

국내 돼지와 개에서 분리된 *Yersinia*속균의 병독성 관련 plasmid

최원필* · 이헌준 · 정석찬**

경북대학교 수의과대학* · 충남대학교 수의학과

농촌진흥청 가축위생연구소**

(1989. 1. 30 접수)

Virulence-associated plasmids of *Yersinia* species isolated from pigs and dogs in Korea

Won-pil Choi,* Hun-jun Lee, Suk-chan Jung**

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University*

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University

Veterinary Research Institute, Rural Development Administration**

(Received Jan 30, 1989)

Abstract: Nine strains of *Yersinia* species isolated from pigs and dogs in Korea, comprising 5 strains of *Yersinia enterocolitica*, 2 strains of *Y kristensenii* and each strain of *Y pseudotuberculosis* and *Y intermedia*, were examined for the presence of virulence-associated plasmids, calcium dependency and provocation of guinea pig conjunctivitis(Serény test).

Three strains of *Y enterocolitica* isolated from pigs were positive in calcium dependency and harbored one plasmid of about 45 megadalton, but negative in Serény test.

Key words: virulence-plasmid, *Yersinia*.

서 론

Yersiniosis는 *Yersinia*(*Y*)속균 중에서 *Y enterocolitica*와 *Y pseudotuberculosis*에 기인되는 감염증을 말하며, 이 균들은 동물에서는 비장과 간에 결핵양결절, 유산, 장염, 장간막임파절염 및 패혈증을 일으키며, 사람에서는 급성위장염, 가성충수염, 말단회장염, 장간막임파절염, 수막염 및 패혈증 등의 다양한 임상형을 유발시킨다.¹⁻³

*Yersinia*속균의 병독성관련특성에는 V와 W항원산생⁴, calcium의존성⁵, HeLa cell침투성⁶, 자가응집성⁷, 정상인의 혈청에 대한 저항성⁸, Congo red흡수성⁹, guinea pig의 결막염유발능(Serény test)¹⁰등이 있고, 이러한 특성들은 40~50 megadalton(Md) plasmid

DNA의 보유유무와 밀접한 관련이 있어서 이 plasmid가 *Yersinia*속균의 병독성을 매개하는 것으로 인정되고 있다.⁵⁻¹⁰

한편 *Yersinia*속균은 자연계에 널리 분포되어있고, 각 종 동물의 분변^{11,12}, 육, 우유, 유제품 등의 식품¹³에서 분리되고있으며, 특히 동물은 사람의 주요 감염원으로 추측되고 있다.³ 따라서 이들로부터 분리한 *Yersinia*속균의 병독성관련특성의 증명과 plasmid의 검출은 공중보건학적 및 역학적 측면에서 매우 중요하다.

이 연구는 국내의 돼지와 개에서 분리한 *Yersinia*균주에 대하여 병독성관련 plasmid의 보유유무, calcium의존성 및 Serény test를 실시하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 : 成과 崔¹³가 1985년 3월부터 1986년 2월까지 대구, 경북지역의 돼지와 개에서 분리하여 계대보존하고 있는 *Yersinia*균주 중 *Y enterocolitica* 5주, *Y kristensenii* 2주, 그리고 *Y intermedia*와 *Y pseudotuberculosis* 각 1주를 공시하였다. 또한 일본 북해도 대학교 수의학부 수의공중위생학교실의 Kaneko박사로부터 분양받은 *Y enterocolitica* 1주를 대조균주로 사용하였다(Table 1).

Calcium 의존성 : Higuchi와 Smith¹⁴의 방법에 따라 blood agar base를 기초로 한 magnesium oxalate agar (MOX)를 사용하였다. 공시균주는 2매의 MOX평판배지에 접종하여 각각 37°C와 25°C에서 48시간 배양하였으며, 동일균주를 blood agar base평판배지에 접종하여 대조하였다.

Serény test : Gemski et al⁵의 방법에 따라 blood agar평판배지에서 25°C, 48시간 배양한 공시균주를 생리식염에 1×10^{10} cells/ml되게 집균하여, 성숙한 숫컷 guinea pig의 결막낭에 접종한 후, 결막엽의 형성유무를 7일간 관찰하였다.

