPs 8 µl, 10×buffer 5 µl, 1.5 U *Taq* polymerase 0.3 µl에 증류수로 50 µl되게 한 다음 94°C에서 1분간 denaturation 하고 40°C에서 2분간 annealing 그리고 72°C에서 2분간 extension 30 cycles 증폭시킨 다음 *ctxA*시험과 같은 방법으로 전기영동을 하여 431 bp를 확인하였다(23). *ctxA2B*는 primer만 달

리하여 *ctxA1*과 동일조건으로 증폭하여 566 bp의 최종산물을 확인하였다(2, 3, 14, 22, 23).

혈구응집소 활성

O형 사람혈액배지에 시험균을 접종하고 37°C에서 18~24시간 배양한 다음, 세균을 10 mM PBS(pH 7.4)를 사용하여 10⁹ cell/ml로 조정하였다. O형 적혈구는 10 mM PBS(pH 7.4)의 완충액으로 3% 부유액을 조제하여 세균액과 적혈구 부유액 20 µl씩을 슬라이드에서 잘 혼합해서 5분 반응시켜 응집 유무를 관찰하였다(6).

혈구응집소 억제능

균주의 배양을 위하여 Ramamurthy 등(17)의 방법에 따랐으며, 사람의 O형 적혈구를 10 mM PBS(pH 7.4)로 3%되게 조제하고 당을 각각 동량 혼합하였다. 첨가된 당은 D-mannose와 D-galactose로 0.5%에서 2% (wt/vol)까지의 농도에 따른 응집 억제능을 관찰하였다.

용혈소의 생성

용혈소의 생성 여부는 시험균주를 Bram heart infusion broth에서 37°C, 24시간 동안 180 rpm에서 교반 배양한 후 14,000×g에서 15분 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액과 1% O형 적혈구를 PBS(pH 7.2) 부유액에 각각 1 ml 씩 혼합하고, 37°C에서 1시간 배양후 200×g에서 5분간 원심하여 상층액을 분광광도계(Shimadzu CL-750, Japhan) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 PBS로 1% 사람 O형 적혈구를 대조로 하여 판독하였다(9).

***V. cholerae* non-O1 및 non-O1의 항혈청 감별**

시험균주를 5% 면양혈액배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 *V. cholerae* 항혈청(Denka Seiken, Japan) 키트의 방법에 따라 균의 집락을 각각의 항혈청에 부유시켜 응집을 나타내는 항혈청형을 해당 항원형으로 판정하였다.

결과 및 고찰

콜레라 독소 생산여부

총 65균주를 대상으로 한 콜레라 독소생산시험 결과는 Table 2에서와 같이 환경분리주 47균주 중 2 균주가 RPLA시험 양성 반응을 나타내었다. 이들 균주에 대한 독소 생산 여부를 확실히

Table 1. Primer for cholera toxin gene(*ctx*) detection by PCR

Primer	Sequences	References
<i>ctxA</i>	5'-TCAAACCTATATTGTCCTGGTC 3'-AGCTACTCATTATGAACGC	3
<i>ctxA1</i>	5'-AGACGGGATTTGTTAGGCACGAT 3'-CGCCGAGAAGGGAGGTTTCGAGAT	23
<i>ctxA2B</i>	5'-TAGAGCTTGGAGGGAAGAGCCGT 3'-TGCGGAGTACGCTAACGGCGTTA	23

Table 2. Results of PCR, RPLA and ELISA to detect a cholera toxin gene(*ctx*)

Sources	Number of strains tested	Number of positive by		
		PCR	RPLA	ELISA
Environment	47	1	2	1
Patient	18	0	1	0
Total	65	1	3	1

PCR, Polymerase chain reaction; RPLA, Reverse passive latex agglutination; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

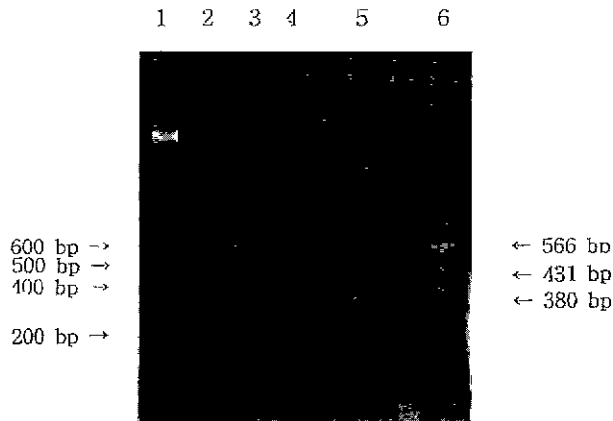


Fig. 1. Amplified cholera toxin gene in *V. cholerae* non-O1 and non-O139 by PCR.

