

한국에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 병원성에 관한 연구

이영희 · 정태화¹ · 이종삼

성신여대 이과대학 생물학과, ¹국립보건원

Virulence characters of *Yersinia enterocolitica* isolated in Korea

Lee, Y.H., T.H. Jung¹ and Lee, J.S.,

Department of Biology, College of Science, Sungshin Woman's University,
and National Institute of Health

ABSTRACT: In order to investigate the virulence of *Y. enterocolitica* isolated in Korea, all necessary experiments were done including several virulence determining tests—autoagglutination test, calcium-dependency test, HeLa cell invasion test, Serèny test, crystal violet binding test, and electrophoresis for plasmid pattern. The obtained results are as follows:

The virulent strains of *Y. enterocolitica* revealed positive reactions on autoagglutination test, calcium-dependency test, and crystal violet binding test, while the avirulent strains did not. A positive reaction was observed only at 37°C implying that the expression of virulence is temperature-dependent.

In Serèny test, the standard reference virulent strain (serotype 0:8) showed positive reactions while the virulent experimental strains (serotype 0:3, 0:9) revealed negative results, which indicates that the virulence of *Y. enterocolitica* in experimental animals varied according to their serotypes.

Most of the virulent strains contained 36-38Mdal plasmids, but the avirulent strains did not. In addition, it was noted that autoagglutination, calcium-dependency, and crystal violet binding were related to the presence of plasmids.

KEY WORDS: *Yersinia enterocolitica*, virulence characters.

*Yersinia enterocolitica*에 의한 감염은 소아에게는 가성 충수염 (Jepsen *et al.*, 1976; Chik *et al.*, 1978)과 설사를 동반하는 말단 회장염 (Chik *et al.*, 1978; Potnoy *et al.*, 1981)을 일으키고, 성인에게는 다발성 관절염 (Rabson *et al.*, 1975; Winblad *et al.*, 1975)과 패혈증 (Spira *et al.*, 1976; Bottone *et al.*, 1977; Portnoy *et al.*, 1981; Prpic *et al.*, 1983), 결절성 홍반 (Jansson *et al.*, 1968; 정 등, 1980) 등의 다양한 것이 알려져 있다.

이와 같은 질환을 일으키는 *Y. enterocolitica*의 병원성은 처음에는 생화학적 및 혈청학적인 시험을 기초로 시도되어 왔으나 이러한 특성만으로는 구분할 수 없기 때문에 외국에서는 이 세균의 병원성을 나타내는 인자에 관하여 많은 연구자들의 보고가 있었다. 즉 Laird와 Cavanaugh(1980)

는 Minimal Essential Medium (MEM)에서 36°C에 배양하였을 때 병원성인 균주는 자가응집반응을 나타냄을 보고하였으며, Schiemann과 Devenish(1981; 1982)는 칼슘이 결핍된 Magnesium Oxalate (MOX) 배지를 사용하여 병원성인 균주가 37°C에서 생육될 때 Ca²⁺을 요구하므로 MOX agar 배지상에서 병원성 균주는 생장이 억제된다고 하였으며, 또한 이들은 동시에 HeLa 세포 침투시험을 실시하여 세포의 세포질을 침투하는 균주와 Guinea pigs의 결막에 감염시켰을 때 결막염을 일으키는 균주를 각각 병원성 균주로 인정하였다.

Portnoy(1981), Prpic(1983), Bhaduri(1987) 등에 의하면 병원성인 균주는 40-45Mdal의 plasmid를 가지고 있었으며 이 plasmid가 자가응

집과 칼슘 의존성, crystal violet 결합에 관여한다고 하였다.

본 시험에서는 우리나라에서 분리한 *Y. enterocolitica*의 균주를 대상으로 이러한 관점에서 병원성 여부를 *in vivo* 및 *in vitro* 시험을 통하여 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

연세대 의료원과 한강성심병원에서 수집한 균주를 바로 생화학적 및 혈청학적으로 동정한 *Y. enterocolitica* 혈청형 0:3(803A, 817D, 838F, 851G, 852I, 855J, 855K, 8510L, 8611M, 873N) 10주와 혈청형 0:9(803B, 806C, 838E, 852H, 875O, 875P) 6주를 실험균주로 사용하였으며 표준균주로는 *Y. enterocolitica* 혈청형 0:8(ATCC 27729)을 함께 사용하였다.

