

서울시내 약수에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 생물형, 혈청형 및 분자학적 형별비교

이영기 · 최성민 · 오수경 · 신재영
서울특별시 보건환경연구원

Comparison of Biotyping, Serotyping and Molecular Typing of *Yersinia enterocolitica* Isolated from Spring Water in Seoul

Lee, Young-Kee · Choi, Sung-Min · OH, Soo-Kyung · Shin, Jai-Young
Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health & Environment

Abstract

Enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* is an important cause of human and animal disease. Phenotypic and genotypic characteristics currently used to identify *Yersinia enterocolitica* are not necessarily sufficient to differentiate pathogenic from non-pathogenic strains or to analyze the epidemiology of yersiniae at a molecular level. To improve the characterization of *Yersinia enterocolitica*, A total of 65 isolates of *Yersinia enterocolitica* were examined with bioserotyping, antibiotic susceptibilities, PFGE, PCR-ribotyping.

Genomic DNA pattern generated by PFGE are highly specific for different strains of an organism and have significant value in epidemiologic investigations. The PFGE analysis of Not I-digested chromosomal DNA of *Y. enterocolitica* were performed with a CHEF Mapper(Bio-Rad, USA). Not I generated 19 restriction endonuclease digestion profiles(REDP).

PCR-ribotyping, performed with primers complementary to conserved regions of 16S and 23S rRNA gene, generated 13 ribotypes. PCR-ribotyping can be considered a good technich for subtyping strains of *Y. enterocolitica*.

I. 서 론

*Yersinia*균 속은 장내세균과에 속하는 통성혐기성 gram 음성의 단간균 및 구간균으로 원래 *pasteurella*속에 속하였으나 *Enterobacteriaceae*의 *Yersinia*속으로 독립하였다(1964). *Yersinia*속은 11종의 species가 있으며, 사람에게 질병을 유발시킬수 있는 주요 병원균으로 *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*

및 *Y. enterocolitica*등이 있다.

*Y. enterocolitica*는 현재 생화학적 성상에 의하여 7종의 생물형으로 구분되며 균체 세포벽의 다당체 항원 특이성에 의하여 57종 이상의 혈청균으로 분류된다.

*Yersinia*균종의 병원성에 영향을 미치는 인자로는 혈청형, 내열성 장독소의 생산 및 병원성과 관련된 plasmid의 존재를 들수 있는데, 특히 병원성

이 있는 균주는 혈청형에 관계없이 40-50Md의 plasmid(pYV)를 보유하고 있는 것으로 밝혀져 Yersinia균종의 병원성 검사는 일차적으로 plasmid의 분석에 의존하고 있다. 그러나 이 균종은 계대 배양(특히 37°C)동안의 plasmid의 손쉬운 소실때문에 13.5%의 위음성(false negative)이 발생하여 우물물이나 웅달샘물 같은 극히 적은 분리율의 환경에서는 적용하기 어려운 실정이다. 또한 *in vitro* 독성실험인 칼슘의존성 시험, 자가응집시험, CV결합시험, CRMOX시험, pyrazinmidase 시험등은 높은 정확성을 보이고 있지만 그렇다고 완전히 virulence를 대신 한다고는 볼 수 없다.

최근 병원성 Yersinia균종의 신속한 동정을 위하여 PCR기법이 이용되고 있는데 chromosomal *ail* (attachment invasion locus)과 virulence에 관계된 chromosomal *yst*(heat-stable enterotoxin)gene 그리고 plasmid-borne *virF* gene을 이용한 PCR은 병원성 *Y. enterocolitica*를 검출하기 위한 매우 효과적인 방법이라 볼 수 있다. *ail*, *yst*, *virF* gene들은 병원성 균주에만 존재하는 특이 유전자이기 때문에 신속하고 정확한 병원성 균주의 동정이 가능하며, 본 실험에 처음으로 도입된 subgenus-specific primer pair와 병용하면 병원성 균주 및 비병원성 균주까지도 신속하고 정확하게 동정할수 있어 시간 소비적이고 객관성이 적은 다른 시험까지도 대체할 수 있으리라 생각된다. 병원성을 나타내는 혈청형으로는 american group에 O:4, O:5, O:8, O:13a, O:13b, O:20 그리고 O:21(biotype 1B), European group에 O:3, O:5,27 그리고 O:9(biotype 2-5)으로 구분되며 일본은 현재 O:3가 유행하고 있으며 미국도 근 10년간 O:3가 널리 확산되고 있는 실정이다. 그러나 병원성과 특정한 bio/serotypes 간에는 연관성이 덜하다는 사실이 대두되고 있고 유사한 혈청형간에는 역학적 양상을 파악하기가 힘든 단점 그리고 현재의 혈청으로는 더 이상 분류가 곤란한 균주의 존재 때문에 표현형보다는 분자생물학적(유전학적) 기법을 이용한 역학연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 이런 검사기법들에는 표현형분석으로서 생화학적 분류, 생물형, 혈청형분석, 항생제 감수성 양상분석, phage-typing, 단백질 분석 및 immunoblotting등이 있으며, 유전형 분석으

로는 PFGE pattern, plasmid restriction pattern, ribotyping, DNA restriction pattern, 유전자 염기서열 분석등의 기법이 있는데 이러한 유전형 분석법은 Yersinia균종의 역학조사에 광범위하게 사용할 수 있다.

