

## *Yersinia enterocolitica*의 시험관내 병원성 성장, plasmid 보유 및 외막 단백질(OMP) 생산간의 관계

박석기\* · 최철순\*\* · 전윤성\*\*\*

서울특별시 보건환경연구원\*

중앙대학교 의과대학\*\*

서울대학교 수의과대학\*\*\*

(1992. 3. 10 접수)

Relationships between in-vitro virulence-associated characteristics,  
plasmid-bearing and production of Outer Membrane Protein(OMP) of  
*Yersinia enterocolitica* isolated from pigs

Seog-gee Park\*, Chul-soon Choi\*\*, Yun-seong Jeon\*\*\*

Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment\*

College of Medicine, Chung-Ang University\*\*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*\*\*

(Received Mar 10, 1992)

**Abstract :** Two hundred and eighty nine strains of *Yersinia enterocolitica* isolated from healthy pigs were tested for the presence of 40~50 Megadalton virulence-associated plasmids and plasmid-mediated *in vitro* virulence-associated properties, i.e., congo red uptake, calcium dependency, autoagglutination, CRMOX reaction, crystal violet binding and pyrazinamidase reaction. The correlations between *in vitro* virulence-associated properties and the presence of 220 Kdalton outer membrane protein(OMP) were examined in strains with or without virulence-associated plasmids. The correlations between the presence of plasmids on the production of the OMP and the expression of *in vitro* virulence-associated properties were studied with CRMOX<sup>+</sup> strains and acridine orange-cured CRMOX<sup>-</sup> mutants. The results were as follows :

1. Of the *in vitro* virulence-associated tests with 289 strains of *Y enterocolitica*, 275 strains(95.2%) were positive for pyrazinamidase test, and followed by in order of crystal violet binding test, 226(79.2%) ; CRMOX test, 190(65.7%) ; autoagglutination test, 185(64.0%) ; calcium dependency test, 86(29.8%) and congo red uptake test, 47(16.3%).

2. The correlation between autoagglutination and CRMOX test( $r=0.90$ ) was highly significant ( $p<0.01$ ).

3. In 190 strains(65.7%) bearing the virulence-associated plasmids(MW 40~50 Mdalton), the correlation between the presence of plasmids and their *in vitro* virulence-associated properties were highest with CRMOX test( $r=0.93$ ) and followed by in orders of AAG test(0.81), CV test(0.46), PYZ test(0.37) and CD test(0.18), but no correlation between the presence of plasmids and

CR test(-0.11).

4. The CRMOX<sup>+</sup> strains produced the 220 Kdalton OMP when they were cultured at 37°C, but not at 26°C. The presence of 220 Kdalton OMP was correlated significantly with *in vitro* virulence properties and the presence of virulence-associated plasmid, respectively.

5. In the isogenic CRMOX<sup>-</sup> mutant strains, of which plasmid were cured by treatment with acridine orange not only *in vitro* virulence-associated properties(CR 100%, CD 100%, AAG 82.6%, CV 58.3%) disappeared but also 220 Kdalton OMP(100%) was not produced.

These results indicate that the positive CRMOX reaction is plasmid-mediated and the CRMOX test is potential as an *in vitro* virulence tests with *Y enterocolitica*.

**Key words :** *Yersinia enterocolitica*, *In vitro* virulence associated characteristics, Outer membrane protein, Plasmid-bearing.

## 서 론

*Y enterocolitica*는 사람, 각종 동물, 음식물 등에 광범위하게 분포하지만 사람에게 질병을 일으키는 균주의 전염원은 가축, 애완동물 그리고 오염된 식품으로 추정된다.<sup>1,2,3</sup> 특히 이 세균은 돼지로부터 가장 많이 분리되며 이 동물에서 분리한 균주는 제한효소를 이용한 DNA 분석에서 인체분리균과 동일성을 나타냈다는 사실<sup>4</sup>과 사람과 돼지에서 분리된 균주의 생물형과 혈청형이 유사하다는 사실<sup>2,5,6</sup>로 보아 돼지는 사람에게 대한 *Yersinia*감염증의 전염원 역할을 한다고 추정된다. 그러므로 돼지로부터 *Y enterocolitica*의 분리 및 분리균에 대한 생물형, 혈청형 및 병원성 조사는 *Yersinia* 감염증의 예방대책을 세우는데 중요한 기초자료가 된다.

*Y enterocolitica*는 특정 소동물(친칠라, 토끼)과 사람에서만 병원성을 나타낼 뿐, 병원성 검사를 위한 실험동물 모델이 개발되어 있지 않기 때문에 자연환경물과 건강보균동물에서 분리되는 *Y enterocolitica*에 대한 병원성 검사는 생물형 조사, 혈청형 조사, 파지형 조사 및 병원성 관련 plasmid에 의하여 지배되는 시험관내 검사특성에 의존하고 있다.<sup>11-28</sup>

자연계에 널리 분포하는 *Y enterocolitica*의 생물형과 혈청형은 지역과 동물에 따라 차이가 있다. 즉, 생물형 3형/혈청형 0:1, 2, 3, 0:5, 27 형은 친칠라에, 생물형 5형/혈청형 0:2, 3 형은 산토끼와 염소에, 생물형 4형/혈청형 0:3 형, 생물형 2형/혈청형 0:9 형, 생물형 1형/혈청형 0:8 형 등은 돼지와 사람에게 각각 병원성을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>3,7</sup> 그러나 1968~1975년 사이 미국 캘리포니아에서 위장관염 환자에서 분리된 균주는 주로 0:8형과 0:5형이었으나,<sup>8</sup> 1978~1989년 사이에는 40% 이상이 비병원성으로 알려졌던 다른 혈청형에 속하였다.<sup>9</sup> 이 성적은 *Y enterocolitica*의

병원성은 혈청형 및 생물형보다는 다른 병원성인자에 의하여 결정된다는 것을 암시한다.

*Y enterocolitica*의 병원성 관련 시험관내 특성시험으로는 자가응집성<sup>10,11</sup>, 칼슘 의존성<sup>12,13</sup>, congo red흡착성<sup>14</sup>, crystal violet 결합성<sup>15</sup>, pyrazinamidase 결핍성<sup>16</sup>, 43~50 Kdalton plasmid 보유<sup>17</sup>, 220 Kdalton세포 외막 단백질합성<sup>18~21</sup>, 인체 호중구의 Chemiluminescence 반응의 방해<sup>22</sup>, 혈청살균력에 대한 저항성 증가<sup>23,24</sup>, fibrin 구조물의 생성<sup>25,26</sup>, 세포표면 전위의 변화<sup>27</sup> 및 마우스 거대세포에 대한 독성<sup>28</sup> 등이 보고되어 있다.

Bottonne<sup>29</sup>는 *Y enterocolitica*의 배양온도에 따른 형태학적 차이는 병원성 플라스미드에 의하여 영향을 받는다고 하였다. Portnoy et al<sup>20</sup>은 이 균을 37°C에서 배양할 때 형성되는 네가지 새로운 세포외막 단백질은 병원성 플라스미드의 지배를 받는다고 하였다. 또 Boelin et al<sup>30</sup>은 *Y enterocolitica* 0:9형을 BHI 배지에서 37°C로 배양할 때 형성되는 다섯가지 외막 단백질 분획(POMP)은 플라스미드의 지배를 받으며 2mM Ca<sup>++</sup> 존재하에서 합성되지 않는다는 것을 알았다. POMP의 형성이 플라스미드에 의하여 지배된다는 것은 Martinez<sup>19</sup>와 Skurmik et al<sup>31</sup>에 의하여 확인되었으며, Boelin et al<sup>30</sup>은 이 세포성분을 YOP라 명명하였다. 또한 Skurnik<sup>32</sup>는 immunoblotting 방법과 항원항체반응에 의하여 외막 단백질들은 균체를 26°C에서 배양할 때 형성되지 않으므로 온도의존성이라는 것을 알았다.

