

Multiplex-PCR을 이용한 병원성 *Yersinia enterocolitica*의 신속검출 기법에 관한 연구

이영기 · 최성민 · 오수경 · 신재영 · 엄 곤*

서울특별시보건환경연구원 미생물검사팀, 단국대학교 미생물학과*

Rapid Detection Method for Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a Multiplex-PCR

Young Kee Lee · Sung Min Choi · Soo Kyung Oh · Jei Young Shin · Kon Ryeom*

*Microbial Inspection Team, Seoul Metropolitan Government of Institute of Health and Environment ; Department of Microbiology, Dankook University**

Abstract

We have isolated 65 strains(2.0%) of *Y. enterocolitica* among 3,219 water samples from 380 spring water sites in Seoul from 1994 to 1999. The biochemical characteristics of isolated strains revealed that TSI was A/A, urea, M.R.(37°C), nitrate, motility(25°C), sorbitol, maltose, manitol, arabinose, mannose, trehalose, xylose were positive(100%) and H₂S, arginine, lysine, oxidase, citrate, V.P.(37°C), DNase, motility(37°C), dulcitol, adonitol, lactose and raffinose were negative(100%).

In *in vitro* virulence test, positive rate of AAG and CRMOX were 9.2% and 4.6%, respectively. However in the virulence gene detectable test by multiplex-PCR using *ail*, *yst*, *virF* genes, 65 strains were all negative, meaning that *Y. enterocolitica* strains from domestic spring water were not detected for the virulence.

Otherwise, mutiplex-PCR which was using *ail*, *yst* and subgenus-specific primer pair was the best for identifying the virulence of *Y. enterocolitica*.

I. 서 론

병원성 *Y. enterocolitica*를 신속하고 신뢰있게 진단 및 동정하는 것은 임상적으로나 역학적으로 매우 중요한데 최근 PCR 기법을 이용한 진단방법이 많이 사용되고 있다^{1,2)}. *Y. enterocolitica*가 병원성을 나타내기 위해서는 highmolecular weight 인 plasmid를 요구하지만 chromosomeencoded determinant가 완전한 독성능의 발현을 위해 필요

하다³⁾.

병원성 균주를 검출하기 위한 가장 좋은 특이 독성인자(specific virulence factors)는 70Kb plasmid위에 위치한 *virF* gene인데 배양기간 동안의 쉬운 소실 때문에 단독 사용시에는 바람직하지 않은 면이 있어서 chromosome에 위치한 *ail*, *yst* gene의 혼용이 병원성 균주를 동정하는데 있어서 매우 바람직하다^{4,5)}.

ail(attachment invasion locus) gene은 숙주 세

포안으로 침습(invasion)하는 감염 과정의 중요한 첫번째 단계를 담당하며⁶⁾ *yst*(heat-stable enterotoxin) gene은 Yersiniosis의 diarrhea에 관계하는 유전자로, 총 71개 codon의 open reading frame으로 구성되어 있으며 병원성 *Y. enterocolitica*를 검출하는데 매우 적합하다⁴⁾.

본 실험에서는 병원성 및 비병원성 *Y. enterocolitica*를 구별할 목적으로 *ail*, *yst*, 그리고 *virF*를 virulence marker로 사용하였고, 비병원성 균주의 검출을 위한 marker로는 *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii* 그리고 *Y. kristensenii*중의 몇가지를 포함한 *Yersinia* 속균을 구별할 수 있는 새로운 subgenus-specific primer pair를 도입하여 multiplex-PCR의 타당성을 조사하였으며, 전통적인 culture method인 시간 소비적이고, 특이성이 낮은 생물형, 혈청형 분석방법을 대체해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 검체

서울시 25개 자치구에 산재에 있는 380여곳의 약수 검체를 대상으로 *Y. enterocolitica*를 분리하여 생화학적 특성 및 병원성 동정실험을 실시하였다.

2. 균 분리 및 배지

*Yersinia*균의 분리 및 동정은 Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae⁷⁾와 Bergey's manual of systemic bacteriology⁸⁾ 등을 참고하였으며 분리과정은 Fig. 1과 같았다.

