

*Neisseria gonorrhoeae* 분리균주의 특성

최영기 · 정운섭\* · 김수영 · 이형환

건국대학교 이과대학 생물학과  
\*연세대학교 의과대학 임상병리학교실Characterization of Isolated strains of *Neisseria gonorrhoea*

Choi, Young-Gee, \*Yun-Sop Chong, Hyung-Hoan Lee, and Soo-Young Kim

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133,

\*Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Yonsei University

Eighty-one strains of *Neisseria gonorrhoeae* were isolated, identified from 320 clinical specimens and further characterized on the effects of VCN and isovitalex, on the utilization of carbon sources, on the production of  $\beta$ -lactamase, and on plasmid patterns. Out of the 81, seventy-two strains were identified as *N. gonorrhoeae* on chocolate agar, 80 on Thayer-Martin medium, and 55 on 2% isovitalex Thayer-Martin medium. Out of the 81, sixty-seven strains produced acid at 48-hour culture in glucose medium, and 10 did it at 72 hours, but 4 did not produce it at 72 hours. Forty-one strains out of the 81 produced  $\beta$ -lactamase, in which one strain (PL-118) contained 2.6, 4.5 and 24.5 Mdaltons plasmids.

*Neisseria gonorrhoeae*는 그람음성 반응을 나타내는 쌍구균으로서 요도염, 자궁경관염, 난관염, 질염, 안결막염등을 일으키는 병원성 세균이며(Bauer, 1982), 이 세균의 병독력은 pili의 유무에 관계되는 것으로 보고되어 있다(Jephcott와 Reyn, 1971). *N. gonorrhoeae*의 증식은 비노생식기에 흔히 존재하는 다른 그람양성 세균, 그람음성세균 혹은 효모균 등에 비해 느리기 때문에 상재균과 혼재되었을 경우에는 분리하기가 어렵다(Thayer와 Martin, 1964). 이와같은 경우 배지에 항생제를 첨가하여 다른 세균의 증식을 억제하면 *N. gonorrhoeae*의 분리가 쉬워지고 따라서 양성율이 높아진다고 보고되어 있다(Thayer와 Martin 1966; Martin 등,

1967). *N. gonorrhoeae*의 선택배지로는 Thayer-Martin(TM)배지, New York City 배지, Lester-Martin배지등이 사용되고 있으며(Davis 등, 1980; Sonnenwirth, 1980), 특히 TM 배지는 *N. gonorrhoeae*를 분리하기 위하여 가장 널리 이용되고 있고, *N. gonorrhoeae*의 증식을 촉진시키기 위하여 Isovitalex(BBL), Vitox, Yeast supplement B(Difco)등이 첨가되어 사용되고 있다. Isovitalex와 Vitox의 조성은 동일하나 Isovitalex는 최종농도가 1%(v/v)가 되도록 첨가하여 사용하지만, Vitox는 최종농도가 2%(v/v)가 되도록 사용하고 있으나 그 성능에 대하여는 비교된 바 없다.

1976년 영국과 미국에서  $\beta$ -lactamase를 생

성하는 *N. gonorrhoeae*의 감염이 보고되었고 (Ashford등, 1976; Phillips등, 1976), 그 후 유럽, 아프리카, 뉴질랜드, 동아시아등 세계 여러 지역에서도  $\beta$ -lactamase 생산 *N. gonorrhoeae*의 검출이 보고되었고, 국내의 경우도 1979년에 보고가 있었으며 (Chong등, 1979), 위안부 및 특수업태부를 대상으로 조사한 결과에서는 분리균주중 약 25%가  $\beta$ -lactamase를 분비하는 *N. gonorrhoeae*인 것으로 밝혀졌다 (김등, 1983). *N. gonorrhoeae*의  $\beta$ -lactamase 생성은 plasmid DNA분자에 의하는 것으로 보고되었으며 (Eisenstein등, 1977), 아프리카에서 분리된 균주와 아시아에서 분리된 균주 사이에는  $\beta$ -lactamase생성에 관계하는 plasmid DNA 분자의 유전적 특징에 차이가 있는 것으로 보고되었다 (Elwell등, 1977; Perine등, 1977; Robert와 Falcow, 1977). Piziak등 (1984)은 주한미군으로부터 *N. gonorrhoeae* PL을 분리하여 조사한 결과 4.4Mdal의 plasmid DNA 분자를 가진 것을 보고했으나 국내에서 분리된 균주의 plasmid DNA분자에 관해서는 밝혀진 바 없다.