Lane 1, λ *Hind* III size marker; 2 and 3, not detected *ctxA* (RPLA positive and ELISA negative isolates, O8 and O10 respectively); 4, Products of *ctxA1* primers (ELISA positive isolate, O37); 5, Products of *ctxA* primers (ELISA positive isolate, O37); 6, Products of *ctxA2B* primers (ELISA positive isolate, O37).

알기 위하여 추가시험을 하였다. 즉 PCR법으로 한 균주에서 각각 *ctxA* 380 bp, *ctxA1* 431 bp와 *ctxA2B* 566 bp products를 확인할 수 있었다. 그리고 ELISA법으로는 발색이 강한 양성반응을 보였다. 반면 환자분리주의 경우 18균주 중에서 한 균주가 RPLA법으로 콜레라 독소 반응이 양성하였고, PCR과 ELISA법으로는 모두 음성으로 나타났다. 이상의 결과는 RPLA 반응에 대한 小林 등(2)의 연구와도 일치하였다. 그러나 이 시험은 특이성이 다소 떨어지고 콜레라 독소 이외의 장독소와 교차반응을 일으킬 수도 있지만 특히 환자분리주는 장외감염환자에서 분리되었기 때문에 다른 장독소일 것으로 추정되었다(12). 그러므로 콜레라 독소의 존재 유무를 확인할 때는 PCR이나 ELISA법으로 확인하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다(23).

한편 이들 독소 생성균 3주를 대상으로 *V. cholerae*의 혈청형을 시험한 결과, 환경분리주는 O10과 O37이었고 환자 분리주는 O8로 확인되었다. 특히 본 연구에서 환경분리주인 O37에서 PCR법으로 콜레라 독소 유전자가 검출된 점은 다른 *V. cholerae* non-O1 및 non-O139에 대한 콜레라 독소 연구에서 O44와 O8 균 등에서 콜레라 독소 유전자를 확인할 수 있다는 보고(8, 17)

와 Echeverria 등(11)이 O8에서 1주, O44에서 1주와 O49에서 3주를 발견하였다는 보고가 있는데, 본 연구의 환자 혈액에서 분리된 O8은 콜레라 독소를 확인할 수는 없어 환자의 분리원에 따라 독소의 분포가 다를 것으로 생각되었다. 그 외는 대부분이 *V. cholerae* non-O1이 일부 콜레라 독소 유전자를 보유하고 있다는(4) 보고가 있으나 구체적으로 O139인지 아니면 그 이외의 non-O1, non-O139인지는 알 수 없었다. 최근 본 실험에서 분리된 O37에 관한 연구로는 Bik 등(7)이 1968년 수단에서 환자로부터 분리된 균과 1992년에서 1993년 사이에 인도의 장염환자로부터 분리된 O37균주를 대상으로 콜레라 독소 유전자의 존재 유무를 확인한 결과 수단에서 분리된 균주에서 콜레라 독소와 유전자를 확인 할 수 있었다고 보고하였다.

따라서 환자분리주는 선행연구에서 대부분이 장염환자에서 분리된 균이고 본 연구의 장외감염 환자에서 분리되었기 때문에 분리원에 따라 콜레라 독소의 분포는 다를 수 있었다. 또 환경 분리주 O37은 집단발병을 일으켰던 균으로 이는 본 연구에서 분리된 O37과의 역학적, 세균학적인 조사가 충분히 검토되어야 하며, 더구나 *V. cholerae* O1의 고전형의 변이형으로 언급되고 있는 등은 역학적으로 O1과 O139에 이어 O37이 보건관리측면에서도 앞으로 상당히 문제시 될 것으로 추정된다.