Plasmid DNA의 분리 : Maniatis et al¹⁵의 alkaline lysis방법으로 plasmid DNA를 분리하였다. 공시균주를 Luria-Bertani broth 5ml에 37°C, 일야 진탕배양하여 15,000rpm으로 5분간 원심분리한 후, 침전된 균체를 GET solution(50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-Cl, pH 8.0) 100 μ l에 부유하고 lysing solution(0.2N NaOH, 1% SDS) 200 μ l와 potassium acetate solution(5M potassium acetate 60ml, glacial acetic

Table 1. *Yersinia* strains used in this study

Strain	Serotype/Biotype	Source
YE 52	0 : 3/3B	Pig
YE 614	0 : 3/3B	Pig
YE 710	0 : 3/3B	Pig
YE 913	0 : 3/3B	Pig
YE 1310	0 : 3/3B	Dog
Y P 133	—	Dog
Y K 510	—	Pig
Y K 512	—	Pig
Y I 18	—	Pig
Control YE	0 : 9/2	—

YE; *Yersinia enterocolitica*,
 YP; *Y pseudotuberculosis*,
 YK; *Y kristensenii*, YI; *Y intermedia*.

acid 11.5ml, H₂O 28.5ml, pH 4.8) 150 μ l를 가하여 얼음에 5분간 방치하였다. 이것을 원심분리하여 동량의 phenol/chloroform을 가한 후 원심분리하고 2배 용량의 ethanol을 가하여 plasmid DNA를 원심침전 후 전기영동 재료로 사용하였다.

Agarose gel 전기영동 : 분리된 plasmid DNA의 전기영동은 0.7% agarose gel에서 120V, 3시간 전개하였으며, 분자량은 *Escherichia coli* V517을 marker로 이용하여 측정하였다.

결 과

국내의 돼지와 개에서 분리된 *Yersinia*균주에 대하여 병독성 유무를 조사하고자, calcium의존성, Serény test 및 병독성관련 plasmid의 검출을 시도하였던 결과는 Table 2와 같다.

공시한 *Yersinia*속균 9주 중 돼지에서 분리된 *Y enterocolitica* 혈청형 0 : 3, 생물형 3B인 YE 52, YE 710 및 YE 913은 calcium 의존성이 있었고 Fig 1과 같이 분자량이 약 45Md인 1개의 plasmid만을 보유하고 있었다. 그러나 Serény test에는 3주 모두 음성이었다.

반면에 개에서 분리된 YE 1310과 YP 133 그리고 돼

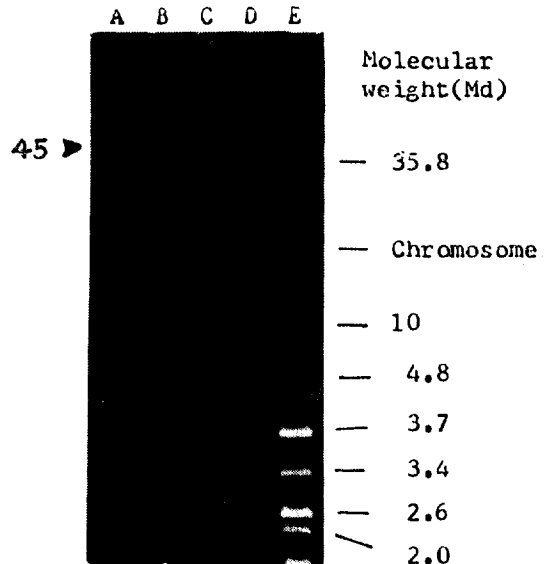


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from *Y enterocolitica* isolated from pigs. A; control strain, *Y enterocolitica* serotype 0 : 9 biotype 2, B, C, D; three isolates of *Y enterocolitica* serotype 0 : 3 biotype 3B, E; Molecular marker, *E coli* V517.

Table 2. Virulence-associated characteristics of *Yersinia* strains isolated from pigs and dogs

Strain	Calcium dependency	Serény test	Harboring plasmid
YE 52	+	—	+
YE 614	—	—	—
YE 710	+	—	+
YE 913	+	—	+
YE 1310	—	—	—
Y P 133	—	—	—
Y K 510	—	—	—
Y K 512	—	—	—
Y I 18	—	—	—
Control YE	+	—	+

Abbreviations: see Table 1.