자가응집 시험

균주를 Tryptic Soy Agar(TSA) (DIFCO)상에 접종하여 25°C에서 48시간 배양한 다음 잘 분리된 집락중에서 약 다섯 집락을 임의 선택하여 생리 식염수에 현탁시킨 후 한 백금이를 10% fetal calf serum이 함유된 MEM(GIBCO) 2ml이 들어있는 시험관에 한 균주당 2번씩 각각 접종하였다. 접종한 시험관중 하나는 25°C에서 다른 시험관은 37°C에서 18시간 배양하여 나타난 자가응집 반응을 관찰하였다. 세균이 자가응집을 일으켜서 시험관 밑에 침전물을 형성하여 상등액이 맑은 것을 양성으로, 시험관 전체로 현탁되어 증식되는 것을 음성으로 정하였다.

칼슘 의존성(calcium dependency) 시험

균주를 TSA상에 접종하여 25°C에서 48시간 배양한 다음 잘 분리된 집락을 생리 식염수로 부유시켜 생균수가 10^8 cells/ml되게 조정한 후 0.1ml을 취하여 Ca^{2+} 이 결핍된 MOX agar(Higuchi and Smith, 1961) 평판에 한 균주당 2매씩 각각 접종하였다. 평판중 하나는 25°C에서 다른 평판은 37°C에서 48시간 배양하여 그 집락수를 관찰하였는 바, 25°C에서 많은 집락수를 나타내었으나 37°C에서는 집락이 억제되어 약간의 생육을 보였을 때 양성으로, 25°C나 37°C에서 집락수가 거의

비슷하게 나타났을 때는 음성으로 정하였다.

HeLa 세포 침투시험

세포배양: HeLa 세포는 국립보건원 병독부에서 분양받아서 Earle's-MEM(GIBCO) 용액에 10% fetal bovine serum, penicillin G(100 unit/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)을 각각 첨가시켜 5% CO₂를 통기하면서 37°C에서 48시간 배양하였다. 이들 HeLa 세포를 trypsin으로 처리한 후 cover slide가 부착된 직경 60mm의 petri dish에 세포수가 2×10^6 cells/ml이 되도록 E-MEM으로 조정하여 다시 18시간 배양한 후 단층이 형성된 세포에 항생제가 함유되어 있지 않는 E-MEM(AF-EMEM)으로 세균을 감염시키기 직전에 3회 세척하였다.

세균배양: 균주를 0.3% agar가 첨가된 TSA 평판상에 접종하여 25°C에서 48시간 배양한 다음 분리된 집락을 다시 TSA 평판에 재접종하여 25°C에서 24시간 배양하였다. 여기서 분리된 집락을 AF-EMEM으로 부유시켜 3×10^6 cells/ml되게 희석하였다.

세포감염: 단층이 형성된 HeLa 세포에 준비된 세균 희석액으로 감염시켜 36°C에서 90분 동안 배양한 후 배양된 세포를 Earle's balanced salt solution(EBSS)으로 3회 세척한 후 gentamicin(20 µg/ml)이 함유되어 있는 E-MEM으로 갈아준 다음 3시간 동안 배양하였다. 이와같이 배양된 세포를 다시 EBSS로 3회 세척하고 이어 생리 식염수로 다시 3회 세척하였다.

염색: 세척한 세포를 methanol:acetic acid(3:1, v/v)의 혼합물로 cover slide 위에 부착되어 있는 세포층을 5분간 고정한 다음 Giemsa solution으로 1시간 염색시켰다. 이를 95% ethanol로 탈색시켜 건조시킨 후 염색된 세포를 광학 현미경으로 관찰하여 세균이 세포에 침투한 균주를 양성으로, 침투하지 못한 균주를 음성으로 판정하였다.

Crystal violet 결합시험

균주를 brain heart infusion(BHI) broth(DIFCO)에 접종하여 25°C에 210 rpm/min으로 18시간 진탕 배양한 다음 그 배양액을 생리 식염수로 10^8 cells/ml되게 조정하여 BHI agar 평판에 한 균주당 2매 접종하여 평판중 하나는 25°C에서

다른 하나는 37°C에 각각 30시간 배양하였다. 이들 세균이 배양된 집락위에 crystal violet (85 µg/ml) (DIFCO) 용액 8 ml을 천천히 부어넣어 2분 동안 방치한 다음 이 용액을 쏟아버린 후 15분 이내에 해부 현미경(×7)으로 집락형태를 관찰하였다(Fig. 2). 배양된 집락이 crystal violet와 결합되어 흑자색을 나타내는 균주를 양성, 흰색을 나타내는 균주를 음성으로 판정하였다.