무균 채수병으로 채취한 약수 2L를 Millipore사의 여과장치를 이용하여 직경 0.45 μ m membrane filter(Millipore, 90mm)로 음압 여과하고 여과된 여지를 0.1% KOH로 30초간 처리한 후 yersinia selective agar인 CIN(Cefsulodin Irgasan Novobiocin, Difco, USA)배지에서 26 $^{\circ}$ C, 48시간 동안 배양하였다. 배지상에서 mannitol을 분해하여 작은(0.5-2mm) 적색을 나타내는 집락을 선택하여 TSI에서 A/A, urease 양성, 25 $^{\circ}$ C에서 motility가 양성이고 37 $^{\circ}$ C에서 motility가 음성인 균을 대상으로

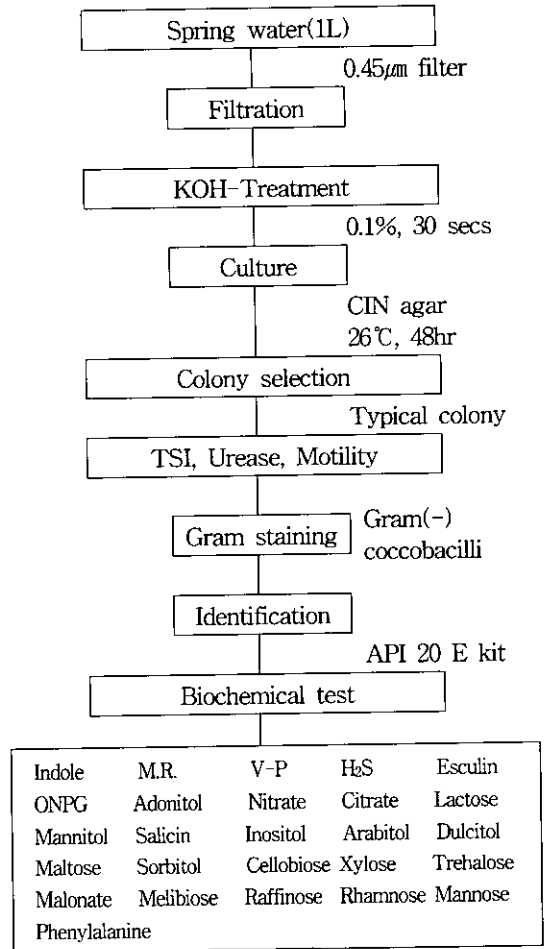


Fig. 1. Isolation and identification of *Y. enterocolitica* isolated from spring water in Seoul

그람염색을 실시하였고, 그람음성의 단간균임을 확인한 후 API 20E Kit(bioMerieux sa, France)로 확인·동정하였다.

3. 생화학적 시험

Y. enterocolitica 로 동정된 균에 대하여 시험관 법으로⁹⁾로 indole, MR, H₂S, V-P, nitrate, citrate, ONPG, arginine, lysine, oxidase, DNase, esculin, sucrose, lactose, mannitol, salicin, inositol, arabitol, rhamnose, mannose, dulcitol, maltose, sorbitol, cellobiose, melibiose, raffinose, xylose, adonitol, trehalose, sorbose, malonate, pheny-

lalanine 등 각종 생화학 시험을 추가로 실시하였고, Ewing의 결과와 비교하여 *Y. enterocolitica*로 최종 확인·동정하였다.

4. 병원성 동정시험

(1) 시험관내 병원성 시험

1) 자가응집(Autoagglutination) 시험

시험관내 자가응집시험은 Laird¹⁰⁾법을 참고하였으며 배지는 10% FBS(fetal calf serum)와 25mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid ; Sigma)가 들어가 있는 RPMI 1640 medium을 사용하였다. 37°C에서는 응집이 일어나고 26°C에서는 응집이 발생하지 않은 균주를 양성으로 판독했으며, 양쪽 온도에서 모두 응집이 발생하면 음성으로 판독하였다²⁾.

