

석사학위논문

한라산 자연샘물 및 야생노루의
분변에서 분리한 *Yersinia*
*enterocolitica*의 특성 연구

지도교수 오 덕 철



제주대학교 교육대학원

생물교육전공

한 창 수

2002년 2월

석사학위논문

한라산 자연샘물 및 야생노루의
분변에서 분리한 *Yersinia*
*enterocolitica*의 특성 연구

지도교수 오 덕 철



제주대학교 교육대학원

생물교육전공

한 창 수


2002년 2월

한라산 자연샘물 및 야생노루의
분변에서 분리한 *Yersinia*
*enterocolitica*의 특성 연구

지도교수 오 덕 철

이 논문을 교육학 석사학위 논문으로 제출함

2001년 10월 일

제주대학교 교육대학원 생물교육전공
 제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
제출자 한 창 수

한창수의 교육학 석사학위 논문을 인준함

2001년 12월 일

심사위원장 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

<국문 초록>

한라산 자연샘물 및 야생노루의 분변에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 특성 연구

한 창 수

제주대학교 교육대학원 생물교육전공

지도교수 오 덕 철

한라산 등산로 주변 자연샘물 6개소의 *Yersinia enterocolitica* 분포와 자연샘물 및 야생노루의 분변에서 분리한 *Y. enterocolitica*에 대한 생화학적 성장, 생물형, 혈청형, 시험관내 병원성시험, 항생제 감수성 시험 결과는 다음과 같다.

자연샘물에서 *Y. enterocolitica*의 분포는 영실샘, 성판악샘, 어리목샘, 사재비샘, 노루샘, 오름샘의 순으로 각각 8~49, 8~33, >2~8, >2~4, >2~4, >2~2 MPN/L를 보였으며, 고도가 낮은 등산로 입구(영실샘, 성판악샘, 어리목샘)에 위치한 샘플이 등산로 중간(사재비샘, 노루샘, 오름샘)보다 높은 분포를 보였다.

분리된 *Y. enterocolitica* 29주에 대한 생물형의 분포는 1, 2, 3, 3A, 3B, 4, 5형의 7가지 생물형 중 1형(24/29, 82.8%) 및 2형(5/29, 17.2%)으로 나타났고, 지금까지 알려진 57개 혈청형 중 O:1·2혼합, O:3, O:5, O:8, O:9의 혈청형에 대한 시험결과는 O:1·2혼합형, O:5형 및 O:8형에 자연샘물에서 분리한 균주에서만 각각 2주, 4주, 2주가 분포를 나타냈으며 대다수인 72.4%(21/29)는 5개 혈청에 응집반응을 보이지 않았다. 시험관내 병원성 시험에서 2/29(6.9%)만이 자가응집 시험에 양성을 보였을 뿐 CRMOX 시험에서는 음성 반응을 보였다.

항생제 12종에 대한 감수성 시험 결과는 ampicillin, cephalothin, penicillin에서만 내성을 보였다.

* 본 논문은 2002년 2월 제주대학교 교육대학원 위원회에 제출된 교육학 석사학위 논문임.

<제 목 차 례>

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 실험재료	3
가) 자연샘물	3
나) 야생노루 분변	5
다) 생화학적 검사용 균주	5
2. 실험방법	6
1) <i>Y. enterocolitica</i> 분리	6
가) 한라산 등산로 주변 자연샘물	6
나) 노루의 분변(저온 증균법)	6
다) <i>Y. enterocolitica</i> 분포조사	6
2) 형태 및 Gram 염색상	7
3) 생물형의 동정	7
4) 혈청형의 동정	7
5) 시험관 내 병원성 관련 시험	7
가) 자가응집(Autoagglutination: AAG) 시험	7
나) CRMOX 시험	8
6) 항생제 감수성 시험	8
III. 결과 및 고찰	9
1. 자연샘물의 <i>Y. enterocolitica</i> 분포	9
2. 형태 및 Gram 염색상	10
3. 분리된 <i>Y. enterocolitica</i> 생화학적 특징	12
4. 생물형의 동정	14
5. 혈청형의 동정	15
6. 시험관내 병원성 관련 증상	17
7. 항생제 감수성	18
V. 참고문헌	20
Abstract	23

<표차례>

Table 1. Geographical information of sampling sites.	3
Table 2. Number of <i>Y. enterocolitica</i> strains isolated from different sampling sites and used for biochemical tests.	5
Table 3. Most probable numbers (MPN/L) of <i>Y. enterocolitica</i> distributed in spring waters.	9
Table 4. Gram stain and morphological characteristics of the isolates.	12
Table 5. Biochemical tests for the isolates based on API kit.	13
Table 6. Biotypes of the isolates from spring waters and feces of roe deer.	14
Table 7. Serotypes of the isolates from spring waters and feces of roe deer.	16
Table 8. Virulence test for the isolates from spring waters and feces of roe deer.	17
Table 9. Antibiotic test for <i>Y. enterocolitica</i> isolated from spring water and feces of roe deer.	19

<그림차례>

Fig. 1. Map of sampling sites (H1, H2, H3, H4, H5, H6).	4
Fig. 2. Electron micrographs of <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610 and isolated from spring water cultured at different temperatures.	11

I. 서 론

여시니아증은 *Yersinia*균의 감염에 의해 발생하는 병이다. 보통 감염된 지 3-7일이면 발병하며 설사, 급성맹장염과 같은 열을 동반한 복부통증의 증상을 보이기 때문에 급성맹장염과 혼동하기도 한다(Cliver. 1990).