Serèny 시험

Tryptic soy broth에 균을 접종하여 25°C에서 18시간 110 rpm/min으로 진탕 배양시킨 후 이를 3,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 생리 식염수로 희석하여 생균수가 2×10⁹ cells/ml 되도록 조정하였다. 이들 균액을 한 균주당 Guinea pig (Hartley) 두 마리를 사용하여 한쪽 눈에 각각 25 µl씩 접종한 다음 눈을 가볍게 문질러 준 후 1주일 동안 관찰하여 각결막염을 일으키는 균주를 양성, 그동안 증상을 나타내지 않는 균주를 음성으로 판정하였다.

Plasmid 분리 및 전기영동

Plasmid는 Kado와 Liu(1981)의 방법으로 분리하여 0.7% agarose slab gel(140×115×5 mm)을 사용하여 tris borate buffer(89 mM tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0)에서 100V에 3시간 전기영동하였다. 분리된 plasmid DNA band는 0.5 µg/ml의 ethidium bromide로 염색하여 자외선(366 nm)하에서 관찰하였다.

결 과

실험균주중 *Y. enterocolitica* 803A, 806C, 817D, 838E, 838F, 851G, 852H, 852I, 855J, 855K, 8510L, 8611M, 873N 등 13주는 자가응집 시험에서 양성반응을, 균주 803B, 875O, 875P 등은 음성반응을 나타내었다(Table 2).

또한 칼슘 의존성 시험에서도 자가응집 시험에서 양성반응을 나타낸 균주가 칼슘이 결핍된 MOX agar에서 37°C에 배양했을 때 집락이 억제되어 양성반응을 나타내었으며 반면에 자가응집 시험에서 음성반응을 나타낸 균주는 억제되지 않고 25°C나 37°C에서 비슷한 집락수(Table 1)를

Table 1. Colony counts of virulent and avirulent strains *Y. enterocolitica* grown on the magnesium oxalate media

Strain	Number of colonies	
	37°C	25°C
St27729	3	139
803A	1	166
806C	4*	145
817D	2	143
838E	4*	133
838F	0	165
851G	2	140
852H	6*	140
852I	1	132
855J	2	131
855K	1	113
8510L	1	149
8611M	2	142
873N	1	134
803B	135	120
875O	133	121
875P	144	126

* Pinpoint colonies

나타내어 음성반응을 보였다.

HeLa 세포 침투시험 결과는 Table 2에 표시된 바와 같이 모든 균주들이 자가응집 시험과 칼슘 의존성 시험에서 양성반응을 나타낸 균주는 물론 음성반응을 나타낸 균주들도 HeLa 세포내로 침투하여 양성반응을 나타냈으며, 처음에는 세포질 표면에 일정 방향으로 세균이 달라붙기 시작하여 시간이 경과함에 따라 세균은 2분열로 증식하여 점점 세균수가 많아지면서 세포질내 전체로 증식되어 핵부위까지 세균이 침투하는 것을 볼 수가 있었다(Fig. 1).

Crystal violet 결합 시험 성적은 37°C에서 배양시킨 실험균주중 자가응집 시험 및 칼슘 의존성 시험에서 양성반응을 나타낸 균주의 집락이 crystal violet와 결합되어 흑자색 집락으로 양성을 나타냈으며, 자가응집 시험 및 칼슘 의존성 시험에서 음성반응을 나타낸 균주의 집락은 흰색집락으로 양성을 나타내었다(Fig. 2, Table 2).