2) CRMOX 시험

CRMOX 배지에서의 병원성 확인시험은 Schiemann¹¹⁾의 방법을 참고하였다. Tryptic soy agar 1L를 미리 멸균하여 55°C에서 식힌 다음, 각각 따로 멸균한 0.25M sodium oxalate 80ml, 0.25M magnesium chloride 80ml, 1% congo red 5ml, 20% D-galactose 10ml를 잘 혼합하여 평판 배지를 만들었다. 실험균은 5% blood agar로 26°C에서 18시간 동안 배양한 후 CRMOX 배지에 3차 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 크고 무색의 집락은 음성으로, 작고 적색의 집락은 양성으로 판독하였다.

(2) PCR을 이용한 병원성 확인시험

1) 세균 균주

시험 균주로는 약수에서 분리된 *Y. enterocolitica* 65주가 사용되었고, 양성 대조균주로는 *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC 27729, ATCC 23715 그리고 돼지로부터 분리한 *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b 2주가, 음성 대조균주로는 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* 등이 사용되었다.

2) Template DNA 분리

실험균의 genomic DNA는 Gerhard¹²⁾의 방법을 이용해 다음과 같이 분리하였다. 우선 5ml tryptic soy broth(TSB)에서 18-24시간 동안 shaking incubator로 진탕배양(180 rpm/min)하여 집균한 다음 pellets을 TE buffer(10mM Tris 1mM EDTA pH 8.0)로 2회 세척하였다. 집균한 균액을 다시 TE buffer 567 μ l에 재부유시키고 10% SDS 30 μ l, proteinase K(20mg/ml in TE buffer) 및 RNase(10mg/ml in TE buffer) 5 μ l를 가하고 잘 섞었다. 37°C에서 1시간 반응시키고 난 후 5M NaCl 100 μ l 첨가한 후 다시 65°C의 CTAB(Hexadecyltrimethyl-Ammonium-Bromide, Sigma)/NaCl 용액 80 μ l를 가했다. CTAB 용액(10% CTAB in 0.7M NaCl)은 D.W 80ml에 NaCl 4.1g을 넣고 CTAB 10g을 65°C에서 천천히 녹인 다음 총량이 100ml가 되게 만들었다.

다시 CTAB/NaCl 용액을 손으로 천천히 흔들어 섞고 65°C에서 10분간 반응시키고 난 후 동량(800 μ l)의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 가했다. 15,000rpm으로 원심분리를 하여 점액성의 상층액을 새로운 Eppendorf tube로 옮기고 다시 동량의 PCI(phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1))를 가하여 격렬하게 손으로 흔들었다. 15,000rpm에서 5분간 원심분리를 한 다음 상층액을 새로운 tube로 옮기고 0.6배(500 μ l)의 isopropanol을 가하여 DNA 침전이 생길때까지 손으로 앞뒤로 흔들어 섞었다. 15,000rpm으로 5분간 원심분리를 하고 pellets에 70% ethanol을 가하여 침전물을 세척하였다.

Vacuum evaporator로 ethanol을 완전히 증발시켜 버리고 50 μ l의 멸균 D.W를 첨가한 후 UV spectro-photometer로 260nm 파장에서 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 측정하였다. 이렇게 분리된 genomic DNA는 multiplex-PCR의 template DNA로 사용되었다.

3) PCR Primer

병원성이 있는 *Y. enterocolitica*를 신속, 정확하게 진단, 동정하기 위해 chromosome에 위치한 *ail*(attachment invasion locus)과 *yst*(heat-stable

enterotoxin) gene, 그리고 plasmid위에 위치한 *virF* gene을 사용하였고, *Yersinia* 속균을 구별할 목적으로 subgenus-specific primer pair를 도입하여 multiplex-PCR의 응용 가능성을 조사하였다 (Table 3).

각각의 PCR 최종 산물은 356 bp(*ail*), 134 bp (*yst*), 231 bp(*virF*), 그리고 749 bp (subgenus-specific primer pair)를 생성하게 되며, 대조균주와

의 비교를 통해 virulence gene의 유무 및 병원성 여부를 판독하였다.