본 연구에서는 국내 위안부에게서 *N. gonorrhoeae*를 분리 동정하여, 오염균의 억제제인 VCN (Vancomycin, Colistine, Nystatin)의 영향 및 증균제인 Isovitalex의 양에 따른 동정효과를 조사하였고, coagglutination 양성인 균주를 이용하여 당분해 시험을 하였고, 또한  $\beta$ -lactamase 생산 *N. gonorrhoeae*의 plasmid DNA 분자의 분포를 조사한 것을 보고한다.

## 실험재료 및 방법

### 가검물의 채취와 균의 배양

1984년 12월부터 1985년 3월 사이에 인천지역 위안부를 대상으로 하였다. 면봉으로 자궁경관으로부터 가검물을 채취한 후 Stuart 수송 배지에 넣어 실험실로 운반된 가검물을 Thayer-Martin(TM)-1% isovitallex, 1% VCN (Vancomycin, colistin, nystatin)배지, chocolate agar-1% isovitallex배지, TM-2% isovitallex-1% VCN 배지에 각각 접종한 다음 물을

적신 여과지를 넣은 candle jar에 넣어 35°C에서 24, 48 및 72시간 배양한 후 관찰하고 평판배지에 생긴 세균 집락중에서 Oxidase 시험에 양성이고 그람음성 쌍구균인 것을 *N. gonorrhoeae*로 추정하고 이들을 동정하였다.

### 당분해능에 의한 *N. gonorrhoeae*의 동정

*N. gonorrhoeae*로 추정된 집락을 0.2ml의 멸균 증류수에 현탁하여 균부유액을 만든 다음, 끓는 물에 넣어 5분간 가열하고 이것을 슬라이드 유리 위에서 Phadebact gonococcus test (pharmacia diagnostics) 시약과 반응시켜 coagglutination 양성반응인 균주를 glucose, maltose, lactose 및 sucrose가 첨가된 CTA 배지 (BBL)에 접종한 다음 candle jar에 넣어 4일간 배양하면서 24시간 마다 산 생성을 관찰하여 특성을 조사했다.

### $\beta$ -lactamase를 생산하는 *N. gonorrhoeae* 균의 동정

앞에서 동정한 *N. gonorrhoeae* 균주를 chromogenic cephalosporin법 (Lim등, 1980)으로  $\beta$ -lactamase 생성능을 실험하였다. 즉 증류수를 적신 cefinase disc (BBL)에 시험세균을 묻히면 disc가 적색으로 변하는 것이 양성반응으로  $\beta$ -lactamase를 생산하는 *N. gonorrhoeae* 균으로 동정하였으며, 다음 실험을 위하여 GC 배지 (Chong등, 1978)에서 배양하여 35°C에 보관하였다.

### $\beta$ -lactamase 생산 *N. gonorrhoeae*의 plasmid DNA 추출과 전기영동

본 실험에서 분리한  $\beta$ -lactamase 생산 *N. gonorrhoeae* PL-118 균주와 penicillin G 감수성인 *N. gonorrhoeae* CDC F-18 (국립보건원), penicillin G 저항성인 *N. gonorrhoeae* 아프리카형 WHO-E 균주와 아시아형 WHO-4 균주 (Denmark의 Statens Serum Institute에서 분양)로부터 Birnboim과 Doly (1979) 방법을 개조하여 plasmid DNA를 추출하였다. 4  $\mu$ g/ml의 penicillin G가 첨가된 chocolate agar plate에 각 균을 접종하고 candle jar에 넣어 37°C에서 20시간 배양한 후 증식된 집락을 끓여 모아서 (Fayet등, 1982) 250  $\mu$ l의 Tris 완충액 (50mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris ·

Cl, pH 8.0)에 현탁한 후  $1500 \times g$ 로 10분간 원심분리(Eppendorf TOMY MC-15A)하였다. 세포를  $100 \mu l$ 의 Tris 완충액에 현탁하고 위와 같은 용액에 lysozyme (Grade I, Sigma)의 농도가  $20 mg/ml$  되도록 용해한 것을  $100 \mu l$  첨가하였다. 얼음 위에 5분간 방치한 후  $400 \mu l$ 의  $0.2 N$  NaOH,  $1\%$  SDS 용액을 첨가하고 다시 얼음위에 5분간 방치하였다. Potassium acetic acid 완충액( $5M$  potassium acetate  $60 ml$ , glacial acetic acid  $28.5 ml$ ,  $H_2O$   $11.5 ml$  이 혼합된 potassium acetate 용액, pH 4.8)  $300 \mu l$ 를 첨가한 후 얼음 위에 1시간 방치하였다.  $12,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 상등액을 모아 2배 부피의  $95\%$  ethanol을 첨가하여  $-20^\circ C$ 에서 30분간 방치하였다. 다시  $12,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 상등액을 버리고 나머지 ethanol을 완전히 증발시켜 제거한 다음  $50 \mu l$ 의 Tris 완충액( $89 mM$  Tris-HCl,  $89 mM$  boric acid,  $25 mM$   $Na_2EDTA$ , pH 8.0 용액)으로 DNA pellet을 녹였다.