Serèny 시험에서는 균주 838F, 851G가 Guinea

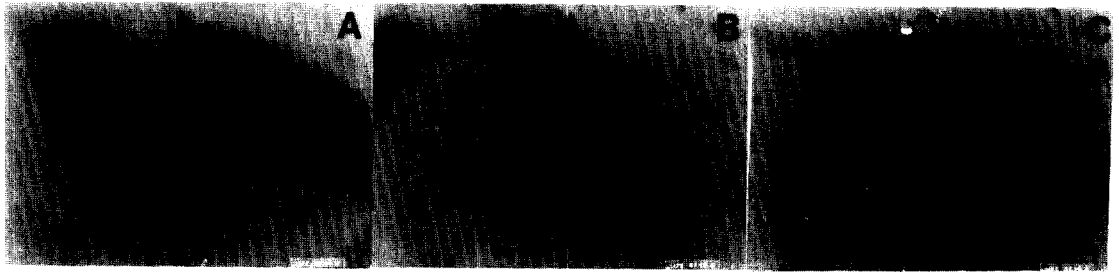


Fig. 1. Photomicrographs of HeLa cells invaded by *Y. enterocolitica* when the cells were grown at 25°C.
 A) X1000: negative control strain. B) X1000: positive reaction strains, Invaded in the cytoplasm of HeLa cell and multiply by binary fission. C) X1000: positive reaction strains, spread into the cytoplasm of HeLa cells.

Pig 두 마리중 한 마리에서 균접종 2일에 눈주위가 부풀고 염증을 나타내기 시작하였으나 이러한 증상을 더 이상 진행되지 않고 회복되어 매우 경미하였으며, 표준균주는 Guinea pig 두 마리 모두가 균접종 3일부터 눈주위가 부풀어 오르면서 점액농이 생겨 지저분하였는데 이러한 증상은 7일간 계속되었다. 그외의 균주들은 균접종 3일에 눈주위가 약간 부풀고 함몰되는 것을 볼 수 있었으나 곧 회복되어 다른 증상은 관찰되지 않았다.

plasmid를 분리하여 전기영동한 결과는 Table 2와 Fig. 3에 나타내었다. Table 2에 표시된 바와 같이 실험균주 803A, 806C, 817D, 838E, 838F, 851G, 852H, 852I, 855J, 855K, 8510L, 8611M, 873N 등 13주는 모두 36-38Mdal의 plasmid를 갖고 있었으나 균주 803B, 875O, 875P 등 3주는 plasmid를 갖고 있지 않았다. 또한 이 plasmid를 가지고 있는 균주는 자가응집 및 칼슘 의존성, crystal violet 결합 시험에서 양성반

Table 2. Summary of virulence properties of the strains of *Y. enterocolitica*

Strain	Serotype	AA ^a	CAD ^b	CV ^c binding	Tissue culture invasion	Serèny test*	Plasmid (36 to 38 megadalton)
St27729	0:8	+	+	+	+	+ / +	+
803A	0:3	+	+	+	+	- / -	+
806C	0:9	+	+	+	+	- / -	+
817D	0:3	+	+	+	+	- / -	+
838E	0:9	+	+	+	+	- / -	+
838F	0:3	+	+	+	+	+ / -	+
851G	0:3	+	+	+	+	+ / -	+
852H	0:9	+	+	+	+	- / -	+
852I	0:3	+	+	+	+	- / -	+
855J	0:3	+	+	+	+	- / -	+
855K	0:3	+	+	+	+	- / -	+
8510L	0:3	+	+	+	+	- / -	+
8611M	0:3	+	+	+	+	- / -	+
873N	0:3	+	+	+	+	- / -	+
803B	0:9	-	-	-	+	- / -	-
875O	0:9	-	-	-	+	- / -	-
875P	0:9	-	-	-	+	- / -	-

^aAA, Autoagglutination, ^bCAD, Calcium dependence, ^cCV, Crystal violet
 * GPC in animal No. 1/animal No. 2

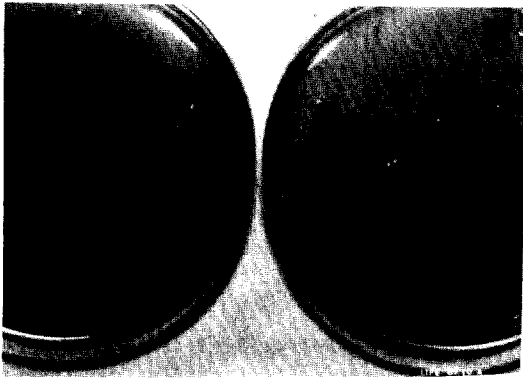


Fig. 2. Binding of crystal violet to colonies of *Y. enterocolitica* when cells were grown on BHI agar at 37°C.