지에서 분리된 YE 614, YK 510, YK 512 및 YI 18은 calcium의존성이 없었고 Serény test에 음성이었으며, plasmid도 보유하고 있지않았다(Table 2).

고 찰

Yersiniosis를 일으키는 *Y enterocolitica*와 *Y pseudotuberculosis*는 동물병원균으로 알려져왔고, 사람에게 대하여는 1960년대까지는 보고 예가 드물었다. 그러나 그 후 세계 여러지역에서 이 균들에 기인된 감염보고가 급증되어 사람의 주요 병원균으로 인정하게 되었으며 지금은 인수공통감염균으로 중요시 되고 있다.¹⁶⁻¹⁹

국내에서도 1980년 이후 이 균들에 의한 소아와 성인의 위장관염, 요로계감염 및 패혈증이 보고되어 있으며 이 감염증의 증가를 우려하고 있다.²⁰⁻²⁵

한편 동물의 경우, 威과 崔¹²가 돼지, 경북지역 돼지의 분변(7.0%)과 맹장내용물(3.5%), 그리고 개의 맹장내용물(1.5%)에서 *Yersinia*속균의 분포를 규명하였으며, 또한 이들은, 분리된 *Y enterocolitica* 138주 중 사람에게 병원성이 인정되고있는 혈청형 0:3(68.8%), 0:5(5.1%), 0:8(9.4%) 및 0:9(4.4%)가 주류(87.7%)를 이루고 있어 공중보건학적 견지에서 국내동물에 대한 연구의 필요성을 강조한 바 있다.

*Yersinia*속균의 병원성기전에 관하여 아직까지 완전히 규명되어있지는 않으나, 병독성에 관한 연구는 많이 이루어져 있다. 즉 *Yersinia*속균 중 병원성균으로 알려진 혈청형 및 생물형의 모든 균주가 병독성을 가지고있는 것이 아니라, 40~50Md plasmid를 보유하고

있는 균주가 실험동물에서 병원성이 인정되었고, 이 plasmid를 제거하면 비병원성으로 전환됨이 증명되었다.^{5,6,9} 또한 이 plasmid보유균주는 V와 W항원산성, calcium의존성, HeLa cell에 대한 침투성, 자가응집성, Congo red흡수성 등의 병독성관련특성들을 가지게 될 을 알게되었다.⁴⁻¹⁰

이 연구에 공시한 *Yersinia*균주 가운데 돼지에서 분리된 *Y enterocolitica*혈청형 0:3생물형 3B인 3주가 calcium의존성이 있었으며, 약 45Md plasmid DNA를 가지고 있어서, 이러한 균주를 보관하고있는 동물이 직접 혹은 간접으로 사람의 주요 감염원으로 작용할 수 있는 것으로 사료된다.

한편 *Yersinia*속균의 plasmid와 병독성 관련특성들과의 상관성에 관하여, Kaneko와 Maruyama,²⁶ Prpic et al²⁷은 많은 수의 균주를 대상으로 조사하였던 바, plasmid 보유균주가 병독성관련 특성들을 모두 가지게 되는 것이 아니라, 균주에 따라 여러형태의 조합으로 가지고있으며, 비병원성균으로 알려진 *Y kristensenii*, *Y intermedia* 및 *Y frederiksenii*에서도 plasmid를 가지고있거나, 병독성관련특성을 가지고 있는 균주가 있었음을 보고하였다. 또한 guinea pig의 결막염 유발능 유무검사인 Serény test의 경우, Tanaka et al²⁶과 Prpic et al²⁷은 plasmid 보유균주가 이 시험에 음성이었음을, Heesemann et al²⁸과 Gemski et al⁵은 양성이었음을 보고하였고, 이 연구에서는 plasmid를 보유하고 있는 3주가 모두 음성이었다.

따라서 *Yersinia*속균의 plasmid와 병독성관련특성들과의 상관성에 관한 더 많은 연구여지가 남아있으며, 앞으로 국내의 각종 유래에서 분리되는 *Yersinia*속균들에 대하여 병독성관련특성에 관한 연구를 포함한 과학적 및 역학적 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

국내의 돼지와 개에서 분리된 *Yersinia enterocolitica* 5주, *Y kristensenii* 2주 및 *Y pseudotuberculosis*와 *Y intermedia* 각 1주에 대하여 병독성 관련 plasmid의 존재유무, calcium의존성 및 guinea pig의 결막염유발능(Serény test)을 조사하였던 바, 돼지에서 분리된 *Y enterocolitica* 3주가 calcium 의존성이 있었고, 분자량이 약 45 megadalton인 1개의 plasmid를 보유하고 있었으며, Serény test에는 음성이었다.