위와 같은 용액으로 조제한 Agarose gel을 사용하여 전기영동을 하였다.  $50V$ 의 전압으로 5시간 전개시킨 후 ethidium bromide ( $0.5 \mu g/ml$ ) 용액에서 30분~60분간 염색하여 단파 UV transilluminator (ultra violet product, Inc) 상에서 polaroid UV 카메라( $55 mm$ , Universal Mamiya)로 적색 여과판을 사용하여 촬영하였다(Lee 등, 1984). plasmid 분자량 측정을 위하여 *E. coli* V 517의 plasmids를 표준분자량으로 이용했다<sup>(12)</sup>.

## 결과 및 고찰

### *N. gonorrhoeae*의 분리 및 동정조건

전체 320개의 가검물로 부터 81개의 *N. gonorrhoeae* 집락을 분리하였다. 81개 중 71개는 chocolate agar와 TM 배지에서 각각 성장하여 *N. gonorrhoeae*의 특성을 나타냈고, 나머지 9개는 TM 배지에서만 그리고 나머지 1개는 chocolate agar에서만 성장하면서 특성을 나타냈다(Table 1). 자궁경관에서 채취한 가검물에는 그람양성반응 세균, 그람음성반응 세균 및

**Table 1.** Isolation of *Neisseria gonorrhoeae* from 320 cervical specimens

Isolation media	No. (%) of Isolates
Chocolate agar (1% IVT)	72 (90.0)
Thayer-Martin (1% IVT+1% VCN)	80 (98.8)
Total No.	81 (100)

IVT: isovitalax, VCN: vancomycin, colistin, nystatin.

효모균등의 여러가지 세균이 혼재하기 쉬우므로(Sonnenwirth, 1980), 이러한 경우에 Thayer와 Martin(1964)은 그람양성과 그람음성반응 세균의 증식을 억제하는 polymyxin B와 vistocetin을 chocolate agar에 첨가한 배지에 쓰므로써 *N. gonorrhoeae*의 분리율이 chocolate agar에서 보다 약  $7.5\%$  증가했음을 보고하였다.

Thayer와 Martin(1966)은 chocolate agar에 polymyxin B와 Ristocetin이 첨가된 배지와 VCN(Vancomycin은 그람양성세균의 증식을 억제하며, colistin은 그람음성세균을, 그리고 nystatin은 효모균의 증식을 억제한다)이 첨가된 배지에서의 분리율을 비교한 결과 VCN을 첨가한 배지에서 *N. gonorrhoeae*의 분리율이  $8\%$  증가하였음을 보고하였다. 배양시간의 경과에 따른 *N. gonorrhoeae*의 특성을 나타내는 분리율을 비교해보면 Table 2에서와 같다. 24시간 배양의 경우는 chocolate agar에서  $22.2\%$ 의 균주가 특성을 나타내어 다른 배지에서 보

**Table 2.** Optimal time and media for *N. gonorrhoeae* identification

Culture media	No. (%) of isolates at			Sum (%) of isolates
	24h	48h	72h	
Thayer-Martin (1% IVT +1% VCN)	15 (18.7)	61 (76.5)	4 (5.0)	80 (100)
Thayer-Martin (2% IVT +1% VCN)	9 (16.4)	37 (67.2)	9 (16.4)	55 (100)
Chocolate agar (1% IVT)	16 (22.2)	42 (58.3)	14 (19.5)	72 (100)

h: incubation hours, IVT: isovitalax, VCN: vancomycin, colistin, nystatin.

**Table 3.** Incubation time required to detect acid production by *Neisseria gonorrhoeae* isolates in cystine trypticase agar.

Carbon sources	No. of isolates tested	No. (%) of isolates produced acid at		
		24h	48h	72h
Glucose	81	0	67 (82.7)	10 (12.4)
Maltose	81	0	0	0
Sucrose	81	0	0	0
Lactose	81	0	0	0

h: incubation hours.

다 약간 높은 분리율을 보였고, 48시간 배양후에는 TM배지에서 95%가 *N. gonorrhoeae*의 특성을 나타내어 가장 높은 분리율을 보였다.