그러나 이들 시험관내 검사성적들과 숙주동물에서의 병원성 시험성적간의 상관관계는 연구자에 따라 차이가 많다. 즉, 환자에서 분리한 *Y enterocolitica* 일부 균주의 동물에 대한 병원성과 시험관내 병원성 관련 시험결과간에는 상관관계가 있으나<sup>13,33,34</sup>, 일부 균주에서는 상관관계가 없다.<sup>35-38</sup> 특히 건강한 보건동물에서 분리된 균주의 사람과 동물에 대한 병원성 유무는 아직도 논란이 많다. 그러나 일부 연구자<sup>39,40</sup>는 건강한

보균동물에서 분리한 *Y enterocolitica*의 사람과 다른 감수성 동물에 대한 병원성은 병원성 관련 플라스미드의 분리와 220 Kdalton 의막 단백질의 확인으로 추정할 수 있다고 하였다. 그러나 *Y enterocolitica*의 장독소 생산과 병원성 플라스미드 보유간에 성적이 일치되지 않는다.<sup>14</sup> 그러므로 이 연구에서 *Y enterocolitica*의 병원성 검사에서 가장 적합한 시험관내 검사법을 규명하고자 병원성 관련 특성과 플라스미드 보유간의 관계를 조사하기 위하여 건강한 돼지에서 분리한 *Y enterocolitica*에 대하여 여러가지 시험관내 병원성 관련 시험을 실시하고 병원성 플라스미드 보유균주와 acridine orange로 처리하여 플라스미드를 제거한 균주에서의 각종 병원성 관련 특성을 비교하였다.

## 재료 및 방법

**실험균:** 건강한 성돈의 분변에서 분리된 *Y enterocolitica* 289주를 사용하였다. 생물형은 Winblad<sup>42</sup>와 Cornelis 등<sup>43</sup>의 방법에 따라 8개 생물학적 특성에 의하여 분류하였으며 혈청형은 균체 0항원과 응집반응에 의하여 형을 조사하였다.

모든 균주는 Prpic et al<sup>4</sup>의 방법에 따라 1% peptone-34% glycerol로 진한 균액을 만들어 -30°C에 보관하고 semisolid agar 배지에 천자배양한 후 5°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

시험관내 병원성 관련시험: *Y enterocolitica*의 시험관내 병원성 관련시험은 Congo red 흡착시험(CR), 칼슘 의존성 시험(CD), 자가 응집시험(AAC), Crystal violet 결합시험(CV), CRMOX시험(CRMOX) 및 Pyrazinamidase 시험(PYZ)을 실시하였다.

Congo red 흡착시험은 Prpic et al<sup>4</sup>의 방법으로 실시하였다. 즉, 시험배지에 실험균을 희석 도말한 다음 26°C와 37°C에서 1주일간 배양하는 동안 congo red를 흡착하여 적색 집락을 나타내는 균주를 양성으로 판정하였다.

칼슘 의존성시험은 Higuchi와 Smith<sup>12</sup> 및 Gemski et al<sup>13</sup>의 방법에 따랐다. 즉, tryptic soy broth에 26~28°C에서 하룻밤 배양된 균을 생리식염수로 ml당  $2 \times 10^4$  균의 되도록 희석한 다음 10μl를 MOX agar와 blood agar base 배지(대조군)에 각각 희석 도말하여 37°C와 26°C에서 24~48시간 배양하였다. MOX agar 배지에서 37°C로 배양할 때 성장 집락수가 극히 드문 반면 blood agar base와 26°C 배양시에는 많은 집락이 정상적으로 자라는 균주를 양성으로 판정하였다.

자가 응집시험은 Laird와 Cavanaugh<sup>10</sup>의 방법에 따

랐다. 즉, 10% calf serum과 25mM HEPES 완충액(N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethane-sulfonic acid, Sigma)을 함유하는 MEM을 3ml씩 넣은 두 시험관에 tryptic soy agar 사면배지에서 26°C 2일간 배양한 균을 접종하고 26°C와 37°C에서 각각 18시간 배양하였다. 26°C 배양시 균등한 혼탁 발육을 나타내나 37°C 배양시에는 균체가 응집되어 시험관 바닥에 침전되고 상층액이 맑게 되는 균주를 양성으로 판정하였다.

CV 결합시험은 Bhaduri et al<sup>5</sup>의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, 실험균을 BHI broth에 26°C 18시간 배양한 다음 ml당  $2 \times 10^3$  균의 농도로 희석하여 BHI agar에 도말하였다. 균을 도말한 평판배지를 26°C와 37°C에서 30시간 배양하였다. 평판배지에 85 μg/ml crystal violet 용액 8ml를 붓고 2분간 반응시킨 다음 평판배지상의 색소액을 쏟아 버렸다. Crystal violet와 결합하여 짙은 청색집락을 나타내는 것을 양성으로 그리고 색소와 결합하지 않은 백색집락을 음성으로 판정하였다.

CRMOX 시험은 Riley와 Toma<sup>44</sup>의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, CRMOX 배지는 다음과 같이 만들었다. Tryptic soy agar 40g을 증류수 825ml에 녹이고 121°C 15분간 고압멸균하여 55°C로 식힌 다음 각각 따로 멸균한 0.25M Sodium oxalate 80ml, 0.25M Magnesium chloride 80ml, 1% Congo red 5ml, 20% D-galactose 10ml를 모두 섞어 잘 혼합한 다음 페트리디쉬에 부어 평판배지를 만들었다. 실험균은 5% blood agar 평판에서 26°C 18시간 배양된 균체를 CRMOX 배지에 도말하여 37°C 24시간 배양하였다. 집락의 형태가 크고 무색인 집락을 음성으로, 작고 적색인 집락을 양성으로 판정하였다.

Pyrazinamidase 시험은 Kandolo와 Wauters<sup>16</sup>의 방법에 의하여 실시하였다. 배지조성은 tryptic soy agar (TSA) 30g에 yeast extract 3g, pyrazinamide(Sigma) 1g을 0.2M Tris maleate 수용액 1000ml(pH 6.0)에 녹여 만들었다. 시험관(16×160mm)에 배지를 5ml씩 넣고 15Lb 15분간 멸균한 다음 사면배지를 만들었다. TSA에서 26°C에서 하룻밤 배양한 실험균을 이 배지에 심고 26°C에서 48시간 배양하였다. pyrazinamide 분해의 판정은 1% ferrous ammonium sulfate 수용액 1ml를 세균배양 배지에 흘려 넣고 15분간 반응시킬 때 적색 반응을 나타내는 균주를 음성으로, 적색반응이 없는 균주를 양성균주로 판정하였다.

**병원성 플라스미드 분리 및 전기영동:** *Y enterocolitica*에서 40~50 Mdalton 크기의 병원성 플라스미드를 검출하기 위하여 Kado와 Liu<sup>45</sup> 및 Tanaka et al<sup>17</sup>의 방법에 따라 플라스미드를 분리하였다.

즉, 실험균주를 BHI 배지 3ml에 접종하여 26°C에서 18~24시간 배양한 균액을 원심분리하여 집균하였다. 집균한 균체는 TE buffer(40mM Tris-acetate, 2mM EDTA, pH 7.9) 200 $\mu$ l에 부유케한 후 lysing solution(50 mM Tris, 3% sodium dodecyl sulfate, pH 12.4) 400 $\mu$ l를 가하고 55°C에서 1시간 반응후 phenol-chloroform(1 : 1) 용액 600 $\mu$ l씩을 가하고 혼합되도록 천천히 흔들었다. 원심분리하여 상층액을 분리한후 2배 용량의 ethanol과 1/10용량의 3M sodium acetate 용액을 가하고 -20°C에서 하룻밤 정치한 다음 원심분리하여 상층액을 버렸다. 침전물은 증류수 15 $\mu$ l에 용해한후 loading buffer(50% glycerol-0.05M Tris-acetate, pH 7.9-bromecresol purple 0.25%) 3 $\mu$ l를 가하고 전기영동용 재료로 삼았다.

전기영동은 0.7% agarose submarine electrophoresis 로 하였다. Tris-borate buffer(89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0) 하에서 80V로 3시간동안 영동하였다. DNA band는 ethidium bromide 0.5  $\mu$ l/ml를 함유하는 증류수 용액에 30분간 담그어 염색 하였으며 UV transilluminator로 밴드를 확인하였다.

세포외막 단백질 분리 및 SDS-PAGE : 병원성 플라스미드를 가지고 있는 균(P<sup>+</sup>)과 없는 균(P<sup>-</sup>)의 배양조건에 따른 세포외막 단백질 조성의 변화를 Portnoy et al<sup>40</sup>의 방법에 따라 조사하였다.