A) Avirulent strains, showing white colonies. B) Virulent strain, showing darkviolet colonies.

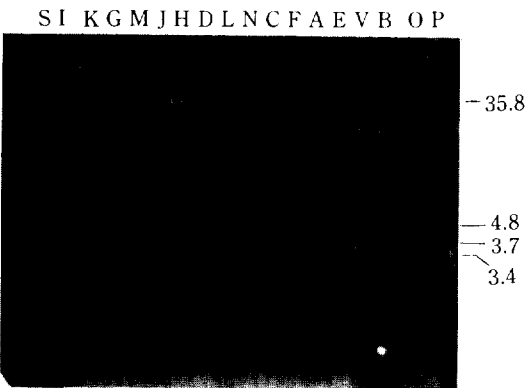


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from strains of *Y. enterocolitica*.

(S) Standard strain. (I,K,G,M,J,H,D,L,N,C,F,A, E) Virulent strains. (B,O,P) Avirulent strains, (V) Molecular mass standards *E. coli* V517.

응을 나타내었으나 plasmid를 갖고 있지 않는 균주는 음성반응으로 나타내어 plasmid 유무와 관련이 있음을 알 수가 있었다.

고 찰

*Y. enterocolitica*는 Hässig에 의해 1949년 패혈증 환자에서 분리된 이후 1966년까지는 주로 북부 유럽에서 보고가 있었을 뿐 드문 감염으로 생각되었다. 그 후 이 감염은 캐나다, 미국, 아프리카, 일본 등 세계도처에서 보고되었고, 그 감염에 1977년까지는 6,000예를 넘게 되어 중요한 세

균감염의 하나로 인정하기에 이르렀다(Kahl S, 1979). 우리나라의 경우에는 1980년 정 등이 4예의 장염환자에게서 *Y. enterocolitica*를 분리한 예를 보고한 바 있었으며, 그 후로 분리수가 점차 증가됨에 따라 이 세균의 감염에 대해 관심을 갖게 되었다.

*Y. enterocolitica*의 병원성과 비병원성 균주를 구분하는 방법으로 Laird와 Cavanaugh(1980)는 우연히 조직배양 배지인 MIM에서 36°C에 배양된 균주가 자가응집을 일으키는 것을 관찰하였던 바, 이 균주를 성숙한 쥐에 먹어 보았더니 병원성을 나타내는 반면에 자가응집을 일으키지 않는 균주는 병원성을 나타내지 않는 것을 알았다. 그 후부터 자가응집 시험은 Yersina속의 병원성과 비병원성 균주를 구분하는데 간편한 시험으로서 널리 사용하게 되었다. Smith 등(1980)은 주로 혈청형 0:3과 0:8이 자가응집 시험에서 양성반응을 나타내며 mouse에게도 병원성을 일으킨다고 보고하였으나 Schiemann 등(1981)은 자가응집 시험에서 양성반응을 나타내는 균주가 혈청형 0:3과 0:8에 국한되어 있는 것이 아니라 혈청형 0:9, 0:4, 32, 0:5, 27, 0:21인 균주도 양성을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구의 경우 자가응집 시험에서 양성반응을 나타낸 균주가 혈청형 0:3이 10주, 0:9가 3주였으며 음성반응을 나타낸 균주가 3주 모두 혈청형 0:9로서 위의 보고자들과 비교하여 볼 때 어느 정도 일치함을 알 수 있었다.

칼슘 의존성 시험은 Higuchi와 Smith(1961)에 의하면 병원성이었던 *Y. pestis*가 37°C에서 액체 배양시키는 동안에 신속히 병원성을 잃어 비병원성 균주로 변화되는 것에 관심을 가지고 시험한 결과 병원성 균주는 37°C에서 성장할 때 Ca²⁺을 요구한다는 것을 알았다. 따라서 이들은 Ca²⁺이 결핍된 배지인 MOX agar를 고안하여 시험에 사용하였는 바 병원성과 비병원성 균주를 분리하는데 좋은 성과를 얻었다. 그 후로 칼슘 의존성 시험은 *Y. enterocolitica*에도 적용되어 병원성 여부를 결정하는 인자로서 많이 사용되어 왔다. 본 연구에서도 37°C에서 자가응집 시험에 양성반응을 나타낸 균주가 칼슘 의존성 시험에도 역시 양성반응을 나타내어 다른 보고자들과 비슷한 성적을 얻었다.