4) PCR 증폭반응

세균 DNA의 PCR 증폭은 Harnett등¹³⁾의 방법에 따라 실시하였고, template DNA 1 μ l, 각각 50 pmol primer 1 μ l, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 각각 200 μ M dATP,

Table 1. Annual distribution of spring water samples and *Yersinia enterocolitica* strains isolated from spring water in 1994-1999

Year	1994	1995	1996	1997	1998	1999	Total
No. of water sample	831	824	416	388	382	378	3,219
No. of <i>Y. enterocolitica</i> strain isolated	5(0.6%)	11(1.3%)	6(1.4%)	2(0.5%)	25(6.5%)	16(4.2%)	65(2.0%)

Table 2. Biochemical characteristics of *Y. enterocolitica* (N=65) isolated from spring water in Seoul

Test or Substrate	result%(+)	Ewing%(+)	Test or Substrate	result%(+)	Ewing%(+)
TSI	AA	AA	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
Ornithine	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
esculin	19.5	70.1	Sorbose	93.9	95.1

dCTP, dGTP, dTTP, 2.5U Taq DNA polymerase (Boehringer mannheim)를 포함하는 50 μ l reaction mixture를 Thermal Cycler (Perkin Elmer 9600)로 증폭하였으며 증폭조건은 다음과 같았다.

Denaturation 과정으로 94 $^{\circ}$ C에서 1분간을 수행하였고, primer annealing과정으로 55 $^{\circ}$ C에서 1분을, extension 과정으로 72 $^{\circ}$ C에서 2분간을 1회전으로 모두 25회를 실시하였고, 최종적으로 74 $^{\circ}$ C에서 7분간 더 extension 시켰다. 음성대조 실험으로는 각각의 반응물에 template DNA를 넣지 않은 것을 사용하였다.

5) Agarose Gel Electrophoresis

0.5 \times TBE buffer에 3% Nusieve 3:1 agarose gel(FMC Bioproducts, Rockland, USA)를 녹인 다음, 증폭된 PCR products 8 μ l와 6배로 농축된 sample loading dye 1.2 μ l를 섞어 1.5% agarose gel에서 50V로 3시간 동안 전기영동을 실시하였고 molecular size marker는 123bp DNA ladder (Gibco/BRL)를 사용하였다.

Gel을 0.5 μ g/ml 농도의 ethidium bromide 용액에 30분간 염색하고, 다시 증류수에 40분이상 세척한 후 UV transilluminator로 밴드를 확인하였다.

III. 결 과

총 3,219건의 검체를 수거해 이중 65 (2.0%)주의

*Y. enterocolitica*를 분리해 내었는데 연도별로 채취된 약수 검체수와 균 분리율을 살펴보면 1994년에 831건중 5주(0.6%), 1995년 824건중 11주(1.3%), 1996년 416건중 6주(1.4%), 1997년 388건중 2주(0.5%), 1998년 382건중 25주(6.5%), 1999년 378건중 16주(4.2%)등이 분리되었다.

약수에서 분리된 *Y. enterocolitica* 65주의 생화학적 성상은 Table 2.에 표시된 것과 같이 Ewing의 결과와는 약간의 차이가 있었다.

모든 균주가 TSI에서 A/A를 나타내었으며 urease, M.R.(37 $^{\circ}$ C), nitrate, motility(25 $^{\circ}$ C), sorbitol, maltose, manitol, arabinose, mannose, trehalose, xylose는 100% 양성을 나타내었고, H₂S, arginine, lysine, oxidase, citrate, DNase, motility(37 $^{\circ}$ C), glucose gas, dulcitol, adonitol, lactose, raffinose는 100% 음성을 나타내었다.

in vitro 독성시험에서는 AAG 및 CRMOX의 양성률이 각각 9.2%와 4.6%로 나타났다(결과생략). 한편 Multiplex-PCR의 타당성을 알아보기 위해 각각의 유전자에 대한 PCR을 실시하였는데 Fig.2는 시험균을 대상으로 *ail*과 *yst* primer를 가지고 이들 유전자에 대한 소유 유무를 알아본 결과이다. 먼저 *ail*과 *yst* 유전자의 각각에 대한 증폭결과는 아무런 제약없이 잘 나타났으므로 여기선 2개의 primer를 동시에 사용하여 약수에서 분리된 균주 65주와 표준균주 3주, 그리고 돼지에서 분리된 O:3a, O:3b 2주에 대해 증폭반응을 실시하였다.