P<sup>+</sup>와 P<sup>-</sup> 균주를 선택하여 heart infusion broth에 접종하고 37°C 및 26°C에서 24시간 배양한후 원심분리하여 집균하였다. 균체를 10mM Tris-5 mM MgCl<sub>2</sub> 용액(pH 7.5) 1.5ml에 부유하고 초음파 분쇄기(Lab-line Labsonic system)로 15초씩 4회반복하여 균체를 파괴시켰다. 파괴되지 않은 균체는 12,000rpm에서 1분간 원심분리하여 균체를 제거하고 상층액은 4°C에서 30분간 다시 원심분리한후 상층액을 제거하였다. 침전물은 10mM Tris-5mM MgCl<sub>2</sub>-2% Triton X-100 300  $\mu$ l에 부유한후 실온에서 20분간 반응케 하였다. 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거한후 침전물은 증류수에 용해하고 2 $\times$ electrophoresis sample buffer(62.5mM Tris(pH 6.8), 10% glycerol, 0.001% bromphenol blue, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS)를 동량으로 섞은후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다.

전기영동은 Bio-Rad사의 3000Xi power supply와 protean slab cell을 사용하였으며 Laemmli<sup>46</sup> 10% discontinuous polyacrylamide gel에 샘플을 올려놓고 20mA로 12시간 전기영동한 다음 Coomassie blue 염색액으로 염색하였다. 분자량은 Sigma사의 SDS molecular weight

marker(MW-SDS-200 kit)를 사용하여 비교측정하였다.

Acridine orange 처리에 의하여 플라스미드 소실 균주에서 병원성 관련 성상의 변화 : Acridine orange 처리로서 병원성 플라스미드를 제거할 때, *Y enterocolitica* 시험관내 병원성 관련 특성의 변화를 조사하였다. 즉, CRMOX시험에서 병원성 양성인 균주 25주를 선정하여 음성변이주를 얻기 위하여 acridine orange(AO)를 첨가한 배지(25 $\mu$ l/ml)에서 4~5대 계대배양을 실시하여 CRMOX 배지상에서 무색 대형집락을 형성하는 비병원성 변이주를 선별하였다. CRMOX 양성, CRMOX 음성 및 AO 처리 음성변이주에 대하여 CR 촉착성 시험, 칼슘 의존성 시험, 자가응집시험, CV 결합실험의 시험관내 병원성 관련 성상의 변화를 비교하였다.

통계처리 : 두 처리간의 상관계수는 dichotomous nominal scale data에 대한 상관계수 산출법<sup>47</sup>에 의하여 계산하였다. 상관계수의 유의성은 t검정에 의하여 실시하였다.

## 결 과

시험관내 병원성 관련 성상 : 돼지에서 분리한 *Y enterocolitica* 289주에 대한 시험관내 병원성 관련 성상을 CR, CD, AAG, PYZ, CV 및 CRMOX의 여섯가지의 시험관내 병원성 관련시험에 의하여 조사한 성적은 Table 1과 같다.

각 병원성 관련시험의 양성율은 PYZ 95.2%(275/289), CV 78.2%(226/289), CRMOX 65.7%(190/289), AAG 64.0%(185/289), CD 29.8%(86/289), CR 16.3%(47/289)순으로 높았다.

생물형과 시험관내 병원성 관련 성상 양성률 간의 관계를 보면 생물형 1형 9주중 CR<sup>+</sup>, CD<sup>+</sup>, CV<sup>+</sup> 균주는 각각 2주(22.2%)이었으며. AAG<sup>+</sup>, PYZ<sup>+</sup>, CRMOX<sup>+</sup> 균주는 없었다. 생물형 2형 49주중 49주 모두(100%) PYZ<sup>+</sup> 주 이었으며, CV<sup>+</sup>과 CRMOX<sup>+</sup> 각 38주(77.6%); AAG<sup>+</sup> 34주(69.4%); CR<sup>+</sup>과 18주(36.7%) 그리고 CD<sup>+</sup> 16주(32.7%)이었다. 생물형 3형 2주는 CD 시험과 AAG시험에서 각각 1주가 양성이었으며, PYZ, CV, CRMOX 시험에서는 모두 양성이었다. 생물형 3A형 41주는 PYZ<sup>+</sup> 38주(92.7%); CV<sup>+</sup> 34주(82.9%); AAG<sup>+</sup> 24주(58.5%); CRMOX<sup>+</sup> 22주(53.7%); CD<sup>-</sup> 7주(17.1%) 그리고 CR<sup>+</sup> 2주(4.9%)이었다. 3B형 165주중 PYZ<sup>+</sup> 주는 163주(98.2%); CV<sup>+</sup> 130주(78.8%); CRMOX<sup>+</sup> 111주(67.3%); AAG<sup>+</sup> 110주(66.7%); CD<sup>+</sup> 56주(33.9%) 그리고 CR<sup>+</sup> 21주(12.1%)이

Table 1. Positivity of *in vitro* virulence-associated characteristics of different biotypes of *Y enterocolitica* isolated from pigs

Biotype	Number of strain	Positive(%)					
		CR*	CD	AAG	PYZ	CV	CRMOX
1	9	2(22.2)	2(22.2)	0	0	2(22.2)	0
2	49	18(36.7)	16(32.7)	34(69.4)	49(100)	38(77.6)	38(77.6)
3	2	0	1	1	2(100)	2(100)	2(100)
3A	41	2(4.9)	7(17.1)	24(58.5)	38(92.7)	34(82.9)	22(53.7)
3B	165	21(12.7)	56(33.9)	110(66.7)	163(98.2)	130(78.8)	111(67.3)
4	23	4(17.4)	4(17.4)	16(69.6)	23(100)	20(86.9)	17(73.9)
Total	289	47(16.3)	86(29.8)	185(64.0)	275(95.2)	226(78.2)	190(65.7)

\*CR : congo red uptake, CD : calcium dependency, AAG : autoagglutination, PYZ : pyrazinamidase test, CV : crystal violet binding, CRMOX : congo red uptake-calcium dependency.

Table 2. Positivity of *in vitro* virulence-associated characteristics of different serotypes of *Y enterocolitica* isolated from pigs

Serotype	Number of strain	Positive(%)					
		CR	CD	AAG	PYZ	CV	CRMOX
0 : 3	231	27(11.7)	67(29.0)	153(66.2)	228(98.7)	189(81.8)	155(67.1)
0 : 9	42	15(35.7)	14(35.7)	27(61.9)	42(100)	32(76.2)	31(73.8)
0 : 21	10	3(30.0)	3(30.0)	4(40.0)	4(40.0)	5(50.0)	4(40.0)
Untypable	6	2(33.3)	2(33.3)	1(16.7)	1(16.7)	0(0)	0(0)
Total	289	47(16.3)	86(29.8)	185(64.0)	275(95.2)	226(78.2)	190(65.7)

See footnote in Table 1.

untypable : strains nonagglutinated with 12 tested 0 group antisera.

었다. 생물형 4형 23주 모두가 PYZ<sup>+</sup> 이었으며, CV<sup>+</sup> 20주(86.9%) ; CRMOX<sup>+</sup> 17주(73.9%) ; AAG<sup>+</sup> 16주(69.6%) 및 CR<sup>+</sup>과 CD<sup>+</sup> 각 4주(17.4%)이었다.

*Y enterocolitica*의 혈청형과 시험관내 병원성 관련 성상 간의 관계는 Table 2와 같다. 즉, 혈청형 0 : 3 231주중 PYZ<sup>+</sup> 228주(98.7%) ; CV<sup>+</sup> 189주(81.8%) ; CRMOX<sup>+</sup> 155주(67.1%) ; AAG<sup>+</sup> 153주(66.2%) ; CD<sup>+</sup> 67주(29.0%) 그리고 CR<sup>+</sup> 27주(11.3%)이었다.

혈청형 0 : 9 42주중 42주 모두 PYZ 양성이고, CV<sup>+</sup> 32주(76.2%) ; CRMOX<sup>+</sup> 31주(73.8%) ; AAG<sup>+</sup> 27주(61.9%) ; CR<sup>+</sup> 15주(35.7%) 그리고 CD<sup>+</sup> 14주(33.3%)이었다. 혈청형 0 : 21형 10주중 CV<sup>+</sup> 5주(50.0%) ; AAG<sup>+</sup>, PYZ<sup>+</sup> 및 CRMOX<sup>+</sup> 각 4주(40.0%)이었으며 CR<sup>+</sup>과 CD<sup>+</sup> 각 3주(30.0%)이었다. 혈청형 미분류 군주 6주중 CR<sup>+</sup>와 CD<sup>+</sup> 각 2주(33.3%) ; AAG<sup>+</sup>와 PYZ<sup>+</sup> 각 1주(16.7%) 그리고 CV<sup>+</sup>와 CRMOX<sup>+</sup>은 없었다.