*N. gonorrhoeae*의 증균제로는 Bacto supplement B와 Yeast extract(DIFCO)와 Isovitallex(BBL)등이 있다. Bacto supplement B와 Yeast extract는 glutamine, cocarboxylase, coenzyme등을 포함하고 있고 Isovitallex는 vitamin B-12, L-glutamine, guanine-HCl, p-aminobenzoic acid, L-cystine, dextrose, diphosphopyridine, nucleotide, cocarboxylase, ferric nitrate, thiamine-HCl, L-cystine-HCl로 구성되어 있다. Martin(1967) 등은 증균제로서 Bacto supplement B, Yeast extract를 첨가한 배지와 Isovitallex를 첨가한 배지에서의 *N. gonorrhoeae*의 분리율을 비교한 결과 Isovitallex를 첨가한 배지에서의 분리율이 Bacto supplement B, Yeast extract를 첨가한 배지에서의 분리율보다 16.9%가 높았음을 보고하였다. Isovitallex가 첨가된 배지와 vitox가 첨가된 배지의 비교에 관해서는 알려진 바가 없었으나 본 연구에서 1%의 Isovitallex를 첨가한 TM배지와 2%의 Isovitallex를 첨가한 TM배지에서의 분리율을 비교한 결과 Table 2에서와 같이 1% Isovitallex 함유한 TM 배지에서의 분리율이 30.8% 높은 것으로 나타났다.

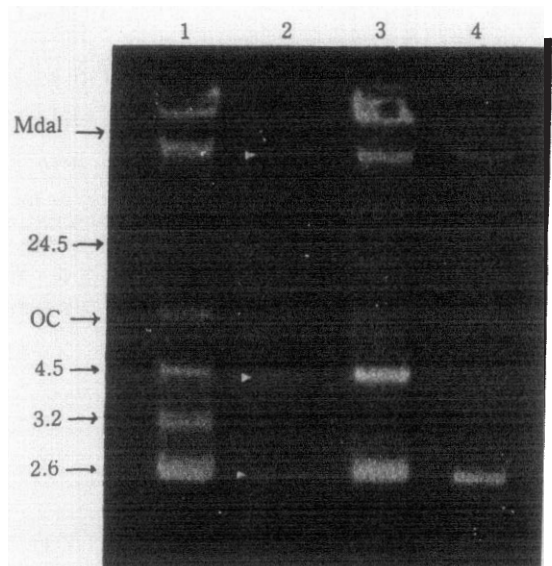
*N. gonorrhoeae*의 선택배지의 최적 pH는 7.2~7.6인 것으로 보고되었다(Sonnenwirth, 1980). 1%의 Isovitallex가 첨가된 TM배지의 pH는 7.2였으나 2%의 Isovitallex가 첨가된

TM배지의 pH는 6.9까지 떨어졌다. 따라서 후자의 경우 낮은 산도가 *N. gonorrhoeae*의 증식에 영향을 준 것으로 생각된다.

이상과 같은 실험결과로 보아 *N. gonorrhoeae*의 분리에 사용될 수 있는 선택배지로는 1% Isovitallex를 포함한 TM배지가 적합하며, 높은 분리율을 얻기 위하여 요구되는 배양시간은 72시간인 것으로 생각된다.

#### 당분해능에 의한 *N. gonorrhoeae*의 동정

*N. gonorrhoeae*의 동정을 위한 coagulatin 실험은 면역형광항체법과 당분해시험의 결과가 98%정도 일치함을 Barnham과 Gynn(1978)은 보고를 한 바 있다. 본 연구에서는 oxidase시험과 그람염색 결과에 의해 *N. gonorrhoeae*로 추정된 81개의 균주에 대하여 coagulatin 시험을 시행한 결과 81개 모두 양성반응을 나타냈다. 또한 이들 균주가 당분해 시험에서 양성을 보이기에 필요한 배양 시간을 조사한 바, 67개의 균주는 48시간 배양후에 glucose에서 산을 생성하였고, 10개의 균주는 72시간 배양 후에 산을 생성하였고, 나머지 4



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of plasmids in *Neisseria gonorrhoeae*

Lanes: 1. *N. gonorrhoeae* WHO-E,  
2. *N. gonorrhoeae* WHO-4  
3. *N. gonorrhoeae* PL-118  
4. *N. gonorrhoeae* CDC F-18  
OC: open circle DNA forms.



균주는 산을 생성하지 않았다 (Table 3). 따라서 *N. gonorrhoeae*의 당분해능에 의한 동정 시험은 임상미생물에 이용하기에는 너무 시간이 많이 걸리는 방법이라고 생각된다.