본 실험에서는 PFGE, PCR-ribotyping pattern 분석을 통해 기존의 생물형, 혈청형 균주와 비교함으로써 이들간의 유연적 상관관계와 분자화도를 비교하고 *Y. enterocolitica*의 감별 동정을 위한 database를 구축하여 분자생물학적 역학조사에 활용할수 있는 기초를 수립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험검체

본 실험은 1994년부터 1999년까지 6년간, 서울시내에 산재에 있는 380여곳의 웅달샘물 검체를 대상으로 실시하였으며, 채취 검체는 즉시 냉장 보관하면서 균 분리를 시도하였다. 연도별로 살펴보면 1994 831건, 1995년 824건, 1996년 416건, 1997년 388건, 1998년 382건, 1999년 378건등 총 3,219 건이었다.

2. 균 분리 및 동정

여시니아균의 분리 및 동정은 Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, Bergey's manual of systmic bacteriology등을 참고로 하여 균을 분리·동정하였으며, 약수 1L를 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 0.1% KOH로 30초간 처리한 후 다음 CIN배지에서 25°C, 48hr 동안 배양하였다. 배지상에서 작고 적색의 집락을 선택하여 TSI, urease, motility test를 거쳐 gram staining을 하였고 API 20E Kit로 동정한후 indole, M.R., H₂S, V-P., nitrate, citrate, ONPG, sucrose, lactose, mannitol, salicin, inositol, arabitol, rhamnase, mannose, dulcitol, maltose, sorbitol, cellobiose, melibiose, raffinose, xylose, esculin, adonitol, trehalose, sorbose, malonate, phenylalanine등 각종 생화학 시험을 실시하여 *Y. enterocolitica*로 최종 확인·동정하였다.

3. 세균 보존

분리·동정된 *Y. enterocolitica*균은 TSA상에서 26°C, 48hrs 동안 배양한 후 30% glycerol이 포함된 TSB로 진한 균부유액을 만들어 -72°C에서 냉동 보관하면서 사용하였다.

4. 분리균의 생물형 및 혈청형 시험

*Y. enterocolitica*로 동정된 균에 대하여 Nilehn (1969), Winblad(1978), Corneli등(1987)의 방법에 따라 lipase, aesculin, indole, xylose, V.P., ornithine, salicin, inositol, sorbitol, DNase, nitrate 등의 생물형 시험을 실시하여 총 7종의 biotypes으로 분류하였고, 혈청형 시험은 중앙대학교 의과대학 미생물학 실험실에서 분양받은 (O:3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 16, 18, 20, 21)혈청을 가지고 2회 연속 계대배양한 집락에 대하여 슬라이드 평판응집반응을 이용하여 혈청학적 분류를 실시하였다.

5. 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 디스크 확산법으로 시행했으며 디스크는 BBL사 제품으로 amoxicillin/clavulanic acid, rifampin, vancomycin, cefazolin, cefoxitin, sulfisoxazole, sulfadiazine, neomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, lincomycin, erythromycin, novobiocin, chloramphenicol, polymyxin B, nalidixic acid, tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, cephalothin, penicillin, ampicillin, carbenicillin 등 총 24종의 항생제를 사용하였고 시험결과는 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard)의 기준에 의하여 판정하였다. 접종균액은 TSB에서 18시간 배양한 균을 Muller Hinton broth에서 8시간 배양한 후 생리식염수로 희석하여 MacFarland scale No 0.5 BaSO₄ 표준 비색관에 맞추어 사용했으며, Muller Hinton agar에 멸균 멸봉을 사용해 균액을 골고루 바른 다음 항생제 디스크를 20mm간격으로 부착시킨 후 37°C에서 18-24시간 배양하여 발육 억제대를 zone reader로 측정하고 감수성 여부를 판단하였다.

6. Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PFGE는 Gautom(1997)의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 즉 TSB 3ml로 26°C, 18시간동안 배양한 후 SE buffer로 cell을 harvest하고 UV spectrophotometer로 610nm에서 O.D를 1.4로 조정한 후 1.4% low melting point agarose와 혼합하여 plugs를 만들었다. plugs를 굳힌 후 lysis buffer로 55°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 TE buffer로 여러 번 washing을 하였다. Plugs를 1mm정도로 잘라 2개의 slices를 만든 후 1× Not I buffer로 진 배양을 한 후 10U의 Not I 제한효소로 37°C에서 18hr동안 반응시켰다. 반응 후 slices를 0.5× TBE로 가볍게 washing한 후 TE buffer로 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 전기영동은 CHEF MAPPER system에서 PFGE용 agarose와 0.5× TBE buffer를 사용하여 30kb-500kb range, initial switch time, 2.16s; final switch time, 54.17s; run time, 23h; angle, 120°; gradient, 6.0V/cm; temperature, 14°C; ramping factor, linear 조건으로 수행하였다. 대조균주로는 *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC 27729, ATCC 23715, 그리고 돼지에서 분리된 *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b 2주를 사용하였고 DNA size maker는 BioRad 50kb-1000kb를 사용하였다. 전기영동 후 0.5 µg/mL의 EtBr로 30분간 염색한 후 증류수로 1시간 탈염색을 실시하여 Vilber Lourmat (Biocapt) 로 사진영상을 찍어 파일로 저장하였고 Bioprofil사의 Biogene 프로그램으로 제한절편 영상들을 분석하였다. 제한절편중 50kb보다 큰 제한절편만 분석대상으로 삼았다.