*Y enterocolitica*의 시험관내 병원성 관련시험의 조합간의 양성율을 비교한 성적은 Table 3과 같다. 즉, 생물형 1형 9주중 CV단일 양성과 CR-CD 양성은 각 2주(22.2%)이었으며 5주는 모두 반응에서 음성이었다. 생물형 2형 49주중 AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성주는 15주(30.6%) ; CR-AAG-CRMOX-CV-PYZ와 CR-CD-

AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성주는 각 7주(14.3%) 그리고 pyz 단일 양성 6주(12.2%)이었다. 생물형 3형 2주는 CRMOX-CV-PYZ와 CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 각 1주씩이었다. 생물형 3A형 41주중 AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성주는 12주(29.3%) ; CV-PYZ 양성주 10주(24.4%) ; PYZ 단일 양성주 7주(17.1%) ; CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성주 5주(12.2%)이었다. 생물형 3B형 165주중 AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성주는 50주(30.5%) ; CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ 29주(17.6%) ; CV-PYZ 양성 23주(13.9%) ; PYZ 단일 양성 20주(12.1%) ; CR-CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성주는 10주(6.1%)이었다. 생물형 4형 23주중 AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 9주(39.1%) ; CV-PYZ 양성 4주(17.4%) ; AAG-CRMOX-PYZ 양성 각 2주(8.7%)이었다.

한편 *Y enterocolitica* 각 혈청형별 시험관내 병원성 관련 특성 패턴은 Table 4와 같다. 즉, 혈청형 0 : 3형 231주중 AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 73주(31.6%) ; CV-PYZ 양성 37주(16.0%) ; CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 36주(15.6%) ; PYZ 단일 양성 27주(11.7%) ; CR-CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 13주(5.6%)이었다. 0 : 9형 42주중 AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 12주(28.6%) ; PYZ 단일 양성과 CR-AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 각 6주(14.3%) ; CR-CD-AAG-CRMOX-CV-

Table 3. Positivity of combinations of *in vitro* virulence-associated characteristics of different biotypes of *Y enterocolitica* isolated from pigs

Multiplicity of virulence tests	Positive patterns	Biotype						Total(%)
		1	2	3	3A	3B	4	
1	AAG					1*		1 (0.4)
	CV	2						2 (0.7)
	PYZ		6		7	20	1	34(11.8)
2	AAG-PYZ					1		1 (0.4)
	CR-CD	2				1		3 (1.0)
	CD-PYZ		2					2 (0.7)
	CV-PYZ		2		10	23	4	39(13.5)
3	CR-CD-PYZ					1		1 (0.4)
	CD-CV-PYZ					3		3 (1.0)
	AAG-CRMOX-PYZ		1			4	2	7 (2.4)
	CD-CRMOX-PYZ		1					1 (0.4)
	CR-CV-PYZ		1					1 (0.4)
	AAG-CV-PYZ				2	2	1	5 (1.7)
	AAG-CRMOX-CV				2			2 (0.7)
	CRMOX-CV-PYZ			1		1		2 (0.7)
	CR-AAG-CV-PYZ					1		1 (0.4)
	CD-AAG-CRMOX-PYZ					5		5 (1.7)
4	AAG-CRMOX-CV-PYZ		15		12	50	9	86(29.8)
	CR-CRMOX-CV-PYZ		1				1	2 (0.7)
	CD-AAG-CRMOX-CV				1			1 (0.4)
	CD-CRMOX-CV-PYZ					5	1	6 (2.1)
	CR-CD-CV-PYZ					1		1 (0.4)
	CR-AAG-CRMOX-PYZ					1		1 (0.4)
	CR-CD-CRMOX-CV-PYZ		1					1 (0.4)
	CR-AAG-CRMOX-CV-PYZ		7		1	5	1	14 (4.8)
	CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ		4	1	5	29	1	40(13.8)
	CR-CD-AAG-CRMOX-PYZ		1			1		2 (0.7)
6	CR-CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ		7		1	10	2	20 (6.9)
	Negative	5						5 (1.7)
	Total	9	49	2	41	165	23	289

\*: number of positive strains.

See footnotes in Table 1.

PYZ 양성 5주(11.9%) ; CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ 양성 4주(9.5%)이었다. 0: 21형 10주중 CV 단일 양성과 CR-CD-CRMOX-CV-PYZ 양성이 각 2주(20.0%)이었고, 미분류형 6주중 CR-CD 양성이 2주(33.3%) 및 음성군 2주이었다.

시험관내 병원성 관련 특성간의 상관관계 : *Y enterocolitica*의 시험관내 병원성 관련 특성간의 상관관계는 Table 5와 같다. 즉, AAG와 CRMOX 반응 간의 상관관계( $r=0.90$ )가 가장 높았으며 CD와 CRMOX(0.79), CV와 PYZ(0.74), CD와 AAG(0.69), CR과 CD(0.64), CR과 AAG(0.54), CRMOX와 PYZ(0.44), CRMOX와 CV(0.39), AAG와 PYZ(0.33), AAG와 CV(0.28), CD와 PYZ(0.23), CV와 CD(0.18)에서는 상관관계가 있었으나( $p<0.01$ ), CR과 CV(0.03), CR과 PYZ

(-0.13)에서는 상관관계가 없었다.

병원성 플라스미드와 시험관내 병원성 관련 특성과의 관계 : 돼지에서 분리한 *Y enterocolitica*의 병원성 관련성상과 병원성 플라스미드 보유간의 관계를 조사하기 위하여 plasmid DNA를 검출한 성적은 Table 6과 같다(Fig 1 참조). 총 289주중 190주(65.7%)에서 40~50Mdalton 크기의 플라스미드가 검출되었다. 각 병원성 관련 특성과의 관계를 보면 CRMOX<sup>+</sup> 190주중 185주(97.4%)와 CRMOX<sup>-</sup> 99주중 3주(5.1%)에서 병원성 플라스미드가 검출되었으며, AAG<sup>+</sup> 185주중 174주(94.1%)와 AAG<sup>-</sup> 104주중 16주(15.4%)에서, CD<sup>+</sup> 86주중 79주(91.9%)와 CD<sup>-</sup> 203주중 111주(54.7%)에서, CR<sup>+</sup> 47주중 38주(80.9%)와 CR<sup>-</sup> 242주중 152주(62.8%)에서, CV<sup>+</sup> 226주중 174주(77.0%)와 CV<sup>-</sup> 63

Table 4. Positivity of combination *in vitro* of virulence-associated characteristics of different serotypes of *Y enterocolitica* isolated from pigs

Multiplicity of virulence tests	Positive patterns	Serotype				Total(%)
		0:3	0:9	0:21	UT	
1	AAG				1*	1(0.4)
	CV			2		2(0.7)
	PYZ	27	6		1	34(11.8)
2	AAG-PYZ	1				1(0.4)
	CR-CD			1	2	3(1.0)
	CD-PYZ	1	1			2(0.7)
	CV-PYZ	37	2			39(13.5)
3	CR-CD-PYZ	1				1(0.4)
	CD-CV-PYZ	2	1			3(1.0)
	AAG-CRMOX-PYZ	6		1		7(2.4)
	CD-CRMOX-PYZ		1			1(0.4)
	CR-CV-PYZ		1			1(0.4)
	AAG-CV-PYZ	5				5(1.7)
	AAG-CRMOX-CV	2				2(0.7)
	CRMOX-CV-PYZ	2				2(0.7)
	CR-AAG-CV-PYZ	1				1(0.4)
	CD-AAG-CRMOX-PYZ	5				5(1.7)
4	AAG-CRMOX-CV-PYZ	73	12	1		86(29.8)
	CR-CRMOX-CV-PYZ	1	1			2(0.7)
	CD-AAG-CRMOX-CV	1				1(0.4)
	CD-CRMOX-CV-PYZ	6				6(2.1)
	CR-CD-CV-PYZ	1				1(0.4)
	CD-AAG-CRMOX-PYZ	1				1(0.4)
	CR-CD-CRMOX-CV-PYZ		1			1(0.4)
	CR-AAG-CRMOX-CV-PYZ	8	6			14(4.8)
5	CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ	36	4			40(13.8)
	CR-CD-CRMOX-PYZ	1	1			2(0.7)
	CR-CD-AAG-CRMOX-CV-PYZ	13	5	2		20(6.9)
	Negative			3	2	5(1.7)
	Total	231	42	10	6	289

UT: untypable to 12 standard antisera, \*: number of positive strains.  
See footnotes in Table 1.