*Y. enterocolitica*의 계대 세포주에 대한 세포

침투 능력은 Lee 등(1977)에 의해 처음으로 수행되었는데, 이들은 사람에게 전형적인 임상증상을 나타낸 균주는 HeLa 세포에 감염되었으나 환경원 식품에서 분리한 균주는 HeLa 세포에 감염되지 않았음을 보고하여 병원성을 증명하고자 하였으며, Schiemann 등(1982)도 HeLa 세포를 이용하여 시험하였던 바, 대부분의 HeLa 세포에 침투된 균주가 자가응집 및 칼슘 의존성 시험에서 양성반응을 나타냄을 알았다. 그러나 약간의 균주중에서 자가응집과 칼슘 의존성 시험에 음성반응을 보인 균주가 HeLa 세포 감염에 양성반응을 나타내는 것을 볼 수 있었는데, 이런 결과는 본 연구와 비슷한 결과로서 Table 2에서 표시된 바와 같이 균주 803B, 875O, 875P 등 3주가 자가응집과 칼슘 의존성 시험에서 음성반응을 나타내었으나 HeLa 세포 침투에 양성반응을 나타내었다. 이와같은 현상은 Gemski(1980) 등에 의하면 자가응집과 칼슘 의존성의 특성은 42.2 ± 1.1 Mdal의 plasmid가 관여하며, plasmid가 없는 균주는 이 두가지 특성을 모두 잃어버렸으나 HeLa 세포 침투에는 아무 변화가 없었다고 하였으며, Portnoy 등(1981)도 사람의 상피세포를 사용한 세포침투 시험에서 plasmid가 관여하지 않는 것을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 plasmid를 분리해본 결과 자가응집 및 칼슘 의존성 시험에서 음성반응을 나타낸 균주가 모두 plasmid를 가지고 있지 않았음을 확인할 수 있었으므로 HeLa 세포 침투시험만으로 병원성 균주를 구분하기에는 무리가 있는 것으로 여겨진다.

*Y. enterocolitica*의 병원성 여부를 *in vivo*에서 알아보는 방법으로는 Guinea pig의 결막을 이용한 시험(Sereny, 1955)과 성숙된 쥐에게 경구적으로 감염시켜 설사 여부를 알아보는 방법 및 복강내 감염시켜 치사율을 알아보는 방법 등이 널리 사용되어 왔다. Schiemann 등(1981)은 Guinea pig에 결막염을 일으키며 mouse에게 설사를 일으키는 균주가 병원성이 있으며, HeLa 세포 감염과 자가응집, 칼슘 의존성 시험에도 각각 양성반응을 나타냈음을 보고하였으며, Zink 등(1980)도 41 Mdal의 plasmid를 가지고 있는 균주만이 Guinea pig에 결막염을 일으킨다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 Guinea pig를 사용하여 시험한 결과

Table 2에 나타난 바와 같이 표준균주는 Guinea pig 두 마리 모두 결막염을 일으켰으나 실험균주는 838F, 851G 등 2주만이 Guinea pig에 접종후 2일에 각각 경미한 증상을 나타냈을 뿐 그 외에 균주들에게서는 표준균주가 보인 것과 같은 증상을 관찰할 수가 없었다. 이런 시험결과는 Aulisio 등(1983)이 보고한 것과 유사하였는데, 즉 42-44 Mdal의 plasmid를 가지고 있는 균주(혈청형 0:3, 0:4, 32, 0:8, 0:9, 0:13, 7, 0:21)를 대상으로 Guinea pig와 mouse를 사용하여 Serèny 시험을 한 결과 혈청형 0:8만이 Guinea pig와 mouse에 모두 결막염을 일으켰으며, 혈청형 0:4, 32, 0:13, 7, 0:21 등은 mouse에만 결막염을 나타내었다. 그러나 혈청형 0:3과 0:9인 모든 균주는 Guinea pig 및 mouse Serèny 시험에 음성반응을 나타낸 것을 볼 때 병원성 plasmid를 가지고 있는 균주라 할지라도 혈청형에 따라 실험동물에서 다르게 발현됨을 알 수가 있으며, 본 연구에서 분리된 모든 균주가 혈청형 0:3과 0:9임을 감안할 때 Guinea pig Serèny 시험만으로는 병원성 균주를 구분하기에는 무리가 있었으며, 앞의 연구 결과들을 미루어 볼 때 더 많은 균주에 대하여 검토되어야 한다고 생각된다.