7. PCR-ribotyping

PCR 증폭을 위한 template DNA는, 먼저 TSB 5ml배양을 하고 TE buffer로 harvest 한 다음 10% SDS 30µl, PK (20mg/ml) RNA(10mg/ml)를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 5M NaCl, 100µl를 넣었다. 그리고 CTAB용액 80µl를 넣고 65°C 10분간 처리하여 PCI(Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1)로 추출하고 다시 70% EtOH로 침전 시킨뒤 마지막으로 TE buffer로 부

유시커 UV spectrophotometer로 DNA 농도를 측정 한 뒤 40C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

PCR-ribotyping을 위한 primer는 16S와 23S rRNA intergenic spacer region인 P1(5'-TTG-TACACACGCCCGTA-3')과 P2 (5'-GGTACTT-AGATGTTTCAGTTC-3')를 사용하였고 PCR 증폭 조건으로 94°C에서 4분간 Initial denaturation, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 총 35 cycle을 수행하였고, 마지막으로 72°C에서 2분간 extension을 실시하였다. PCR product는 low melting agarose(Sigma) 1.5%를 사용해서 0.5× TBE buffer로 3시간 전개시켰다. 전기영동후 0.5 µg/mL의 EtBr로 30분간 염색한 후 증류수로 1시간 탈 염색한 후 Vilber Lourmat(Biocapt)로 사진 영상을 찍어 제한절편 양상들을 분석하였다. 대조 균주로는 *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC

27729, ATCC 23715, 그리고 돼지에서 분리된 2주의 *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b를 사용하였고, DNA size Marker로는 200bp DNA Ladder를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 생화학적인 특성

최근 6년간 서울시내에 산재에 있는 380여곳의 용달샘 검체 3,219건을 대상으로 *Y. enterocolitica* 를 분리·동정한 결과 65주(2.0%)가 분리되었다. 이것은 박동⁴⁾의 9.8%와, Gonul등⁴⁾의 5-6%에 비교해 볼 때 큰 차이를 보이는데 이러한 이유는 분리 과정에서의 개인차와 여러 환경적 요소의 차이에서 기인된 듯하다¹²⁾. 분리된 *Y. enterocolitica* 생화학적인 특성은 Table 1에 나타내었는데 모든 균주가

Table 1. Biochemical characteristics of *Y. enterocolitica* (N=65) isolated from spring water in Seoul area

Test or Substrate	result%(+)	Ewing%(+)	Test or Substrate	result%(+)	Ewing%(+)
TSI	A/A	A/A	Sorbitol	100.0	98.3
H ₂ S(TSI agar)	0.0	0.0	Maltose	100.0	53.4
Urease	100.0	85.6	Manitol	100.0	100.0
Methyl red 37°C	100.0	100.0	Cellobiose	93.8	92.4
Methyl red 25°C	67.7	97.5	Glucose Acid	100.0	100.0
Arginine	0.0	0.0	Gas	0.0	0.0
Lysine	0.0	0.0	Arabinose	100.0	97.5
Ornitine	100.0	93.2	Melibiose	20.0	0.0
Oxidase	0.0	0.0	Mannose	100.0	100.0
Citrate(Simmons')	0.0	0.0	Trehalose	100.0	92.4
V.P 37°C	0.0	0.0	Dulcitol	0.0	0.0
V.P 25°C	20.0	76.3	Adonitol	0.0	0.0
Indole	50.8	39.8	Inositol	47.7	0.9
DNase	0.0	2.7	Rhamnose	44.6	0.0
Nitrate	100.0	98.3	Lactose	0.0	0.0
Motility 37°C	0.0	0.0	Raffinose	0.0	0.0
Motility 25°C	100.0	97.5	Xylose	100.0	47.4
Sucrose	89.2	94.1	Salicin	75.4	22.9
Aesculin	19.5	70.1	Sorbose	93.9	95.1

TSA상에서 A/A를 나타냈으며, urease, MR 37°C, nitrate, motility 25°C, sorbitol, maltose, manitol, arabinose, mannose, trehalose, xylose는 100% 양성을 나타냈고, H₂S, arginine, lysine, oxidase, citrate, V.P. 37°C, DNase, motility 37°C, glucose gas, dulcitol, adonitol, lactose, raffinose등도 모두 음성을 나타냈다. 특히 urease 100%, M.R.(25°C) 67.7%, V.P.(25°C) 20.0%, aesculin 19.5%, maltose 100%, melibiose 20.0%, inositol 47.7%, rannose 44.6%, xylose 100%, salicin 75.4%로 나타나 Ewing의 결과치인 85.6%, 97.5%, 76.3%, 70.1%, 53.4%, 0.0%, 0.9%, 0.0%, 47.4%, 22.9%와 다소 차이를 나타내었고, 다른 성장들은 거의 일치하는 경향을 나타내었다.