세포 관련 혈구응집소의 활성 및 억제능

세포 관련 혈구응집소 활성은 Table 3의 병독인자에서 용혈소(hemolysin), 콜레라 독소(CT)와 혈구응집소(hemagglutinin)의 활성을 함께 분리원별로 관찰해 보면 환자분리주는 hemolysin⁺ CT⁻ hemagglutination⁻(44.4%)과 hemolysin⁺ CT⁻ hemagglutination⁺(55.6%)의 두 형으로 나눌 수 있었고, 콜레라 독소인지는 검출할 수 없었으며 모두 용혈소만 가지고 있었다. 환경분리주에서는 환자분리주에서 검출된 형태인 hemolysin⁺ CT⁻ hemagglutination⁻(44.7%)과 hemolysin⁺ CT⁻ hemagglutination⁺(53.2%)인 두형이 대부분이었으며 hemolysin⁺ CT⁺ hemagglutination⁺(2.1%)는 한 주가 분리되었다. 콜레라 독소 유전자를 가진 환경분리주는 용혈소와 혈구응집소가 모두 양성으로 나타났다. 환자분리주 중 콜레라 독소는 음성이나 용혈소가 모두 양성으로 나타난 것을 볼 때 용혈소가 주 병독인자이고 그 외 두 가지 이상의 병독인자를 보유하며 그 중에서도 혈구응집소는 Atkinson과 Trust(1)의 연구에서 병원성을 더욱 상승시키는 역

Table 3. Virulence phenotypes of the *V. cholerae* non-O1 and non-O139 isolates

Virulence phenotypes	Number of strains		Total
	Patient	Environment	
Hemolysin ⁺ CT ⁺ Hemagglutination ⁺	0	1(2.1%)	1(1.5%)
Hemolysin ⁺ CT ⁺ Hemagglutination ⁻	0	0	0
Hemolysin ⁺ CT ⁻ Hemagglutination ⁺	10(55.6%)	25(53.2%)	35(53.9%)
Hemolysin ⁺ CT ⁻ Hemagglutination ⁻	8(44.4%)	21(44.7%)	29(44.6%)
Hemolysin ⁻ CT ⁺ Hemagglutination ⁺	0	0	0
Hemolysin ⁻ CT ⁻ Hemagglutination ⁺	0	0	0
Total	18(100%)	47(100%)	65(100%)

+, presence of the phenotype; -, absence of the phenotype; CT, cholera toxin.

Table 4. Inhibition patterns of hemagglutination of *V. cholerae* non-O1 and non O139 by D-mannose and D-galactose

Inhibition patterns		Number of inhibited strains		Total
		Patient	Environment	
D-mannose ⁺	D-galactose ⁺	4(22.2%)	20(42.6%)	24(36.9%)
D-mannose ⁻	D-galactose ⁺	0	1(2.1%)	1(1.5%)
D-mannose ⁻	D-galactose ⁼	0	4(8.5%)	4(6.2%)
D-mannose ⁻	D-galactose ⁻	13(72.2%)	12(25.5%)	25(38.4%)
D-mannose ⁼	D-galactose [±]	1(5.6%)	6(12.8%)	7(10.8%)
D-mannose ⁺	D-galactose ⁻	0	4(8.5%)	4(6.2%)
Total		18(100%)	47(100%)	65(100%)

+, ≤ 0.5% hemolysis; =, ≤ 1% hemolysis; -, ≥ 2% hemolysis.

활을 하는 것으로 판단하였는데 본 연구의 결과에서도 같은 결론을 얻을 수 있었다(1, 9, 19).

병원성과 유관한 것으로 알려져 있는 렉틴(lectin)에 의한 세균 세포의 혈구응집소는 렉틴과 유사한 성질을 확인할 수 있다. 이런 성질은 각 당에 의한 혈구응집소 억제능으로 1% 내외의 당농도에서 감수성인 내혈구응집소(endohemagglutinin)와 내성을 나타내는 외혈구응집소(exohemagglutinin)로 구별할 수 있다(9, 13, 19, 21). 이는 각 기질에 대한 부착력을 판단할 수 있는데 육탄당의 hydroxy group의 구조적인 차이에 의하여 당에 대한 감수성이 다르게 나타나므로 각 세포에 대한 부착기작도 다양하다. 본 연구에서도 분리원에 따라 당에 대한 감수성의 분포 정도를 알아보기 위하여 조사해 본 결과 환자분리주는 mannose⁺ galactose⁺형(22.2%), mannose[±] galactose[±]형(5.6%) 그리고 mannose⁻ galactose⁻형(72.2%)으로 각각 0.5% 농도에서는 22.2%, 1% 농도에서는 5.6%, 2% 농도에서는 72.2%의 억제능으로 세 가지 양상을 나타내었으며 특징적인 것은 두 당이 모두 같은 농도에서 감수성을 나타내었다(Table 4). 반면 환경분리주는 여섯 가지의 양상을 나타내었으며 임상분리주와 같은 형태로는 각각 0.5% 농도에서 42.6%, 1% 농도에서 12.8%, 2% 이상 농도에서는 25.5% 등으로 그 외 양상은 어느 한 당에 감수성을 나타내었다. 따라서 환경분리주가 환자분리주보다 혈구응집 억제능이 높았고 다양한 양상을 나타내었다. 또한 Dalsgaard 등(8)의 연구에서 환자분리 58균주 모두가 1% D-mannose에서 억제능이 있었다고 보고한 결과는 시험균주수가 18균주로 비교하기는 무리이기는 하나 본 연구의 27.8%와 차이가 있었고, Ramamurthy 등(17)이 연구한 환자분리주의 각 당 1% 농도가 64%의 균주에 대해 억제능이 없었다고 하는 것은 본 연구의 2% 이상의 당농도에서 72.2% 균주가 내성인 결과와 거의 비슷하였다. 분리원별 당감수성에서는 1% 이하 단당류 농도에서 임상유래주 27.8%의 억제능과 환경분리주 55.4%로 내혈구응집소가 환경분리주에서 높게 나타났다. 이런 결과는 연구자에 따라 다소 차이가 있지만 대체로 외혈구응집소가 환자분리주에서 분포가 높음을 알 수 있었다(13, 19). 특히 본 연구에서는 환자의 혈액에서 분리된 균주이기 때문에 다른 연구에서