Table 5. Relationships between *in vitro* virulence-associated characteristics of *Y enterocolitica*

<i>In vitro</i> virulence-associated characteristics	CR	CD	AAG	CRMOX	PYZ
CD	0.64**				
AAG	0.54**	0.69**			
CRMOX	0.44**	0.79**	0.90**		
PYZ	-0.13	0.23*	0.33**	0.44**	
CV	0.03	0.18*	0.28*	0.39**	0.74**

See footnotes in Table 1.

\*p<0.05. \*\*p<0.01.

주중 16주(25.4%)에서 그리고 PYZ<sup>+</sup> 275주중 187주(68.0%)와 PYZ<sup>-</sup> 14주중 3주(21.4%)에서 플라스미드가 검출되었다.

시험관내 병원성 관련 성장과 병원성 플라스미드 검출간의 상관관계에서 CRMOX반응(0.93); AAG반

응(0.81); CV반응(0.53); PYZ 반응(0.37) 그리고 CD 반응(0.18)은 높은 상관관계를 나타냈으나(p<0.01), CR반응과 플라스미드 양성율간에는 상관관계가 없었다(-0.11).

병원성에 관련된 세포외막 단백질과 병원성 시험

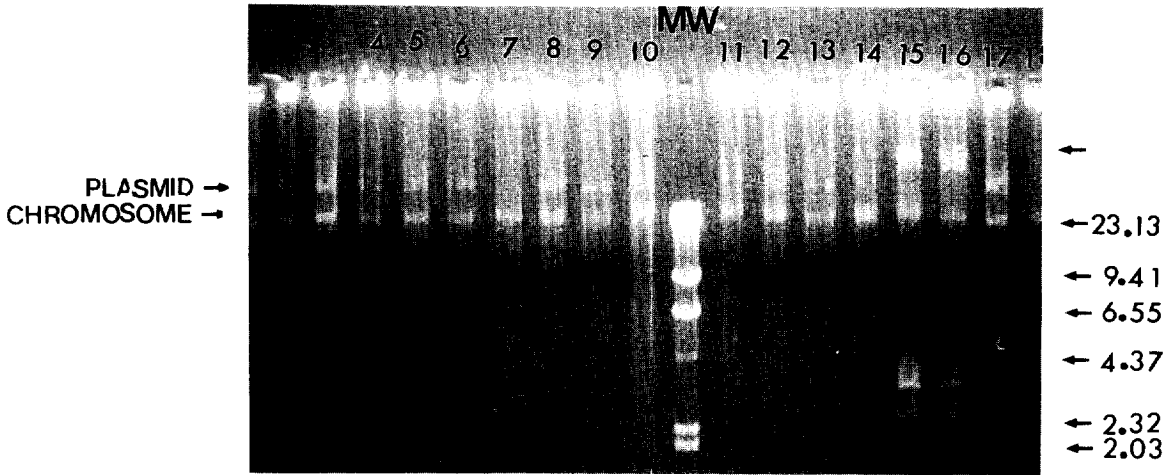


Fig 1. Plasmid DNA profile of *Y. enterocolitica* isolated from swine. Strains in lane 1,3,5,6,8,9,10,11,12,13 and 17 harboured plasmids of 40~50 Mdalton, while strains in lanes 2,4,7,14 and 18 did not. MW marker was used lambda DNA digested with Hind III and strains in lane 15 and 16 harboured plasmids of 80 Mdalton.

Table 6. Relationship between presence of 40 Mdalton plasmid and *in vitro* virulence-associated characteristics of *Y. enterocolitica*

<i>In vitro</i> virulence test		No. of tested organisms	Presence of plasmid		Correlation (r)
			+(%)	-	
CR	+	47	38(80.9)	9	-0.11
	-	242	152(62.8)	90	
CD	+	86	79(91.9)	7	0.18**
	-	203	111(54.7)	92	
AAG	+	185	174(94.1)	11	0.81**
	-	104	16(15.4)	88	
CRMOX	+	190	135(97.4)	5	0.93**
	-	99	5(5.1)	94	
CV	+	226	174(77.0)	52	0.53**
	-	63	16(25.4)	47	
PYZ	+	275	137(68.0)	88	0.37**
	-	14	3(21.4)	11	

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

Table 7. Relationship between the presence of 220 Kdalton outer membrane protein and *in vitro* virulence-associated characteristics of *Y. enterocolitica*

Presence of 220 Kdal ton OMP	No. of strains tested	<i>In vitro</i> virulence test-positive(%)				
		CR	CD	AAG	CRMOX	CV
Positive	25	14(56.0)	21(84.0)	23(92.0)	25(100)	22(88.0)
Negative	14	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	9(64.3)
Correlation(r)		0.44**	0.79**	0.90**	1.00**	0.38*

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

관내 정상간의 관계: *Y. enterocolitica*의 병원성 인자로 알려진 220 Kdalton 단백질과 병원성 관련시험관내 정상간의 관계를 조사한 성적은 Table 7과 같다(Fig

2 참조). 즉, 시험관내 병원성 정상(CRMOX) 양성균과 음성균과 외막 단백질 조성에 차이가 있었다. 즉, CRMOX 병원성 시험 양성균에서는 200 Kdalton의 단백질



Table 8. Changes of *in vitro* virulence-associated characteristics of isogenic CRMOX-negative mutant of *Y enterocolitica* cured with acridine orange

CRMOX reaction	No. of strains tested	Treatment with acridine orange	Positivity(%)			
			CR	CD	AAG	CV
Positive	25	Not treated	16(64.0)	21(84.0)	23(92.0)	24(96.0)
	25	Treated	0	0	4(16.0)	10(40.0)
Negative	14		0	0	0	8(57.1)

Table 9. Changes in the presence of *in vitro* virulence-associated plasmid and 220 Kdalton outer membrane protein in isogenic CRMOX-negative mutants of *Y enterocolitica* cured with acridine orange

CRMOX reaction	No. of strains tested	Treatment with acridine orange	Presence of	
			40~50 Md plasmid(%)	220 Kd OMP(%)
Positive	25	Not treated	25(100)	25(100)
	25	Treated	0	0
Negative	14	Not treated	0	0

AO-cured : isogenic CRMOX-negative mutants cured with acridine orange.

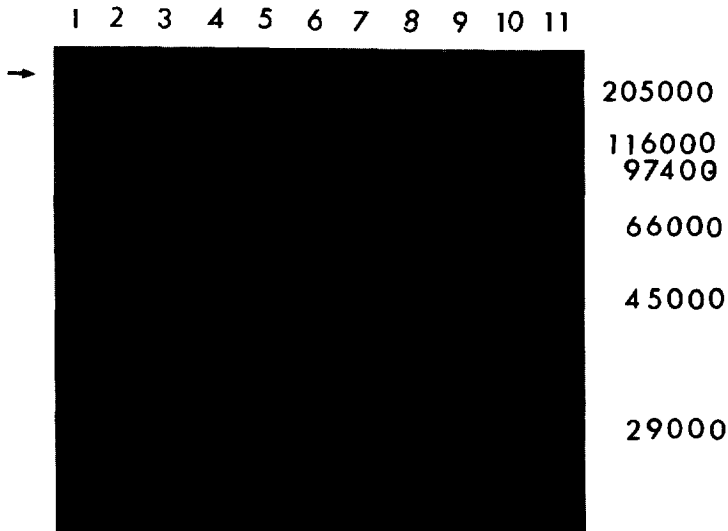


Fig 2. SDS-PAGE profile of 220 Kdalton outer membrane protein of *Y enterocolitica*. None of the OMP are visible in the lanes 4(1173), 8(717) and 10(1091) of virulent organisms grown at 26°C, whereas the OMP's are visible in the lanes 3(2063-1), 5(1173), 7(717), 9(1091) and 11(2026) of virulent organisms grown at 37°C. Lane 2(1212) shows OMP profile of avirulent organism grown at 37°C, whereas lane 1(1212) is the profile of OMP of avirulent organism grown at 26°C. Lane 6 is the standard molecular weight marker.