2. 생물형

분리된 65균주의 생물형 분류 결과는 Table 2에 나타내었다. 45균주(73.9%)가 주로 Biotype 1형과 3B형에 분포하는 경향을 나타내었고 나머지 17(26.1%)주는 2형과 3A형에 분포하였다. 각각의 분포율을 살펴보면 25(38.5%)주가 1형, 23(35.4%)주는 3B에 해당되었으며 10(15.4%)주는 2형에, 7(10.7%)주는 3A에 분포하였다. 이러한 분포율은 성등⁹⁾의 1형이 21.7%, 2형이 12.3%, 3B형이 65.9%라는 결과와 큰 수치적 차이를 보이지만 1형과 3형에 속하는 큰 부류의 양상은 어느정도 유사성이 발견되며 최등⁸⁾의 2형이 50%, 3B형이 50%라는 환자 분변에서의 결과와는 매우 다른 양상을 띄었으며 최등⁷⁾의 동물에서 분리된 결과의 3B형이 57.1%, 2형이 17.8%, 3A형이 13.9%, 4형이 7.7%, 1형이 3.1%, 3형이 0.3%라는 결과와도 다소 큰 차이가 발견되었다. 이러한 결과들을 토대로 약수터,

환자, 동물등에서 분리된 균주들간의 생물형 분포율은 서로 상당한 차이가 발견됨을 알수 있으며 이것은 분리된 환경의 차이에서 비롯된 것임을 알수 있다. 외국의 경우 유럽과 캐나다, 일본은 생물형 4형이 미국의 경우는 2형이 주로 환자에서 분리된다고 한다¹⁾. 이러한 상황을 종합해 볼 때 국가간, 검체간, 지역간에도 생물형의 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다.

3. 혈청형

슬라이드 평판 응집반응을 이용한 혈청형 분류 결과는 Table 3에 표시하였다. 총 65균주 중 41(63.1%)주만이 11가지의 항혈청으로 분류되었으며 나머지 24(36.9%)주는 동정되어지지 않았다. 주로 O:3형과 O:9형으로 30(46.1%)주가 분포되어졌는데 우선 22(33.8%)주가 O:3, 3주(4.6%)주가 O:4, 2(3.1%)주가 O:5, 2(3.1%)주가 O:8로 분류되었고 8(12.3%)주가 O:9로, 4(6.2%)주가 O:13형으로 분류되었으며 O:6, 16, 18, 20, 21형은 분류되지 않았다. 이러한 결과는 최등⁸⁾의 환자에서 분리된 결과인 O:3형이 50.0%, O:9형이 50.0%였다는 결과와 약간의 차이는 인정되지만 혈청형의 분포가 유사한 양상을 나타내었고, 또한 최등⁷⁾의 결과인 돼지에서의 분포와 비교해 보면 O:3형이 79.8%, O:9형이 14.3%, O:21은 3.5%이며, 개에서의 분포를 보면 O:3형이 33.3%, O:9형이 33.3%, O:21형이 33.3%였다는 보고와도 유사한 혈청형 분포 양상을 나타내었다. 일반적으로 미국에서는 O:5형과 O:8형이 유럽에서는 O:3형과 O:9형이 많이 분포하며 일본에서는 O:3형이 많이 분리된다고 한다^{11,12,19)}. 약수를 포함하여 동물 및 환자애

Table 2. Distribution of biotypes of *Y. enterocolitica* isolated from spring water in Seoul area

No. of strains tested	Biotype (%)						
	1	2	3	3A	3B	4	5
65	25 (38.5)	10 (15.4)	0	7 (10.7)	23 (35.4)	0	0

Table 3. Distribution of serotypes of *Y. enterocolitica* isolated from spring water

No. of strains tested	Serotype (%)										No. of not typed (%)*	
	3	4	5	6	8	9	13	16	18	20		21
65	22 (33.8)	3 (4.6)	2 (3.1)	-	2 (3.1)	8 (12.3)	4 (6.2)	-	-	-	-	24(36.9)

Symbol :

* = No. of strains not typed by used antiserum

서 분리되는 혈청형이 O:3형과 O:9형이 주종을 이루고 있는 것으로 보아 우리나라의 *Y. enterocolitica* 분포율은 유럽형과 매우 유사한 양상을 띤다고 할 수 있다. 앞으로 유럽형과 국내형들간의 분자적인 분류시도와 비교분석이 뒤따른다면 역학적인 연구에 있어서 큰 도움이 될 수 있으리라 생각된다.

4. 항생제 감수성

디스크 확산법으로 시험한 항생제 감수성 시험결과는 Table 4에 나타내었다. 주로 glycoside계열인 neomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin과 chloramphenicol, polymyxin B, nalidixic acid 그리고 tetracycline 계열인 oxytetracycline, doxycycline, tetracycline등이 매우 높은 감수성을 나타내었고, amoxicillin/calavulanic acid, cefoxitin, sulfisoxazole, sulfadiazine, carbenicillin등은 중등의 감수성을 보였다. 그러나 *Y. pseudotuberculosis*에서 매우 감수성이 높은 약제인 penicillin은 거의 감수성이 없었다. 또한 *Yersinia enterocolitica*에 대한 내성양상을 살펴보면 rifampin, vancomycin, lincomycin, erythromycin, novobiocin, cephalothin,

penicillin, ampicillin등에 매우 높은 내성을 나타냈으며, amoxicillin/calavulanic acid, cefazolin, sulfadiazine, carbenicillin등에는 중등의 저항성을 나타내었다. 다제내성 양상을 보면 AM-MC-CF-VA-E-L-NB-P-RA에 내성을 보인 균주는 모두 7(10.8%)주였고 AM-CB-CF-VA-E-L-NB-P-RA-CZ는 6(92%)주이며 AM-MC-CF-VA-E-L-NB-P-RA-G-SD에 내성을 보인 균주는 5(7.7%)주였다. 또한 AM-MC-CF-VA-E-L-NB-P-RA-CZ, AM-MC-CF-VA-E-L-NB-P-RA-SD, CB-CF-VAE-L-NB-P-RA에 저항성을 보인 균주는 각각 3(4.6%)주로 나타났다. 이러한 결과들은 Kwaga¹³⁾ 등의 가축에서의 결과와 비교해 볼 때 tetracycline, chloramphenicol 등은 동일한 결과를 보였으나 다른 항생제들은 약간 상이한 결과를 나타내었으며, Preston¹⁴⁾과 Scavizzi¹⁵⁾등의 결과와는 glycoside계열, tetracycline계열, erythromycin 그리고 Ampicillin등에서 거의 유사한 결과를 나타내었다.^{13, 14, 15, 16)}