Table 3. Oligonucleotide primers used in multiplex-PCR

Primer	Oligonucleotide sequence(5'→3')	Location within gene	Product size(bp)
<i>Ail</i> -a	TGGTTATGCGCAAAGCCATTGT	580-600	356
<i>Ail</i> -b	TGGAAAGTGGGTTGAATTGCA	915-934	
<i>Yst</i> -a	GTCTTCATTTGGAGGATTCGGC	152-173	134
<i>Yst</i> -b	AATCACTACTGACCTTCGGCTGG	264-285	
<i>VirF</i> -a	GCTTTTGCTTGCCTTTAGCTCG	754-775	231
<i>VirF</i> -b	AGAATACGTCGCTCGCTTATCC	962-983	
Y. 16S-86f	GCGGCAGCGGAAGTAGTTTA	66-86	749
B. 16S-794r	TACAGCGTGGACTACCAGGGT	794-814	

Lane 1의 표준균주인 *Y. enterocolitica* ATCC 9610 균주는 134bp의 *yst* 유전자는 소유하고 있었으나, 356bp의 *ail* 유전자는 결핍되어 있었고 Lane 2의 *Y. enterocolitica* ATCC 27729와 Lane 3의 ATCC 23715는 두가지의 유전자를 모두 지니고 있는 것으로 확인되었다. 또한 본 실험실에서 소유

하고 있던, 돼지에서 분리한 병원성 *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b 균주도 두가지의 병원성 유전자를 모두 소유하고 있었다. 그러나 약수에서 분리한 균주인 Lane 6, 7(*Y. enterocolitica* strain No. 1, 2) 외 나머지 63주(결과 생략)는 이들 병원성 유전자들의 어느 한가지도 소유하고 있지 않은 것

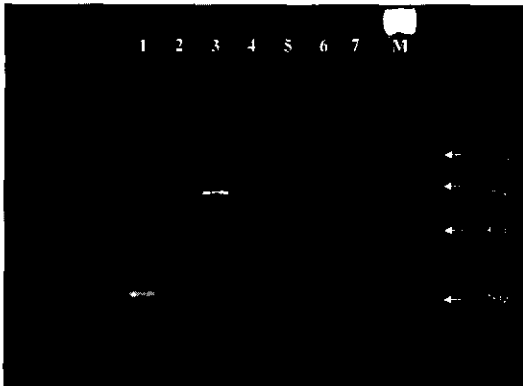


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of nucleic acid amplification products from *Y. enterocolitica* using *ail*, *yst* primers. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7; *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC 27729; ATCC 23715, *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b, *Y. enterocolitica* strain 1 and 2, respectively. M, 123 bp DNA ladder.

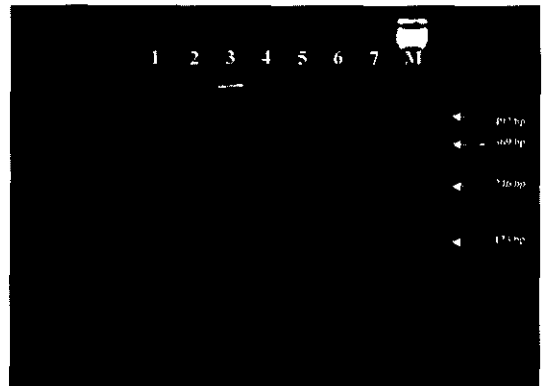


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of nucleic acid amplification products from *Y. enterocolitica* using subgenus-specific primer pair. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7; *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC 27729, ATCC 23715, *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b, *Y. enterocolitica* strain 1 and 2, respectively. M, 123 bp DNA ladder.

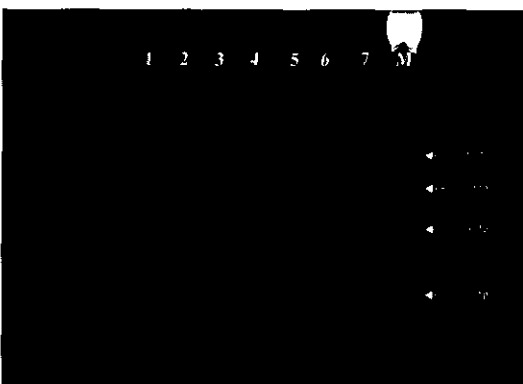


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of nucleic acid amplification products from *Y. enterocolitica* using *virF* primers. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7; *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC 27729, ATCC 23715, *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b, *Y. enterocolitica* strain 1 and 2, respectively. M, 123 bp DNA ladder.