밴드가 나타났으나 음성균에서는 이 밴드가 없었다. 또한 이 밴드는 배양온도에 의존성이었다. 즉, 이 OMP 성분은 37°C 배양시에만 검출되고 26°C 배양시에는 검출되지 않았다. 그 밖의 여러가지 밴드에서 차이가 있었으나, 균주의 특성에 따라 일정하지 않았다.

220Kdalton OMP 검출균 25주와 각 시험관내 병원성 관련 성장 양상간의 일치율은 CRMOX 100%, AAG

92.0%, CV 88.0%, 및 CR 56.0% 순이었으며, 비검출균 14주중 64.3%가 CV<sup>+</sup>이었으나, CR, CD, AAG, CR-MOX 반응은 모두 음성이었다. 이들의 음성반응간의 상관관계는 CRMOX 1.00; AAG 0.90; CD 0.79; CR 0.44; CV 0.39이었다.

Acridine orange로 처리한 세균의 시험관내 병원성 관련성상의 변화: 병원성 관련성상과 병원성 플라스

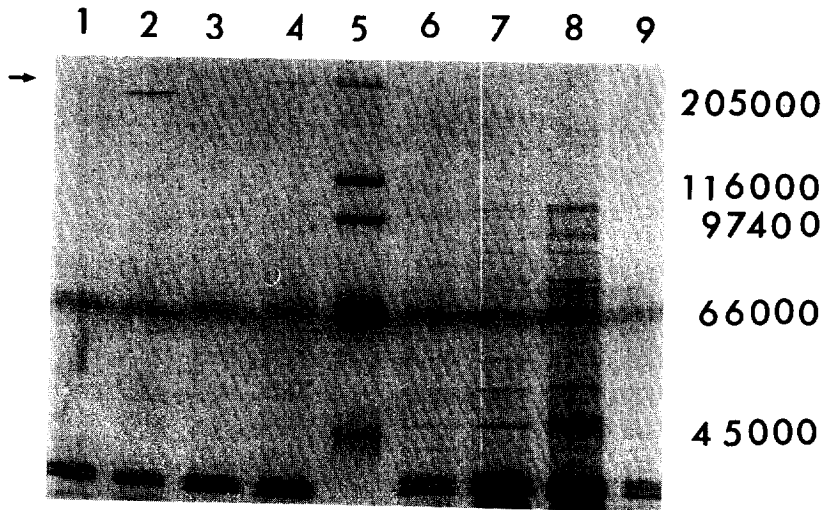


Fig 3. SDS-PAGE profile of outer membrane protein of virulent and isogenic virulence-cured mutant of *Y enterocolitica* cultured at 26°C and 37°C : Lane 1(815) and 3(1280) are OMP profiles of the virulent organisms cultured at 26°C, while lane 2(815) and 4(1280) are OMP profiles of the virulent organisms cultured at 37°C. Lane 6(815) and 8(1280) are OMP profiles of the isogenic virulence-cured strains cultured at 26°C and lane 7(815) and 9(1280) are OMP profiles of the isogenic avirulent strains cured with acridine orange and cultured at 37°C. The lane 5 is molecular weight standard.

미드의 보유간의 관계를 조사하기 위하여 CRMOX<sup>+</sup> 균주를 acridine orange로 처리하여 플라스미드를 제거한 CRMOX<sup>-</sup> 변이주에 대한 CR 흡착성, 칼슘 의존성, 자가 응집성, CV 결합성의 시험관내 병원성 관련성상의 변화를 조사한 성적은 Table 8과 같다. 즉, CRMOX<sup>+</sup> 25주의 각 시험관내 반응 양성균은 CR<sup>+</sup> 16주(64.0%), CD<sup>+</sup> 21주(84.0%), AAG<sup>+</sup> 23주(92.0%) 및 CV<sup>+</sup> 24주(96.0%)이었다.

한편 CRMOX<sup>+</sup>를 AO로 처리하여 만든 CRMOX<sup>-</sup> 변이주 25주에 대한 반응은 AAG<sup>+</sup> 4주(16.0%), CV<sup>+</sup> 10주(40.0%)이었으나, CR 흡착 및 AAG는 모두 음성이었다. CRMOX<sup>+</sup> 균을 AO로 처리하였을 때 시험관내 병원성 관련 반응 제거율은 CR과 CD 100%, AAG 82.6% 및 CV 58.3%이었다.

CRMOX<sup>+</sup> 균주를 26°C에서 배양할 때 220 Kdalton OMP는 검출되지 않고 단지 37°C로 배양할 때에만 검출되었으나, AO처리 CRMOX<sup>-</sup> 변이주를 37°C 배양할 때에는 소실되었다(Fig 3 참조).

CRMOX<sup>+</sup>, CRMOX<sup>-</sup> 그리고 AO처리 CRMOX<sup>-</sup> 변이주의 P<sup>+</sup> 보유와 220 Kdalton OMP 보유간의 관계는 Table 9와 같다. P<sup>+</sup>와 OMP 보유균은 모두 CRMOX<sup>+</sup>이었으며 CRMOX<sup>-</sup>와 AO처리 음성변이주에서는 검출되지 않았다.

## 고 찰

돼지에서 분리된 *Y enterocolitica*의 병원성을 조사하기 위하여 분리균주 289주에 대하여 CV시험(crystal violet binding test), CRMOX시험(congo red-magnesium oxalate test), AAG시험(autoagglutination test), CD시험(calcium dependency test), CR시험(congo red uptake test) 및 PYZ시험(pyrazinamidase test)을 실시하였다.

실험균 289주에 대한 각 병원성 관련성상의 양성율은 PYZ<sup>+</sup> 95.2%, CV<sup>+</sup> 78.2%, CRMOX<sup>+</sup> 65.7%, AAG<sup>+</sup> 64.0%, CD<sup>+</sup> 29.8% 그리고 CR<sup>+</sup> 16.3% 순이었다. 이 성적은 Mollaret et al<sup>1</sup>, Schiemann과 Fleming<sup>48</sup> 및 Doyle et al<sup>49</sup>이 건강할 돼지가 병원성 *Y enterocolitica*의 보균축이라는 성적과 일치한다.

CRMOX 시험은 CR반응과 CD반응을 동시에 관찰할 수 있도록 개량된 검사법으로 CR반응보다 반응시간이 짧고 CD반응보다 집락 구별이 용이하다는 장점을 가지고 있다. 이 연구에서 실험균 289주중 CRMOX<sup>+</sup>는 190주(65.7%)로 CR(16.3%)과 CD(29.8%)의 단일 검사성적보다 훨씬 높은 양성율을 나타내었다. 이 성적은 CR 또는 CD 단일 시험보다 두 시험을 결합한 CRMOX 반응이 훨씬 민감하다는 것을 알 수 있었다.

이 연구에서 각 시험관내 병원성 관련 반응간의 상관관계를 조사한 결과 CRMOX반응과 다른 시험관내 반응간의 상관관계는 AAG(0.90), CD(0.79), CR(0.44), PYZ(0.44) 및 CV(0.39) 순으로 모두 높은 상관관계를 나타내었다( $p < 0.01$ ). 따라서 위의 다섯가지 시험관내 병원성 관련 중복시험을 한가지의 CRMOX 반응으로 간단히 대체할 수 있으리라 생각된다. AAG반응과 다른 시험관내 반응간의 상관관계는 CRMOX(0.90), CD(0.69), CR(0.54) 및 PYZ(0.33)으로 고도의 유의성( $p < 0.01$ )을 그리고 CV(0.28) 간에 유의성( $p < 0.05$ )을 나타내었다. CD반응과 다른 시험관내 반응간의 상관관계는 CRMOX(0.79), AAG(0.69) 및 CR(0.64)로 고도의 유의성을 PYZ(0.23) 그리고 CV(0.18)간에 유의성을 나타내었다. CV반응과 다른 시험관내 반응간의 상관관계는 PYZ(0.74)와 CRMOX(0.39)간에 고도의 유의성을, AAG(0.28)와 CD(0.18)간에 유의성을 나타내었으나, DR(0.03)과는 유의성이 없었다. PYZ 반응과 다른 시험관내 반응간의 상관관계는 CV(0.74), CRMOX(0.44) 및 AAG(0.33)으로 고도의 유의성을, CD(0.23)간에 유의성을 나타내었으나 CR(-0.13)과는 유의성이 없었다. 유의성이 없었던 원인은 CR과 CD반응 양성율이 낮은 반면 CV와 PYZ 반응 양성율이 높았기 때문이다.