5. Pulsed-Field Gel Electrophoresis

PFGE는 Gautom(1997)의 방법을 약간 변형하여

Table 4. Antibiotic susceptibilities of *Y. enterocolitica* strain isolated from spring water in Seoul area

Antibiotics	No.(%) of susceptible strains (Total=65)			Antibiotics	No.(%) of susceptible strains (Total=65)		
	S	I	R		S	I	R
Amoxicillin/clavulanic acid	15(23.1)	11(16.9)	39(60.0)	Erythromycin	0	2(3.0)	63(97.0)
Rifampin	0	0	65(100.0)	Novobiocin	1(1.5)	2(3.0)	62(95.4)
Vancomycin	2(3.1)	1(1.5)	62(95.4)	Chloramphenicol	62(95.4)	2(3.0)	1(1.5)
Cefazolin	7(10.8)	27(41.5)	31(47.7)	Polymyxin B	64(98.5)	1	0
Cefoxitin	51(78.5)	11(16.9)	3(4.6)	Nalidixic acid	62(95.4)	2(3.0)	1(1.5)
Sulfisoxazole	46(70.8)	0	19(29.2)	Tetracycline	62(95.4)	0	3(4.6)
Sulfadiazine	39(60.0)	4(6.2)	22(33.8)	Oxytetracycline	62(95.4)	0	3(4.6)
Neomycin	64(98.5)	0	1(1.5)	Doxycycline	63(97.0)	2(3.0)	0
Gentamicin	65(100)	0	0	Cephalothin	2(3.0)	1(1.5)	62(95.4)
Kanamycin	65(100)	0	0	Penicillin	1(1.5)	1(1.5)	63(97.0)
Streptomycin	65(100)	0	0	Ampicillin	6(9.2)	7(10.8)	52(80.0)
Lincomycin	0	0	65(100)	Carbenicillin	24(36.9)	8(12.3)	33(50.8)

Symbol : S, sensitive ; I, intermediate; R, resistant.

시행하였으며 다음과 같은 결과를 얻었으며 Fig. 1, 2, 그리고 4에 표시하였다. 대체로 균주들의 분포가 다양한 cluster를 이루었으며 10%의 confidence와 80% similarity를 갖고 분류해 보면 19개 cluster를 형성해 substrain수준의 감별수준을 나타내었다^(2,18,21,22,23,25). 따라서 이 방법은 동일한 혈청이나 strain의 subtyping이나 협소한 지역적 역학적 조사에 활용될수 있는 훌륭한 분자적 기법이라 생각된다. 예로 1, 46, 52, 4, 34, 2, 27, 48, 28, 30, 53, 3 균주가 전형적인 한 grouping을 형성하였으며 Biotype은 거의가 1형으로 분포하는 전형적인 특징을 보여주었으며 serotype은 산발적인 분산 분포를 나타내었다. 또한 3, 5, 9, 25, 6, 45, 32, 70, 8, 69, 54, 64, 22, 24, 균주가 전형적인 한 cluster를 이루었고 biotype은 주로 3B형과 1형순이었고 혈청형은 거의가 3형이 match하는 양상을 보여주었다. 7, 67, 19, 20, 60, 26, 47, 51, 55, 21, 42, 58, 63 균주들은 주로 3B형이, 그 다음으로 3A형이 분포하는 양상을 나타내었으며, 혈청형은 주로 3형이 분포하는 패턴을 나타내었다. 36, 37, 39, 40, 44, 균주들은 생물형이 주로 1형, 혈청형이 13형 등으로 분포하였고 59, 61, 11, 15, 14, 16균주들은 거의가 3B형과 혈청형이 3형 및 9형순으로 분류되었다. 10, 41, 13, 33, 38, 49, 66, 50, 29, 35, 56, 43, 57, 62, 17, 31, 18, 68, 65균주들은 주로 생물형이 1형, 3B, 3A순으로, 혈청형은 3형과 9형순으로 분포하였고, 23, 12균주는 각기 다른 생물형과 혈청형으로 분류되었다.