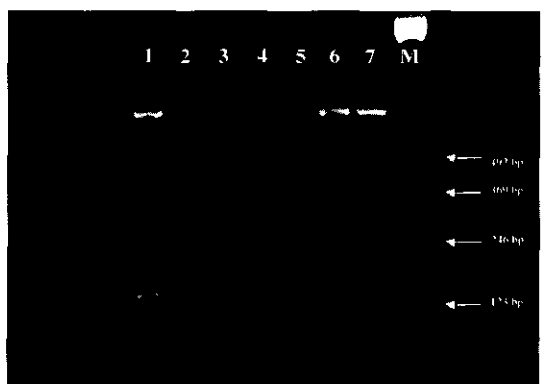


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of nucleic acid amplification products by multiplex-PCR. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7; *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC 27729, ATCC 23715, *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b, *Y. enterocolitica* strain 1 and 2, respectively. M, 123 bp DNA ladder.

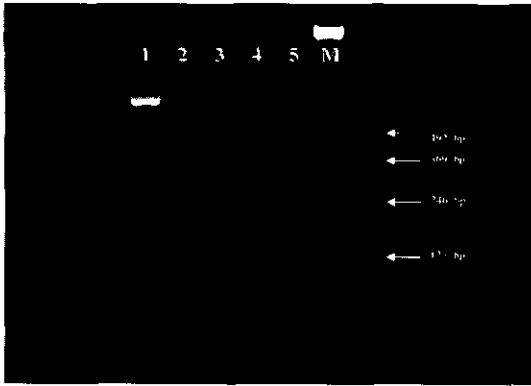


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of nucleic acid amplification products from *Y. enterocolitica*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahemolyticus* and *Staphylococcus aureus* using subgenus-specific primer pair. Lane 1, 2, 3, 4, and 5; *Y. enterocolitica* ATCC 27729, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahemolyticus* and *Staphylococcus aureus*, respectively. M, 123 bp DNA ladder.

으로 나타났다.

다음으로는 plasmid 위에 위치한 *virF* 유전자의 존재 유무를 알아보았다. Fig. 3에 나타난 결과를 살펴보면 *Y. enterocolitica* ATCC 9610과 *Y. enterocolitica* ATCC 23715는 *virF* 유전자의 존재가 확인되지 않았고, *Y. enterocolitica* ATCC 7729와 돼지에서 분리한 O:3a, O:3b균만이 *virF* 유전자의 존재를 확인할 수 있었다. 그러나 Lane 6, 7(*Y. enterocolitica* strain 1, 2)의 나머지 63주(결과 생략) 모두는 *virF* 유전자를 소유하지 않은 것으로 나타났다.

Fig. 4는 subgenus-specific primer pair를 이용하여 *Yersinia*속군을 확인한 실험결과이다. Lane 1, 2, 3의 표준균주를 포함하여 Lane 4, 5의 돼지에서 분리한 *Y. enterocolitica* O:3a, O:3b 균주 그리고 Lane 6, 7의 약수에서 분리된 균주 2주의 나머지 63주(결과 생략) 모두가 이러한 749 bp의 유전자를 소유하고 있는 것으로 나타났다. Fig. 6은 이러한 749bp의 band를 생성하는 유전자가 과연 올바르게 *Yersinia* 속군을 구별해 내는가의 특이성 여부를 알아본 결과인데, 시험균주로는 그람 음성

균인 *E. coli* O157: H7과 *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahemolyticus*, *Staphylococcus aureus*가 사용되었다. 결과를 보면 모든 *Y. enterocolitica*는 이러한 유전자를 소유하고 있었지만 다른 속군의 균주들은 전혀 749bp의 유전자를 소유하지 않은 것으로 나타났다.