*Y. enterocolitica*의 병원성을 구분하는 다른 방법의 하나로 최근 Bhaduri 등(1987)에 의해 crystal violet 결합시험이 고안되었다. 즉 plasmid를 가지고 있는 균주는 37°C에서 분리된 집락이 crystal violet와 결합되어 흑자색 집락을 나타내는 반면에 plasmid를 가지고 있지 않는 균주는 흰색 집락을 나타내었다. 그러나 25°C에서 분리된 집락에서는 plasmid에 관계없이 모두 음성을 나타내었다. 본 연구에서도 crystal violet 결합 시험을 실시한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 plasmid를 가지고 있는 균주는 crystal violet 결합 시험에서 양성반응을 나타냈으며, plasmid를 가지고 있지않는 균주는 음성으로 나타났다. 그러나 25°C에서는 모든 균주가 음성반응을 나타내어 Bhaduri 등(1987)이 보고한 것과 같은 결과를 얻었다. 이와같이 37°C에서만 양성반응을 나타내는 성상은 자가응집 및 칼슘 의존성 시험에서도 같은 결과로서, *Y. enterocolitica*와 관련되어 있는 병원성의 특성은 37°C에서 배양시켰을 때 표현됨을

알 수가 있었다. 또한 Bhaduri 등(1987)에 의하면 37°C에서 crystal violet와 결합되는 이유는 plasmid를 가지고 있는 균주, 즉 병원성 세균이 37°C에서 배양되었을 때 세균표면에 구성된 어떤 성분(cell surface component)에 의해 crystal violet 결합이 촉진되며 이러한 세포표면 구성성분은 밝혀져 있지 않다고 하였다. Portnoy(1981) 등도 *Y. enterocolitica*의 병원성 특성이 온도에 의존되는 것에 관심을 가지고 연구한 결과, plasmid를 가지고 있는 균주를 37°C에서 액체배양하였을 때 세균형태가 사슬을 이루고 있었으나 25°C에서 배양시킨 균주는 사슬을 이루지 않고 개개의 세포로 이루어져 있었으며, plasmid를 가지고 있지 않는 균주를 25°C, 37°C에서 각각 배양시켰을 때 온도와 관계없이 개개의 세포들로 이루어져 있음을 알았다. 따라서 이들은 plasmid를 가지고 있으며 37°C에서 배양시킨 균주가 25°C에서 배

양시킨 균주보다 최소한 3가지의 다른 polypeptide의 band를 가지고 있음을 알 수가 있었다. 그러나 cure시킨 균주는 온도에 관계없이 동일한 band를 나타내었다고 하였다. 이러한 시험결과들을 종합해 볼 때에 *Y. enterocolitica*의 병원성은 plasmid가 관여하는 것을 알 수 있으며 plasmid의 표현은 온도에 의존된다는 것을 알 수가 있었다. 그러나 plasmid가 완전하게 병원성을 결정하는 조절작용에 어떤 역할을 하는지는 아직 알려지지 않았으며 앞으로 이 분야에 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

우리나라에서 분리한 *Y. enterocolitica* 16주의 plasmid 패턴은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 병원성 균주로 추정된 균주 모두가 36-38 Mdal의 plasmid를 가지고 있었으며, 비병원성 균주로 추정된 균주는 plasmid를 가지고 있지 않았다.

적 요

한국에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 병원성 여부를 조사하기 위하여 자가응집 시험, 칼슘 의존성 시험, HeLa 세포 침투시험, Serény 시험, Crystal violet 결합시험과 plasmid의 전기영동을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

병원성 *Y. enterocolitica*는 자가응집, 칼슘 의존성, crystal violet 결합시험에서 양성반응을, 비병원성 균주는 음성반응을 각각 나타내었다. 그러나 양성반응은 37°C에서만 나타나 병원성의 발현이 온도에 의존됨을 알 수가 있었다.