7. PCR-ribotyping

PCR ribotyping은 Kostmann 등의 방법에 따라 시행하였으며 Fig. 3, 5에 나타내었다. 역시 10%의 confidence와 80% similarity를 갖고 분류해 보면 13개의 cluster로 분류될수 있는데 종수준의 감별능력을 보여주었다^(6,17,22,27,28,29). 먼저 1, 13, 28, 10, 25, 51균주들이 하나의 cluster을 이루며, biotype 1형과 2형이 분포하였고 혈청형은 3형과 9형이 위치하였다. 또한 11, 12, 18, 20, 21, 22, 14, 26, 27균주가 cluster를 이루며 생물형 3B형과 혈청형 3형과 9형이 match되었고 cluster를 이룬 3, 5, 9, 65,

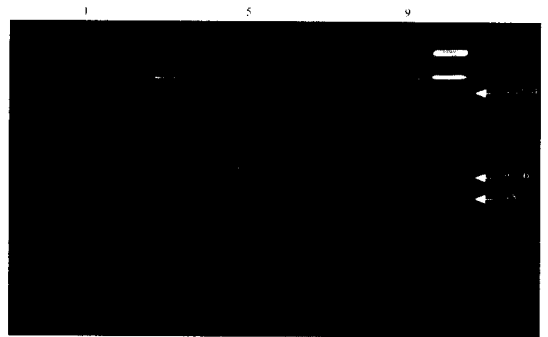


Fig. 1. PFGE patterns of *Y. enterocolitica* isolated from spring water. Chromosomal DNA were digested with Not I restriction endonuclease.

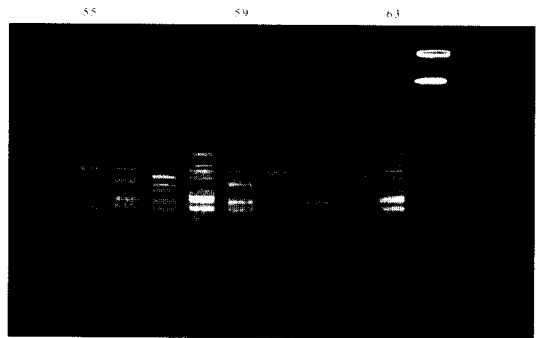


Fig. 2. PFGE patterns of *Y. enterocolitica* isolated from spring water. Chromosomal DNA were digested with Not I restriction endonuclease.

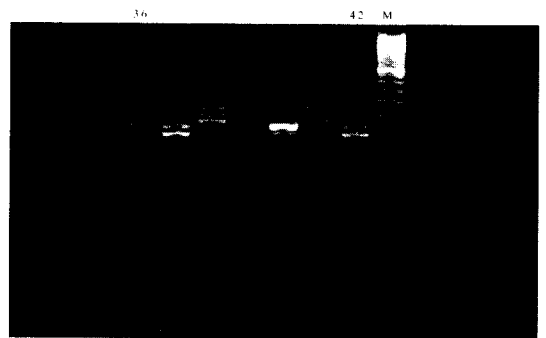


Fig. 3. Ribotypes generated by PCR amplification using primers for conserved regions of 16S and 23S rRNA genes in *Y. enterocolitica*

68, 16, 47, 49, 62, 66, 67, 55균주들은 주로 3B형과 3형이 위치하는 양상을 띄었고 2, 17, 23, 46, 4, 43, 6, 7, 15, 19, 35, 58, 60, 61, 64, 70,30, 31, 24균주의 Cluster와 69, 59, 29, 32, 33, 34균주의 Cluster는 1형과 3B형이 그리고 혈청형은 3형이 주로 위치하였다. 8, 45, 57, 44, 48균주는 다양한 생물형분포와 3형의 혈청형이 36, 37, 40, 41, 42, 38, 39는 주로 1형의 생물형과 13형의 혈청형이 분포하였으며 50, 52, 53, 56, 54균주는 1형과 3A형의 생물형이 분포하였으나 혈청형은 다양한 분산 분포를 보여주었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 PFGE 및 PCR-ribotyping은 기존의 생물형과 혈청형을 분자학적인 수준으로 분류 및 대체할수 있는 훌륭한 기법이라 생각되었으며 특히 PFGE는 substrain수준, PCR-ribotyping은 종수준으로 감별할수 있는 특징을 지닌 것으로 판단되었다. 또한 분자학적인 형별의 구분은 serotype보다는 오히려 biotype에 일치하는 양상을 보였으며 약수에서 분리되는 매우 다양한 *Y. enterocolitica* 경우에는 보다 세분화된 분류패턴을 보이는 PFGE보다 PCR-ribotyping같은 덜 민감한 기법이 분류체계를 세우는데 더 적합함을 알 수 있었다.

IV. 결 론

1994-1999년까지 서울시내 약수터에서 수거된 총 3,219건의 용달샘 검체를 검사하여 65주(2.0%)의 *Y. enterocolitica*를 분리하였고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리된 균주들의 생물형은 1형(38.5%)과 3B형(35.4%), 2형(15.4%), 3A(10.7%)순이었다.
2. 분리된 균주들중 63.1%만이 11가지 혈청으로 분류되었고, 나머지 36.9%는 동정되지 않았으며 O:3형이 33.8%, O:9형 12.3%, O:13형이 6.2%, O:4형이 4.6%, O:5와 O:8은 모두 3.1% 순으로 나타났다.
3. 항생제 감수성은 주로 glycoside계열과 tetracycline 그리고 chloramphenicol, polymyxin B에 높은 감수성을 보였으나 rifampin, lincomycin, erythromycin, novobiocin, cephalothin, penicillin에는 강한 내성을 보였다.
4. PFGE에 의한 감별특성은 Substrain수준의 예민한 감별능을 보였고, PCR-ribotyping은 Species 수준의 감별능을 보였다.
5. PFGE 및 PCR-ribotyping을 이용한 grouping결과는 serotype보다는 biotype에 높은 연관성을