참 고 문 헌

1. Joklit WK, Willett HP, Bernard Amos M, et

- al. *Zinsser microbiology*. 19th ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1988; 498~500.
2. Krieg NR, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984; 498~506.
 3. 丸山務. 人畜共通傳染病としてのエルシニア症. 日獣會誌 1983; 35:2~8.
 4. Carter PB, Zahorchak RJ, Brubaker RB. Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1980; 28:638~640.
 5. Gemski P, Lazere JR, Casey T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1980; 27:682~685.
 6. Portnoy DA, Moseley SL, Falkow S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect Immun* 1981; 31:775~782.
 7. Laird WJ, Cavanaugh DC. Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersinia*. *J Clin Microbiol* 1980; 11:430~432.
 8. Pai CH, Destephano L. Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1982; 35:605~611.
 9. Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo red agar. *J Clin Microbiol* 1983; 18:486-490.
 10. Zink DL, Feeley JC, Wells JG, et al. Plasmid mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. *Nature* 1980; 283:224~226.
 11. Wooley RE, Shotts EB, McConnell JW. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from selected animal species. *Am J Vet Res* 1980; 41:1667~1668.
 12. 成者昌, 崔源弼. 動物에 있어서 *Yersinia* 屬菌의 分布와 特性에 關한 研究. 大韓獸醫學會誌 1987; 27:235~243.
 13. Morris GK, Feeley JC. *Yersinia enterocolitica*: A review of its role in food hygiene. *Bull WHO* 1976; 54:79~85.
 14. Higuchi K, Smith J. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. *J Bacteriol* 1961; 81:605~608.
 15. Maniatis T, Fritsch EF, Sanbrook J. *Molecular cloning*. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; 368~369.
 16. Last JM, Chin J, Fielding JE, et al. Public health and preventive medicine. 12th ed. Connecticut: Appleton-Century-Crofts, 1986; 429~430.
 17. Toma S, La Fleur L. Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* in Canada. *Appl Microbiol* 1974; 28:469~473.
 18. Rabson AR, Hallett AF, Koornhof HJ. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J Infect Dis* 1975; 131:447~451.
 19. Zen-Yoji H, Maruyama T, Sakai S, et al. An outbreak of enteritis due to *Yersinia enterocolitica* occurring at a junior high school. *J Microbiol* 1973; 17:220~222.
 20. 김홍진, 정희정, 이철 등. *Shigella*로 오인된 *Yersinia enterocolitica*에 의한 장염 1예. 소아과 1981; 24:492~496.
 21. 안승혜, 서진태, 지현숙 등. 성인장염환자에서 분리된 *Yersinia enterocolitica* 5예. 대한병리학회지 1981; 15:449~457.
 22. 김진주, 강창기, 이경원 등. *Yersinia pseudotuberculosis* 패혈증 1예. 대한임상병리학회지 1985; 5:11~15.
 23. 경용호, 최태열, 정화순 등. *Yersinia pseudotuberculosis*로 인한 패혈증 및 결절성홍반 1예. 대한임상병리학회지 1981; 1:89-93.
 24. 이환중, 정해일, 최용 등. *Yersinia pseudotuberculosis* 감염에 의한 급성 신부전증 및 유사 Kawasaki병 유행에 관한 보고. 대한의학협회지 1988; 31:747~756.
 25. 박효진, 김웅, 김준명 등. Non-plague *Yersiniosis* 32예에 대한 임상적 고찰. 감염 1987; 19:39~45.
 26. Kaneko S, Maruyama T. Relationship between the presence of 44 megadalton plasmid and calcium dependency or autoagglutination to serotype O3 strains of *Yersinia enterocolitica*. *Jpn J Vet Sci* 1986; 48:205~210.
 27. Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. In vitro assessment of virulence in *Yersinia enterocolitica* and related species. *J Clin Microbiol*

1985; 22:105~110.

28. Heesemann J, Keller C, Morawa R, et al. Plasmids of human strains of *Yersinia enteroco-*

litica: Molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* 1983; 147: 107~115.