Serény 시험에서 혈청형 0:8인 표준균주만이 양성반응을 보인 반면에 혈청형 0:3, 0:9인 실험균주들은 대부분 음성반응을 나타내어 *Y. enterocolitica*의 병원성은 혈청형에 따라 실험동물에서 다르게 발현됨을 알 수가 있었다.

HeLa 세포 침투시험에서 실험균주 모두가 양성반응을 보여 병원성 균주를 구분하기에는 부적합하였다.

대부분의 병원성 균주는 36-38 Mdal의 plasmid를 가지고 있었으나 비병원성 균주는 없었으며, plasmid가 자가응집 및 칼슘 의존성, crystal violet 결합에 관여함을 알 수가 있었다.

REFERENCES

1. Aulisio, C.C.G., Hill, W.E., Stanfield, J.T. Jr., and Sellers, R.L., 1983. Evaluation of virulence factor testing and characteristics of pathogenicity in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **40**: 330-335.
2. Bottone, E.J., 1977. *Yersinia enterocolitica* panoramic view of a charismatic microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.* **5**: 211-241.
3. Chik, H. Pai and Vara Mors, 1978. production of Enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **19**: 908-911.
4. Gemski, P., J.R. Lazere, and T. Casey, 1980. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **27**: 682-685.
5. Higuchi, K., and J. Smith, 1961. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of mutation rate by avirulence. *J. Bacteriol.* **81**: 605-608.
6. Jansson, E., Wallgren, G.R. and Ahvonen, P., 1968. *Yersinia enterocolitica* as a cause of acute mesenteric lymphadenitis. *Acta. Paediat. Scand.* **57**: 448-450.

7. Jepsen, O.B., B. Korner, K.B., Lauritsen, A. Hancke, L. Andersen, S. Henrichsen, E. Brenoe, P.M. Christiansen, and A. Johansen, 1976. *Yersinia enterocolitica* infections in patients with acute surgical abdominal disease. *Scand. J. Infect. Dis.* **8**: 189-194.
8. 정운섭, 이혜주, 이삼열, 강진경, 문영명, 1980, 성인 장염 환자에서의 *Y. enterocolitica* 분리 3예, 대한미생물학회지. **15**: 3~8.
9. Kado, C.I., and Liu, S.T., 1981. Raid procedure for Detection and Isolation of Large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
10. Kohl, S., 1979. *Yersinia enterocolitica* infections in children. *Pediatr. Clin. North Amer.* **26**: 433-443.
11. Laird, W.J., and D.C. Cavanaugh, 1980. Correlation of autoagglutination and virulence in *Yersinia* spp. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 430-432.
12. Lee, W.H., P.P. Mcgrath, P.H. Carter, and E.L. Eide, 1977. The ability of some *Yersinia enterocolitica* strains to invade HaLa cells. *Can. J. Microbiol.* **23**: 1714-1722.
13. Portnoy, D.A., S.L. Moseley, and S. Falkow, 1981. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect. Immun.* **31**: 775-782.
14. Prpic, J.K., R.M. Robins-Browne, and R.B. Davey, 1983. Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using congo red agar. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 486-490.
15. Rabson, A.R., A.F. Hallett, and H.J. Koornhof, 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* **131**: 447-451.
16. Saumya Bhaduri, Lucille K. Conway, and R. Victor Lachica, 1987. Assay of crystal violet Binding for Rapid Identification of virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1039-1042.
17. Schiemann, D.A., and Devenish, J.A., and Toma, S., 1981. Characteristics of virulence in Human Isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **32**: 400-403.
18. Schiemann, D.A., and Devenish, J.A., 1982. Relationship of HeLa cell Infectivity to Biochemical, Serological and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **35**: 497-506.
19. Serény, B. 1955. Experimental Shigella Keratoconjunctivitis. *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **2**: 293-296.
20. Spira, T.J., and S.A. Kabins, 1976. *Yersinia enterocolitica* Septicemia with septic arthritis. *Arch. Intern. Med.* **136**: 1305-1308.
21. Winblad, S., 1975. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infections. *Scand. J. Infect. Dis.* **7**: 191-195.
22. Zink, D.L., J.C. Feeley, J.G. Wells, C. Vanderzant, J.C. Vickery, and G.A. O'Donovan, 1978. Possible plasmid-mediated virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Trans. Gulf. Coast. Mol. Biol. Cont.* **3**: 155-163.

(Received: April 18, 1988)