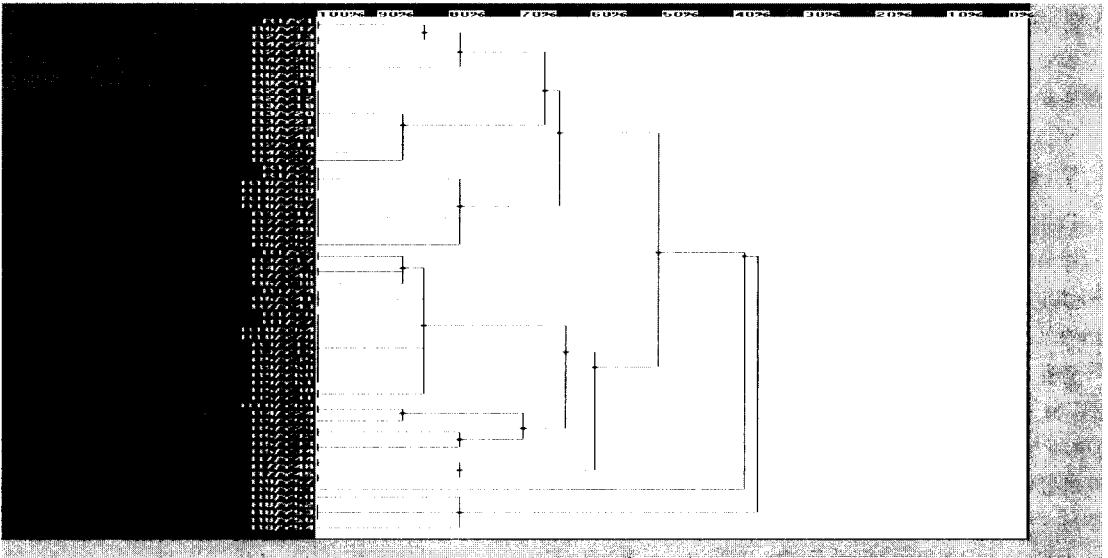


Fig. 4. Dendrogram of *Y. enterocolitica* based on PFGE

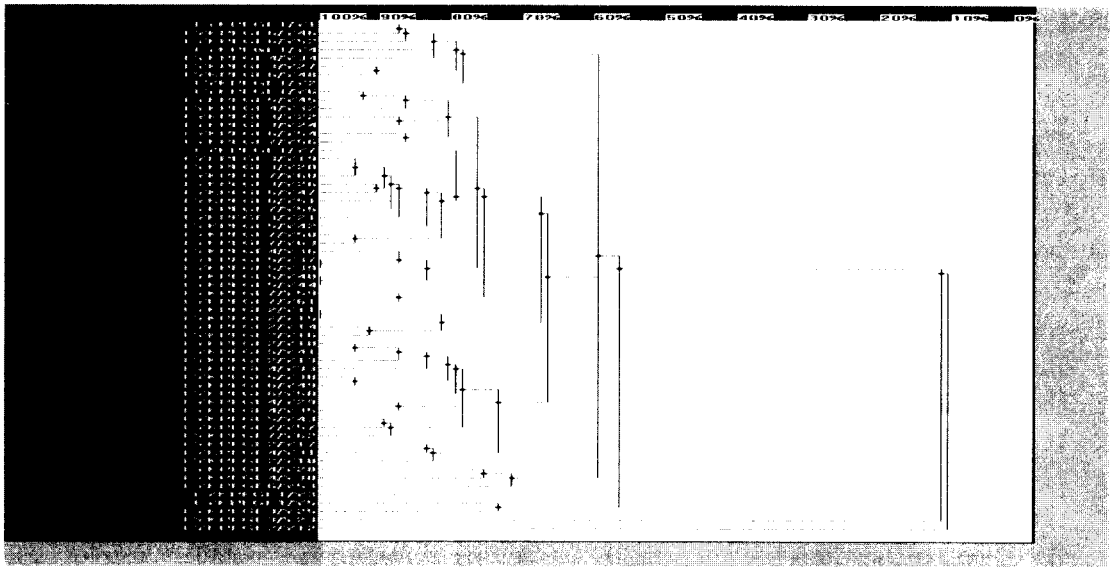


Fig 5. Dendrogram of *Y. enterocolitica* based on PCR-ribotyping

나타내었다.