이 연구에서 실험군 289주중 6가지 시험관내 병원성 관련시험이 모두 양성인 균은 6.9%, 5가지 시험 양성균은 19.7%, 3가지 시험 양성균은 7.6%, 2가지 시험 양성균은 15.6%, 단일시험 양성균은 12.8%이었다. 이와같은 결과는 동일균주에 대한 각 시험관내 병원성 정상간에 차이가 크다는 것을 의미하며, *Y enterocolitica*의 시험관내 병원성 관련성상이 항상 일치하지 않는다는 Chang et al<sup>35</sup>, Noble et al<sup>37</sup>, Kay et al<sup>36</sup> 및 Wachsmuth et al<sup>38</sup>의 성적과 일치한다.

*Y enterocolitica*의 병원성 인자와 시험관내 병원성 관련성상이 40~50 Mdalton plasmid에 의하여 지배된다는 것이 Zink et al<sup>46</sup>과 Gemski et al<sup>13</sup>에 의하여 보고된후 suckling mouse 처사능<sup>33</sup> 및 토끼의 옴모 미세농양과 괴사<sup>49</sup>가 plasmid에 의하여 지배된다는 것이 확인되었다. 그러나 Heesemann et al<sup>50</sup>은 비병원성 균주가 P<sup>+</sup>를 전달받았을 때 항상 병원성을 나타내는 것이 아니기 때문에 P<sup>+</sup> 이외에 다른 병원성 결정 인자가 있음을 시사하였다. *Y enterocolitica* P<sup>-</sup> 균주는 마우스에 전신질환을 일으키지는 않지만 장간막 림프절에서 자주 분리되고<sup>51</sup> 또한 무균 돼지에서 질병을 일으키지는 않지만 역시 장벽을 침습하여 감염증을 일으킨다는 것<sup>52</sup>이 알려져 있다.

이 연구에서 실험군 289주중 65.7%가 P<sup>+</sup> 균이었다. P<sup>+</sup> 보유와 시험관내 병원성 관련 정상간의 상관관계는 CRMOX<sup>+</sup> 97.4%, AAG<sup>+</sup> 94.1%, CD<sup>+</sup> 91.9%, CV<sup>+</sup> 77.0%, PYZ<sup>+</sup> 68.0%의 순으로 CR반응을 제외하고는 모두 plasmid 보유와 반응간에 높은 유의성을 나타내었다( $p < 0.01$ ). 그러나 CR<sup>+</sup>균과 CR<sup>-</sup>균의 plasmid 보유율이 각 80.9%와 62.8%로 상호간에 유의성이 없었다. 이 성적은 모든 시험관내 검사법중에 CRMOX 검사가 가장 민감한 검사법이라는 것을 의미한다.

이 연구에서 병원성 플라스미드가 시험관내 병원성 관련성상을 지배하는지를 조사하기 위하여 acricine orange로 plasmid를 제거한 CRMOX<sup>-</sup> 변이주에서 각 병원성 관련성상의 음성율을 조사한 결과 CR과 CD 반응은 100%, AAG 반응은 82.6%가, CV 반응은 58.3%가 각각 소실되었다. 이 성적은 CRMOX 양성반응은 병원성 관련 플라스미드에 의하여 지배된다는 것을 의미한다. 즉, 이성적은 CR 및 CD 반응은 P<sup>+</sup>에 의하여 지배된다는 Gemski et al<sup>13</sup>, Prpic et al<sup>14</sup> 및 Riley와 Toma<sup>44</sup>의 결과와 일치한다. 그러나 CRMOX<sup>-</sup> 균이 AAG 양성반응(17.4%)과 CV 양성반응(41.7%)을 여전히 나타내는 점은 Laird와 Cavanaugh<sup>10</sup>, Skurmik et al<sup>31</sup> 및 Bhaduri et al<sup>15</sup>의 결과와 차이가 있었다. 이러한 차이는 CRMOX<sup>-</sup>균 중에는 시험관내 반응을 표현하지 못한 CRMOX<sup>+</sup> 균이 일부 포함되어 있거나 AAG 및 CV반응 양성은 다른 병원성 인자와 연관성이 있기 때문이라고 추정된다.

본 실험에서 CRMOX 반응과 배양온도 의존성 220 Kdalton OMP의 합성과의 상관관계를 조사하기 위하여 CRMOX<sup>+</sup> 균주를 37°C에서 배양할 때 220 Kdalton OMP를 생산하였으나 26°C에서 배양할 때에는 생산하지 않았다. 이 OMP의 존재는 시험관내 병원성 관련반응 특히 CRMOX 반응양성(100%) 및 40 Mdalton plasmid의 보유와 높은 상관관계를 나타내었다. 이 결과는 시험관내 병원성 관련성상이 OMP의 생산지배 유전자와 동일한 플라스미드에 의하여 지배를 받고 있기 때문으로 생각된다. 이 연구에서 CRMOX<sup>+</sup> 균주를 AO처리로 플라스미드를 제거한 CRMOX<sup>-</sup> 변이주는 200 Kdalton OMP를 생산하지 않았다는 점으로 보아 CRMOX 검사는 OMP와 병원성 플라스미드 검사를 위한 대체배양검사법으로 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

이상의 성적을 종합하여 보면 CRMOX 반응과 AAG 반응간에 가장 높은 일치율을 나타냈으며 이 두반응은 병원성 관련 플라스미드 보유와도 일치율이 높았다. 이 성적은 사용된 시험관내 병원성 관련 시험중에서

CRMOX와 AAG시험이 *Y enterocolitica*의 병원성 시험으로 가장 적합한 검사법이라는 것을 알 수 있었다.

## 결 론

건강한 돼지에서 분리된 *Yersinia enterocolitica*가 인체에 대하여 병원성을 가지고 있는지를 조사하고 시험관내 병원성 관련 성장간의 민감성을 비교하기 위하여 분리균주 289주에 대하여 congo red 흡착반응(CR), 칼슘 의존성반응(CD), 자가응집반응(AAG), CRMOX반응, crystal violet 결합반응(CV) 그리고 pyrazinamidase반응(PYZ)을 실시하였다. 또한 *Y enterocolitica* 40~50 Mdalton plasmid와 시험관내 병원성 관련 반응간의 관계를 밝히기 위하여 CRMOX<sup>+</sup> 균주와 acridine orange 처리 CRMOX<sup>-</sup> 변이주에 대하여 각 반응을 비교하였다. 얻어진 성적을 종합하면 다음과 같다.

1. 총289주의 실험균에 대한 각종 시험관내 병원성 관련성상에 따른 양성균주는 PYZ 275주(95.2%), CV 226주(78.2%), CRMOX 190주(65.7%), AAG 185주(64.0%), CD 86주(29.8%) 및 CR 47주(16.3%)의 순이었다.

2. 시험관내 병원성 관련성상의 양성반응 및 음성반응간의 상관관계에서 AAG시험과 CRMOX시험간의 반응이 가장 잘 일치하였다( $r=0.90$ ).

3. 총 289주에 대한 병원성 플라스미드의 검출에서 190주(65.7%)가 플라스미드를 보유하고 있으며 플라스미드 보유와 각 양성반응간의 상관관계에서 CRMOX 반응(0.93), AAG반응(0.81), CV 반응(0.46), PYZ(0.37) 및 CD 반응(0.18)은 유의한 상관관계를 나타내었으나 ( $p<0.01$ 과  $p<0.05$ ), CR 반응과는 유의성이 없었다.

4. CRMOX<sup>+</sup>균주를 acridine orange로 처리하여 병원성 플라스미드(100%)를 제거한 CRMOX<sup>-</sup> 변이주의 시험관내 병원성 제거율은 CR 100%, CD 100%, AAG 82.6% 및 CV 58.6%이었다.