주로 장염환자를 대상으로 분리된 경우의 내혈구응집소 분포보다는 외혈구응집소가 병원성인자로 큰 비중을 차지할 것으로 생각되었다. 결국 환자의 장의감염인 경우는 용혈소와 외혈구응집소 등이 주요병원성 인자로서(21), 수계환경에서는 내혈구응집소가 각 기질에 부착하기 위하여 음모(pili)와 함께 활성이 강하게 작용할 것으로 인식되었다.

그러므로 *V. cholerae* non-O1과 non-O139에서 콜레라 독소만이 유일한 병독인자라 하기 어려웠다. 특히 환경분리주도 환자분리주와 같은 여러 형태의 독성인자를 보유하고 있는 것으로 보아 용혈소나 혈구응집소 등의 여러 인자가 복합적으로 작용하여 병원성을 발현할 것으로 사료되었다.

감사의 말

본 연구를 위하여 적극적인 지원을 해 주신 연세대 의대 정윤섭 명예교수님과 일본 동경위생연구소 시마다 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. 張東錫, 條田純男. 1994. 水産物에서 分離된 病原性 비브리오균의 溶血性毒素. 韓水誌. 27, 107-113.
2. 小林一寛, 勢戸和子, 上口 美子, 牧野正道, 石橋正憲, 赤阪進, 山本和生. 1989. Polymerase chain reaction 法を用いたコレラ毒素遺傳子の迅速診断法. 醫學のあゆみ. 150, 509-510.
3. 小林一寛, 勢戸和子, 赤阪進, 牧野正道. 1990. 遺傳子増幅法によるコレラ毒素遺傳子の迅速診 感染症誌. 64, 1323-1329.
4. 三輪谷俊夫, 大橋誠, 竹田美文, 工藤泰雄, 篠田純男, 本田武司. 1990. 腸炎ビブリオ 第三集. 近代出版, 105-138.
5. 辻 孝雄. 1992. 毒素原性大腸菌の産生易熱性エンテロトキシン(LT)の活性部位. 日本細菌學雜誌. 47, 729-745.
6. Atkinson, H.M. and T.J. Trust. 1980. Hemagglutination properties and adherence ability of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 27, 936-946.
7. Bik, E.M., R.D. Gouw, and F. R. Mooi. 1996. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1453-1461.
8. Dalsgaard, A., M.J. Albert, D.N. Taylor, T. Shimada, R. Meza, O. Serichantalergs, and P. Echeverria. 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2715-2722.
9. Dattaroy, K., K. Banerjee, S.P. De, and A.C. Ghose. 1986. Comparative study of expression of hemagglutinins, hemolysins, and enterotoxins by clinical and environmental isolates of non-O1 *Vibrio cholerae* in relation to their enteropathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 875-879.
10. Dhamodaran, S., S. Ananthan, and P. Kuganatham. 1995. A retrospective analysis of the Madras epidemic of non-O1 *Vibrio cholerae* new serogroup O139 Bengal. *Indian J. Med. Res.* 101, 94-97.
11. Echeverria, P., C.W. Hoge, L. Bodhidatta, O. Serichantalergs, A. Dalsgaard, B. Eampokalap, J. Perrault, G. Pazza-