참 고 문 헌

1. 김미희: 부산시내 약수터에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 특성, 부산 대학교 환경대학원 환경과학과, 석사학위 논문. 1997.
2. 김재석: Pulsed-field gel electrophoresis를 이용한 *Yersinia pseudotuberculosis*의 분자생물학적분석, 서울대학교 대학원, 석사학위논문. 1998.
3. 박석기, 최철순, 전윤성: 돼지에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 생물형, 혈청 및 항균제 감수성, 대한수의사학회지 제32권 제1호, 1992.
4. 박옥자: 마산과 창원지역의 약수터에서 분리된 *Yersinia enterocolitica*의 생물형, 혈청형 및 병원성 검사, 경남대학교 산업대학원, 석사학위논문. 1999.
5. 변신철: 서울북부지역 웅담샘에서 분리한 *Yersinia* 속균에 관한 연구, 서울대보건대학원 석사학위논문. 1995.
6. 유인환: 16S rDNA분석에 의한 *Yersinia*속균의 분자진화 및 동정법 개발.중앙대학교 대학원, 석사학위논문. 1998.
7. 최철순, 박석기, 윤용덕, 정상인, 양용태: 한국의 동물(돼지와 개)에서 분리 *Yersinia* 균종과 *Yersinia enterocolitica* 혈청군과 생물형, 대한미생물학회지, 제 25권 제1호, p.45-56.1990.
8. 최철순, 김관옥, 정상인, 양용태: 급성위장염 환자의 분변에서 분리된 *Yersinia*균종 및 *Yersinia enterocolitica*의 혈청군과 생물형, 대한미생물학회지, 제24권 제2호, p.33-44. 1989.
9. 성기창, 최원필: 동물에 있어서 *Yersinia* 속속의 분포와 특성에 관한 연구, 대한수의학회지, 제27권, 제2호, p.55-67. 1987.
10. 박석기: 돼지에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 시험관내 및 생체내 병원성에 관한 연구, 서울대 수의대대학원 박사학위 논문, 1991.
11. E.J. Bottone, "Current trends of *Yersinia enterocolitica* isolates in the New York city area", *J. Clin. Microbiol.* 17, p.63-67. 1983.
12. M. Shayegani, I. Deforge, D.M. McGlynn and T.M. Root, "Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related speccies isolated from human, animal and environmental sources", *J. Clin. Microbiol.* 14, p.304, 1981.

13. J. K.P. Kwaga, D.E. Agbonlahor, A.A. Adesiyun and L. H. Lombin : The sensitivity to antimicrobial agents of species of *Yersinia* isolated from cattlead pigs in nigeria, *Verterinary Microbiology.* 12, p.383-388. 1986.
14. M. A. Preston, S. Brown, A. A. Borczyk, et al : Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolated in Canada from 1972 to 1990, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Sept. p.2121-2124. 1994.
15. M. R. Scavizzi, M. Gayraud. et al : In vitro and in vivo activities of antibiotics on *Yersinia enterocolitica.* *J antimicrob Chemother.* 38, p.108-1109. 1996.
16. Alzugaray, R., Gonzalez Hevia, M.A., Landeras, E., and Mendoza, M.C. : *Yersinia enterocolitica* O:3 antimicrobial resistance patterns, virulence profiles and plasmids, Accepted September. 24, 1994.
17. Ashraf Ibrahim : Genetic diversity among *Yersinia enterocolitica* strains as revealed by sequence analysis of the 16S rRNA gene, *Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger.* 13 p.277-280. 1995.
18. C. Buchrieser, S. D. Weagant, and C.W. Kaspar : Molecular characterization of *Yersinia enterocolitica* by pulsed-field gel electrophoresis and hybridization of DNA fragments to ail and pYV probes, *Applied and Environmental Microbiology.* Dec, p.4371-4379. 1994.
19. D. E. Agbonlahor (1), A. A. Adesiyun (2), J. K. P. Kwaga and L. H. Lombin : Colonial, biochemical and serological characteristics of yersinia specie isolated from animals in nigera, *Rev. Elev. Med. vet. Pays trop.* 38(4), p.416-422. 1986.
20. Dominique A. Caugant, S. Aleksic, H. H. Mollaret, R.K. Selander and G. Kapperud : Clonal diversity and relationships among strains of *Y. enterocolitica*, *Journal of Clinical Microbiology.* Dec, p.2678-2683. 1989.
21. E. Saken, A. Roggenkamp, S. Aleksic and J. Heesemann : Characterisation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroups by pulsed-field gel electrophoresis of genomic Not I restriction fragments, *J. Med. Microbiol.* 41, p.329-338. 1994.
22. G. Kapperud, T. Nesbakken, S. Aleksic and H. Henri Mollaret : Comparison of restriction endonuclease analysis and phenotypic typing methods for differentiation of *Yersinia enterocolitica* isolates, *Journal of Clinical Microbiology.* June, p.1125-1131. 1990.
23. Hristo Najdenski, Isabelle Iteman, and Elisabeth Carniel : Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology.* Dec, p.2913-2920. 1994.
24. I. Iteman, A. Guiyoule and E. Carniel : Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains, *J. Med. Microbiol.* 45, p.48-56. 1996.
25. I. Iteman, C. Baril, I.S. Girons, E. Carniel : Pulse field electrophoresis of the chromosome of the pathogenic *yersiniae*, *Contrib Microbiol Immunol. Basel, Karger.* 12, p.198-202. 1991.
26. K. Asplund, T. Johansson and A. Siitonen : Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments in the discrimination of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Epidemiol. Infect.* 121, p.579-586. 1998.
27. M. J. Lobato, E. Landeras, M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza : Genetic heterogeneity of clinical strains of *Yersinia enterocolitica* traced by ribotyping and relationships between ribotypes, serotypes, and biotypes, *Journal of Clinical Microbiology.* Nov. p.3297-3302. 1998.

28. P. T. Odinet, J. F. G. M. Meis, P. J. J. C. Van Den Hurk, J. A. A. Hoogkamp-Korstanje and W. J. G. Melchers : PCR-based characterization of *yersinia enterocolitica* : comparison with biotyping and serotyping, *Epidemiol. Infect.* p.115-269-277. 1995.
29. Paul T. Odinet, Jacques F.G.M. Meis, Partick J.J.C. van den Hurk, Jacomina A.A. Hoogkamp-Korstanje, Willem J. G. Melchers : PCR-based DNA fingerprinting discriminates between different biotypes of *Yersinia enterocolitica*, *Contrib.Microbiol Immunol. Karger.* 13, p.93-98. 1995.