5. 220 Kdalton OMP는 CRMOX<sup>+</sup> 균주를 37°C에서 배양할 때에는 생산되었으나 26°C에서는 생성되지 않았으며 OMP의 생산은 CRMOX( $r=1.00$ ), AAG(0.90), CD(0.79), CR(0.44) 및 CV(0.38) 반응과 상관관계를 나타내었다.

6. 40~50 Mdalton plasmid 보유균주는 CRMOX 또는 AAG 양성반응과 가장 높은 상관관계를 보였다.

이상의 성적에서 국내의 건강 돼지에서 분리된 *Y enterocolitica*는 병원성이 있으며, CRMOX 검사가 병원성 검사법으로 가장 민감하다는 것을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Mollaret HH, Bercovier H, Alonso JM. Summary of the data received at the WHO reference center for *Yersinia enterocolitica*. *Contr Microbiol Immunol* 1979 ; 5 : 174~184.
2. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*. CRC Press, Inc, Boca Raton, 1981 ; 145~160.
3. Kapperud G, Bergan T. Biochemical and serological characterization of *Yersinia enterocolitica* *Method in Microbiol* 1984 ; 15 : 295~344.
4. Kapperud G, Nesbakken T, Neksic S, et al. Comparison of restriction endonuclease analysis and phenotypic typing method for differentiation of *Yersinia enterocolitica* isolates. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 1125~1131.
5. Zen-Yoji H, Sakai S, Maruyama T, et al. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from swine, cattle and rats at an abattoir. *Jpn J Microbiol* 1974 ; 18 : 103~105.
6. Toma S, Deidrick VR. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine. *J Clin Microbiol* 1975 ; 2 : 487~481.
7. Hurvel B. *Yersinia enterocolitica* infection : host, range, clinical manifestations and transmission. In *Yersinia enterocolitica* CRC Press, Inc., Boca Raton 1981 ; 145~150
8. Bissett ML. *Yersinia enterocolitica* isolates from human in California, 1968~1975. *J Clin Microbiol* 1976 ; 4 : 137~144.
9. Bissett ML, Powers C, Abbott SL, et al. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species : sources, frequency and serogroup distribution. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 910~912.
10. Laird WJ, Cavanaugh DC. Correlation of autoagglutination and virulence of yersiniae. *J Clin Microbiol* 1980 ; 11 : 430~432.
11. Vesikari T, Nurimi T, Maeki M, et al. Plasmids in *Yersinia enterocolitica* serotype 0 : 3 and 0 : 9 : correlation with epithelial cell adherence *in vitro* *Infect Immun* 1981 ; 33 : 870~876.
12. Higuchi K, Smith JL. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. IV. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. *J Bacteriol* 1980 ; 81 : 605~608.
13. Gemski P, Lazere JR, Casey T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yer-*

- sinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1980 ; 27 : 682~685.
14. 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.
  15. Bhaduri S, Conway LK, and Lachica RV. Assay of crystal violet binding for rapid identification of virulent plasmid-bearing clones of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1987 ; 25 : 1039~1042.
  16. Kandolo K, Wauters G. Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J Clin Microbiol* 1985 ; 21 : 980~982.
  17. Tanaka M, Nakamura M, Ito O, et al. Virulence-associated plasmids of *Yersinia enterocolitica* isolated in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1984 ; 46 : 945~949.
  18. Boelin I, Norlander L, Wolf-Watz H. Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* 1982 ; 37 : 506~512.
  19. Martinez RJ. Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1983 ; 41 : 921~930.
  20. Portnoy DA, Wolf-Watz H, Boelin I, et al. Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. *Infect Immun* 1984 ; 43 : 108~114.
  21. Starley SC, Brubaker RR. Cytoplasmic and membrane proteins of yersiniae cultivated under conditions simulating mammalian intracellular environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 8 : 1224~1228.
  22. Lian CJ, Pai CH. Inhibition of human neutrophil chemiluminescence by plasmid-mediated outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1985 ; 49 : 145~151.
  23. Heesemann J, Keller C, Morawa R, et al. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica* ; molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* 1983 ; 147 : 107~115.
  24. Pai CH, DeStephano I. Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1982 ; 35 : 605~611.
  25. Lachica RV, Zink DL, Ferris WR. Association of fibril structure formation with cell surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1984 ; 46 : 272~275.
  26. Kapperud G, Nomork E, Skapeod HJ. Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 1985 ; 47 : 561~566.
  27. Lachica RV, Zink DL. Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1984 ; 44 : 540~543.
  28. Goguen JD, Walker WS, Hatch TP, et al. Plasmid-determined cytotoxicity in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 1986 ; 51 : 788~794.
  29. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica* : a panoramic view of a charismatic microorganism. *CRC Crit Rev Microbiol* 1977 ; 5 : 211~241.
  30. Boelin I, Portnoy DA, Wolf-Watz H. Expression of the temperature-inducible outer membrane proteins of yersiniae. *Infect Immun* 1985 ; 48 : 234~240.
  31. Skurnik M, Boelin I, Keikkinen H, et al. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* 1984 ; 158 : 1033~1036.
  32. Skurnik M. Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect Immun* 1985 ; 47 : 183~190.
  33. Aulisio CG, Hill WE, Stanfield JT, et al. Evaluation of virulence factor testing and characteristics of pathogenicity in *Yersinia enterocolitica* isolates. *J Food Prot* 1983 ; 46 : 226~230.
  34. Schiemann DA, Devenish JA, Tama S. Characteristics of virulence in human isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1981 ; 32 : 400~403.
  35. Chang MT, Schink J, Shimaoka J, et al. Comparison of three tests for virulent *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 1984 ; 20 : 589~591.
  36. Kay BA, Wachsmuth K, Gemski P, et al. Virulence and phenotypic characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from human in the United States. *J Clin Microbiol* 1983 ; 17 : 128~138.
  37. Noble MA, Barteluk RL, Freeman HJ, et al. Clinical significance of virulence-related assay of yersinia species. *J Clin Microbiol* 1987 ; 25 : 802~807.
  38. Wachsmuth K, Kay BA, Birknees KA. diagnostic Value of plasmid analyses and assays for virulence

- in *Yersinia enterocolitica*. *Dign Microbiol Infect Dis* 1984 ; 2 : 219~228.
39. Heesemann J, Keller C, Morawa R, et al. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica* : molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* 1983 ; 147 : 107~115.
  40. Portnoy DA, Mosley SL, Falkow S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect Immun* 1981 ; 31 : 775~782.
  41. Choi CS, Park SG, Youn YD, et al. Production of heat-stable enterotoxin and virulence-associated cultural characteristics of positive strains of *Yersinia enterocolitica* and related species with or without plasmids. *J Kor Soc Microbiol* 1990 ; 25 : 135~147.
  42. Winblad S. *Yersinia enterocolitica* (synonyms : "Pasteurella X" *Bacterium enterocoliticum* for serotype 0 : 8). *Method in Microbiol* 1978 ; 12 : 37~50.
  43. Cornelis G, Laroche Y, Balligand G, et al. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev Infect Dis* 1987 ; 9 : 64~87.
  44. Riley G, Toma S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. *J Clin Microbiol* 1989 ; 27 : 213~214.
  45. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981 ; 45 : 1367~1373.
  46. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 1970 ; 227 : 680~685.
  47. Zar JH. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliff 1974 ; 245~246.
  48. Schiemann DA, Fleming CA. *Yersinia enterocolitica* isolated from throats of swine in eastern and western Canada. *Can J Microbiol* 1981 ; 27 : 1326~1333.
  49. Doyle MP, Hugdahl MB, Taylor SI. Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *Appl Environ Microbiol* 1981 ; 42 : 661~666.
  50. Zink DL, Feeley JC, Wells JG, et al. Plasmid-mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica*. *Nature* 1980 ; 283 : 224~226.
  51. Lian CJ, Hwang WS, Kelly JK, et al. Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid : an *in vivo* study. *J Med Microbiol* 1987 ; 24 : 219~226.
  52. Heesemann J, Algermissen B, Laufs R. Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1984 ; 46 : 105~110.
  53. Bakour R, Balligand G, Laroche Y, et al. A simple adult-mouse test for tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica* strains of low experimental virulence. *J Med Microbiol* 1985 ; 19 : 237~247.
  53. Robins-Browne RM, Tzipori S, Gonos G, et al. The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. *J Med Microbiol* 1985 ; 19 : 207~308.
-