#### $\beta$ -lactamase 생산 *N. gonorrhoeae*의 조사

본 연구에서 분리한 81개의 균주를 황색인 Cefinase disc로  $\beta$ -lactamase 생산 시험을 한 결과 41개의 균주가 적색으로 디스크를 변색하여 양성 반응을 나타내었다. 김등(1983)의 보고에 의하면 특수직업여성의 경우 *N. gonorrhoeae* PL 균주의 검출율은 평균 25%였으나 지역별로는 서울의 경우 약 40%의 비율을 보인 반면, 부산에서는 6.7%의 비율을 인천에서는 25.6%의 비율을 나타내었다.

본 연구에서는 이보다 더 높은 50.6%이어서 그 비율이 더 높아졌음을 보였고, 따라서 이들 특정집단에 있어서는 임질의 치료에 penicillin G가 무효인 경우가 많을 것으로 생각된다.

#### *N. gonorrhoeae* plasmid DNA의 추출 및 전기영동

본 실험에서 분리한 *N. gonorrhoeae* PL118로 부터 추출한 plasmid DNA의 분자가 penicillin 저항성 균주인 WHO-4 중 어느 것과 유사한지를 비교하고자 전기 영동한 결과 이 균주는 2.6, 4.5, 24.5 Mdal의 plasmid DNA를 가진 *N. gonorrhoeae* WHO-4 형과 같은 것으로 나타났다 (Fig. 1).  $\beta$ -lactamase를 생성

Table 4. Plasmid patterns in *Neisseria gonorrhoeae* strains.

<i>N. gonorrhoeae</i> strains	No. of plasmids	Estimates of M. W. ( $\times 10^6$ daltons)
WHO-4	3	2.6, 4.5, 24.5
WHO-E	4	2.6, 3.2, 4.5, 24.5
PL-118	3	2.6, 4.5, 24.5
CDC F-18	2	2.6, 24.5

하는 *N. gonorrhoeae*의 분리가 처음으로 보고된 것은 1976년 영국과 미국에서였다 (Ashford 등, 1976; Phillips, 1976).

아프리카 지역으로부터 분리된 *N. gonorrhoeae* PL균은 2.6과 3.2 Mdal의 plasmids를, 아시아 지역에서 분리한 균은 2.6, 4.4, 24.5 Mdal의 plasmid DNA를 가지고 있는 것으로 보고되었으며 (Perin 등, 1977; Roberts와 Falkow, 1977), 본 실험에서는 2.6, 4.5와 24.5 Mdal의 plasmid DNA를 가지고 있는 것으로 나타났다. Einstein 등 (1977)은  $\beta$ -lactamase 생성에 관계하는 plasmid DNA는 4.5 Mdal의 plasmid DNA임을 보고하였고, Falkow 등 (1976)은 *N. gonorrhoeae*의 penicillin G 저항성은 장내세균의 R plasmid에서 유래되었다고 보고한 바 있는데 본 연구에서 분리한 plasmid 중에 분자량이 4.5 Mdal 짜리가 관찰되었다.

## 적 요

*N. gonorrhoeae* 81 균주를 320개의 가검물에서 분리동정한 후에 증식에 대한 VCN의 영향과 Isovitalex의 양에 따른 영향, 당분해능에 관한 실험과  $\beta$ -lactamase 생산균의 검출 및 plasmid 분리에 대하여 연구하였다. 전체 320개의 가검물 중에서 81 균주의 *N. gonorrhoeae*가 분리동정되었고, chocolate agar에서는 81 균주 중 72 균주가, 1% Isovitalex와 1% VCN을 함유한 Thayer-Martin 배지에서는 80 균주가, 2% Isovitalex와 1% VCN이 든 Thayer-Martin 배지는 55 균주가 *N. gonorrhoeae*의 특성을 나타냈다.

Coagglutination 시험에 양성인 81 균주 중에서 67 균주는 48시간 배양후에, 10 균주는 72시간 배양후에 glucose 배지에서 산을 생산하였으나, 나머지 4 균주는 96시간 배양후에도 산을 생산하지 않았다. 인천지역 특수직업여성에서 분리된 81 균주의 *N. gonorrhoeae* 중에서 41 균주가  $\beta$ -lactamase를 생산하였고, 그 중에서  $\beta$ -lactamase 생산 균주인 *N. gonorrhoeae* PL-118은 2.6, 4.5 및 24.5 Mdal의 plasmid DNA를 포함하였다.

## REFERENCES

- Ashford, W. A., R. G. Colash, and V. C. Hemming, 1976. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet. ii, 657-658.
- Barnham, M., and A. A. Glynn, 1978. Identification of clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* by a coagglutination test. J. Clin.