- glia, P.O., Hanley, and C. English. 1995. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O139 isolates from Asia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **52**, 124-127.
12. Janda, J.M., C. Powers, and R.G. Bryant. 1988. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 245-267.
 13. Krasilnikov, O.V., J.N. Muratkhodjaev, and A.O. Zitzer. 1992. The mode of action of *Vibrio cholerae* cytolysin. The influences on both erythrocytes and planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1111**, 7-16.
 14. Mekalanos, J.J., D.J. Swartz, G.D. Pearson, N. Harrford, F. Groyne, and M. Dewilde. 1983. Cholera toxin genes: Nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* **306**-551.
 15. Morris, J.G., R. Wilson, B.R. Davis, I.K. Wachsmuth, C.F. Riddle, H.G. Wathern, R.A. Pillard, and P.A. Blake. 1981. Non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in the United States. *Ann. Inter. Med.* **94**, 656-658.
 16. Rahim, Z. and K.M. Aziz. 1992. Isolation of enterotoxigenic *Vibrio cholerae* non-O1 from the Buriganga river and two ponds of Dhaka, Bangladesh. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **10**, 227-230.
 17. Ramamurthy, T., P.K. Bag, A. Pal, S.K. Bhattacharya, M. K. Bhattacharya, T. Shimada, T. Takeda, T. Karasawa, H. Kurazono, Y. Takeda, and G.B. Nair. 1993. Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from hospitalised patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.* **39**, 310-317.
 18. Sack, D.G., S. Huda, K.B. Neogi, R.R. Daniel, and W.M. Spira. 1980. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat labile enterotoxin ant antitoxin. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 35-40.
 19. Saha, N. and K.K. Banerjee. 1995. Carbohydrate-dependent binding of the cell-free hemagglutinin of *Vibrio cholerae* to glycoprotein and glycolipid. *J. Bacteriol.* **177**, 758-764.
 20. Saiki, R.K., D.H. Gelfando, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Hifuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermo stable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
 21. Sengupta, T.K., D.K. Sengupta, and A.C. Ghose. 1993. A 20-kDa pilus protein with haemagglutination and intestinal adherence properties expressed by a clinical isolate of non-O1 *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**, 237-42.
 22. Shirai, H., M. Nishibuchi, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, S.C. Pal, and Y. Takeda. 1991. Polymerase chain reaction for detection of the cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2517-2521.
 23. Varela, P., M. Rivas, N. Binsztein, M.L. Cremona, P. Herrmann, O. Burrone, R.A. Ugalde, and A.C. C Frasch. 1993. Identification of toxigenic *Vibrio cholerae* from the Argentine outbreak by PCR for ctx A1 and ctx A2-B. *FEBS.* **315**, 74-76.
 24. Yamamoto, T., T. Tamura, and T. Yokota. 1984. Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for humans. *J. Biol. chem.* **259**, 5037-5044.

(Received May 21, 1999/Accepted August 24, 1999)

ABSTRACT: Distribution of Virulence Factors of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 Isolated from Korea

Hee-Kyung Seong (Department of Clinical Pathology, Pusan Paik Hospital, Pusan 614-735, Korea)

The production of virulence factors such as cholera toxin, hemolysin and hemagglutinin in *V. cholerae* non-O1 and non-O139 were examined. Among 65 strains isolated from environmental and clinical blood sources, 29 (44.6%) strains produced hemolysin only, 35(53.9%) strains produced both hemolysin and hemagglutinin. From one O37 strain isolated from environment, cholera toxin, ctx gene, hemolysin, and hemagglutinin were detected. All of the strains isolated from clinical and environmental sources showed hemolytic activity against human O group erythrocytes. In inhibition patterns of hemagglutination, 5 of 18 clinical strains (27.8%) were inhibited by less than 1% mannose and galactose, while, among the 47 environmental isolates, those patterns by less than 1% mannose and galactose 55.4% were inhibited. Therefore, exohemagglutinin positive rate was high in clinical blood isolates but in environmental sources, the rate was almost similar to the rate of endohemagglutinin positive. These results indicated that *V. cholerae* non-O1 and non-O139 produced various virulence factors such as cholera toxin, hemolysin, and hemagglutinin but not a single factor. Further studies are need for epidemiological or bacteriological studies of *V. cholerae* O37 isolated from environment.