마지막으로 Fig. 5는 이러한 실험 결과들을 토대로, 여러가지 시험 균주들을 대상으로 병원성 유전자의 소유 유무를 가늠할수 있는 multiplex-PCR를 시행한 결과이다. 4가지 primer를 복합적으로 사용한 결과 *virF* 유전자의 발견은 어려웠고 나머지 유전자인 *ail*과 *yst*, 그리고 subgenus-specific primer pair는 Lane 2, 3의 표준균주 2주와 돼지에서 분리된 병원성 균주인 O:3a, O:3b의 2주에 대해 뚜렷이 증폭된 밴드를 형성하였다. 그러나 Lane 6, 7의 약수에서 분리된 균주 2주의 나머지 63주(결과생략)는 subgenus-specific primer pair에 대한 밴드 생성만 뚜렷이 나타날 뿐 다른 병원성 유전자에 대한 밴드는 발견이 되지 않아, 약수에서 분리된 65주의 *Y. enterocolitica* 균주들은 모두가 병원성이 전혀 없는 것으로 확인되었다.

IV. 고 찰

약수에서 분리된 *Y. enterocolitica*의 분리율과 생화학적 성상은 기존의 연구보고와 비교해 볼 때 다양한 차이가 발견되는데 이러한 현상은 분리과정에서의 개인의 숙련도 및 여러 환경적 요소의 차이, 지역간, 검체간 균주의 다양한 분포차이 그리고 장기간의 보존에서 비롯된 균주의 사멸 등에서 기인된 것으로 풀이될 수 있다.

현재 병원성 *Yersinia* 균을 동정하는 방법에는 생물형과 혈청형의 분석자료가 역학적 연구에 있어 중요한 기초 자료가 되나¹⁴⁾ 병원성 여부의 연관성이 비특이적이고 시간소비적, 주관적인 성향이 반영되므로 비합리적인 면이 없지 않다.

전통적으로 병원성 *Y. enterocolitica*는 여러 가지 병원성 관련 표지인자인 *ail*, *inv*, *yst*, *virF* 등을 갖추고 있어 이러한 인자들에 대한 검사가 일부 시행되고 있는 실정이다^{15,16)}.

*Y. enterocolitica*의 병원성은 *ail*, *inv*, *yst*, *virF*

유전자중 어느 한 가지만으로는 완전한 독성을 나타내지 못하므로 조합하여 분석하는 것이 바람직하다 하겠다^{5,13}. 그러나 *inv*는 *Y. enterocolitica*와 *Y. pseudotuberculosis*와의 감별성이 부족하여 본 실험에서는 제외하였고 대신 부착과 침습에 관여하는 유전자로 356 bp의 생성물을 형성하는 *ail* 유전자와 134bp 길이의 heat-stable enterotoxin을 생성하는 *yst* 그리고 plasmid에 위치하여 세균외막 단백질 생성에 관여하는 231bp의 *virF* 유전자 또한 *Yersinia* 속군만을 검출할 목적으로 749bp을 생성하는 subgenus-specific primer pair를 이용하여 multiplex-PCR을 수행하였다. 그 결과 다른 장내세균들과 더불어 병원성, 비병원성 *Y. enterocolitica*를 특이적으로 감별할수 있었는데 이 방법은 앞으로도 환자와 동물 그리고 약수에서 분리되는 *Y. enterocolitica*의 분리·동정에 유용하게 사용될 수 있는 매우 효과적인 방법으로 생각된다.

김¹⁷⁾, 박 등¹⁸⁾의 보고에서는 약수에서 분리된 균주들 중 10% 내외의 균주들이 병원성이 인정된다고 하였는데 본 실험에서는 전혀 병원성을 발견할 수 없었다. 이러한 차이는 표현형적인 방법인 생물형, 혈청형적 분석방법에 기초해 *in vitro* 병원성 시험 및 plasmid의 존재 유무만을 가지고 판단하였기 때문에 본 실험 방법인 유전자를 이용한 방법과는 큰 차이가 난 것으로 사료된다.

이상의 결과로 국내 약수에서 분리된 65주의 *Y. enterocolitica*는 *in vitro* 시험과 병원성 유전자의 유무로 판단해 볼 때 병원성이 전혀 없는 것으로 확인되었고, 병원성 *Yersinia* 속군만을 진단 및 동정하는데 이러한 multiplex-PCR 방법이 신속, 정확도에 있어서 매우 효과적임을 알수 있었으며 기존의 고전적인 분석방법을 대체함은 물론이고 역학적 연구에 있어서 보다 큰 가치를 제공할 수 있는 방법이라 판단된다.

V. 결 론

서울시 25개 자치구에 분포한 380여곳의 약수 검체 3,219건을 대상으로 총 65(2.0%)주의 *Y. enterocolitica*를 분리하였고 이들 균에 대한 생화학적 특성 및 multiplex-PCR를 이용한 병원성 확

인시험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리균의 생화학적 특성은 TSI가 A/A였고, urease, nitrate, motility(25°C), sorbitol, maltose, manitol, arabinose, mannose, trehalose, xylose가 100% 양성하였고, H₂S, arginine, lysine, oxidase, citrate, V.P.(37°C), DNase, motility(37°C), dulcitol, adonitol, lactose, raffinose등은 100% 음성이었다.
2. *in vitro* 독성시험에서 AAG 및 CRMOX의 양성률은 각각 9.2%와 4.6%로 나타났으나, multiplex-PCR을 이용한 병원성 유전자의 확인시험에서는 분리된 65주 모두 병원성이 없는 것으로 확인되었다.
3. 병원성 유전자인 *ail*, *yst*와 subgenus-specific primer pair를 이용한 multiplex-PCR 방법은 *Y. enterocolitica*의 병원성 유무를 신속히 동정하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Goverde, R.L., Jansen, W.H., Brunings, A.J., Huis, H.J. and Mool, F.R. : Digoxigenin-labelled *inv* and *ail*-probes for the detection and identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical specimens and naturally contaminated pig samples. *Journal of Applied Bacteriology*, 74:301-313, 1993.
2. Ibrahim, A., Liesack, W. and Stackebrandt, E. : Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 1942-1947, 1992.
3. Miller, V. L., Farmer III, J.J., Hill, W.E. and Falkow, S. : The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infection and Immunity*, Jan. 121-131, 1989.
4. Miller, V. L. and falkow, S. : Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*, May. 1242-1248, 1988.

5. Nilsson, A., Lambertz, S.T., Stalhandske, P., Norberg, P. and Danielsson-Tham, M.L.: Detection of *Yersinia enterocolitica* in food by PCR amplification. *Letters in Applied Microbiology*, 26:140-144, 1998.
6. Pierson, D. E. and Falkow, S.: Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. *Infection and Immunity*, Apr.1059-1064, 1990.
7. Ewing, W. H.: Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed., Elsevier science publishing Co., New York, 461-476, 1986.
8. Krieg, N. R., Holt, J. G.: Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, 498-506, 1984.
9. Cornelis, G., Laroche, Y., Balligand, G., Sory, M. P. and Wauters, G.: *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Reviews of Infectious Diseases*, 9: No.1, January-February, 1987.
10. Laird, W. J. and Cavanaugh, D. C.: Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersiniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 430-432, 1980.
11. Schiemann, D. A., Devenish, J. A. and Toma, S. Characteristics of virulence in human isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infections and Immunity*, Apr. 400-403, 1981.
12. Gerhard, T.P., Wood, W. A. and Krig, N. R.: Method for general molecular bacteriology.: American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1994.
13. Harnett, N., Lin, Y. P and Krishnan, C.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.*, 117:59-67, 1996.
14. 최철순, 박석기, 윤용덕, 정상인, 양용태: 한국의 동물(돼지와 개)에서 분리된 *Yersinia* 균종과 *Yersinia enterocolitica*의 혈청군과 생물형. *대한미생물학회지* 제25권 제1호. 1-8, 1990.
15. Delor, I., Kaeckinbeeck, A., Wauters, G. and Cornelis, G.R.: Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *Yersiniae*. *Infection and Immunity*, Sept. 2983-2988, 1990.
16. Miller, V. L., Bliska, J. B. and Falkow, S.: Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* *ail* gene and characterization of the *ail* protein product. *Journal of Bacteriology*, Feb. 1062-1069, 1990.
17. 김미희: 부산시내 약수터에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 특성. 부산대학교 환경대학원 환경과학과. 석사학위논문, 1997.
18. 박옥자: 마산과 창원지역의 약수터에서 분리된 *Yersinia enterocolitica*의 생물형, 혈청형 및 병원성 검사. 경남대학교 산업대학원. 석사학위논문, 1996.