*Yersinia*는 그람 음성 간균으로 과거에는 *Pasteurella* 속에 속하였으나 장내세균과 여시니아屬으로 독립되었고 11종의 여시니아속 중 *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* 3종이 사람에게 병원성이 있는 것으로 알려졌다. 이 중 *Y. pestis*는 법정전염병인 페스트의 원인균이고, 여시니아증을 이끄는 것은 *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* 2종 뿐이다(변 등, 1998; 함 등, 1998).

여시니아屬균은 동물, 환경 등에 널리 분포되어 있으나, 사람에게 병을 일으키는 *Y. enterocolitica*를 보유하는 주요 동물은 돼지이며 이외의 다른 종은 쥐, 토끼, 양, 소, 말, 개, 고양이, 사슴 등에서도 발견된다. 국내에서 돼지 분변에서 33.8%(박 등, 1992), 경주마 분변에서 5.5% 정도 분리했다(장 등, 1994). 이처럼 가축이나 야생동물에게서 분리가 되는 것으로 볼 때 이러한 동물들이 *Y. enterocolitica*의 보유고가 될 수 있다.

유제품 등의 식품에서도 *Y. enterocolitica*이 분리됨으로써 육류, 육류 가공품, 우유, 낙농제품들은 주요 매개체로 보고되었고(박 등, 1994) 돼지고기를 비롯한 여러 식품에서 분리되고(임 등, 1999) 있으나 병독성은 매개 종에 따라 다르며 몇몇 혈청형에 국한된다(Kapperud 등, 1984).

*Y. enterocolitica*은 돼지(Doyle 등, 1981), 개(Kaneko 등, 1977)의 분변에서 분리했다는 보고가 있고 국내에서 급성 장염환자에서 *Y. enterocolitica*이 최초로 분리 보고된(안 등, 1981) 후 환자들에서 균 분리가 있었으며(김 등, 1981), 위장염환자에서 분리한 12주의 *Y. enterocolitica*에 대한 혈청형과 생물형이 O:3/3B형 및 O:9/2형으로 각각 6주가 보고되었

다(최 등, 1989). Gourdon 등 (1999)도 여시니아균에 감염된 환자에게서 O:9 혈청형이 검출되었다고 보고하였다.

*Y. enterocolitica*의 성장조건으로는 pH가 4.6-9.0(최적 7-8)이고 온도가 0-44℃(최적 32-34℃)이지만 냉장온도(5℃)에서도 증식할 수 있는 장내세균이기 때문에 겨울철 설사를 일으키는 원인균이 되기도 한다(Cliver, 1990). 또한 샘물을 이용하여 만든 두부에서도 여시니아균으로 인한 환자발생을 보고한 것(CDC, 1982)을 고려하면 여시니아증 발생도 가능한 것으로 생각되어진다.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention)에서 1993~1997년 5년간 2차례에 걸쳐 27명의 식품원인성 여시니아증이 발견되었다고 보고하였으며, 연간 발병 환자수도 약 8,700명이 되는 것으로 추정하고 있다(Cliver, 1990). 특히 1994년 서울 근교 자연샘물 17곳에서 *Yersinia* 균이 검출되어 사회적 문제가 된 적이 있어 한라산 등산로 주변 샘물도 주위환경으로부터 미생물 오염으로 인한 위험이 있을 것으로 생각된다.

한라산 등산로 주변 등산객들이 즐겨 이용하고 있는 자연샘물과 야생노루의 분변에서 *Y. enterocolitica*을 분리 동정하고 분리된 균주에 대한 생물학적 특성을 밝혀냄으로써 여시니아증 예방을 위한 역학적 자료로 활용할 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 자연샘물

한라산 등산로 주변에 위치한 자연샘물 6개소를 대상으로 1999년 1월부터 2000년 10월까지 월1회 채수하여 균주를 분리하고 특성 연구에 사용하였으며, 분포조사는 2001년 9월부터 11월까지 2주 간격으로 채취장소에서 무균 폴리에틸렌수지 용기에 흐르는 물 2L씩 채수하고 실험실로 운반하여 실험하였다.

채수 장소의 좌표는 GPS III Plus (Garmin)를 이용하여 확인하였다 (Table 1, Fig. 1).

Table 1. Geographical information of sampling sites.

Sample Codes	Local Names	Altitude(m)	GPS
H1	Yeongsil-spring	1,228	N: 33°20 ' 40.5 " E: 126°29 ' 54.9 "
H2	Noru-spring	1,689	N: 33°21 ' 22.3 " E: 126°31 ' 02.0 "
H3	Oreum-spring	1,662	N: 33°21 ' 37.8 " E: 126°31 ' 00.4 "
H4	Sajebi-spring	1,425	N: 33°22 ' 20.1 " E: 126°30 ' 04.1 "
H5	Eorimok-spring	988	N: 33°23 ' 19.8 " E: 126°29 ' 48.1 "
H6	Seongpanak-spring	778	N: 33°22 ' 53.6 " E: 126°37 ' 17.7 "

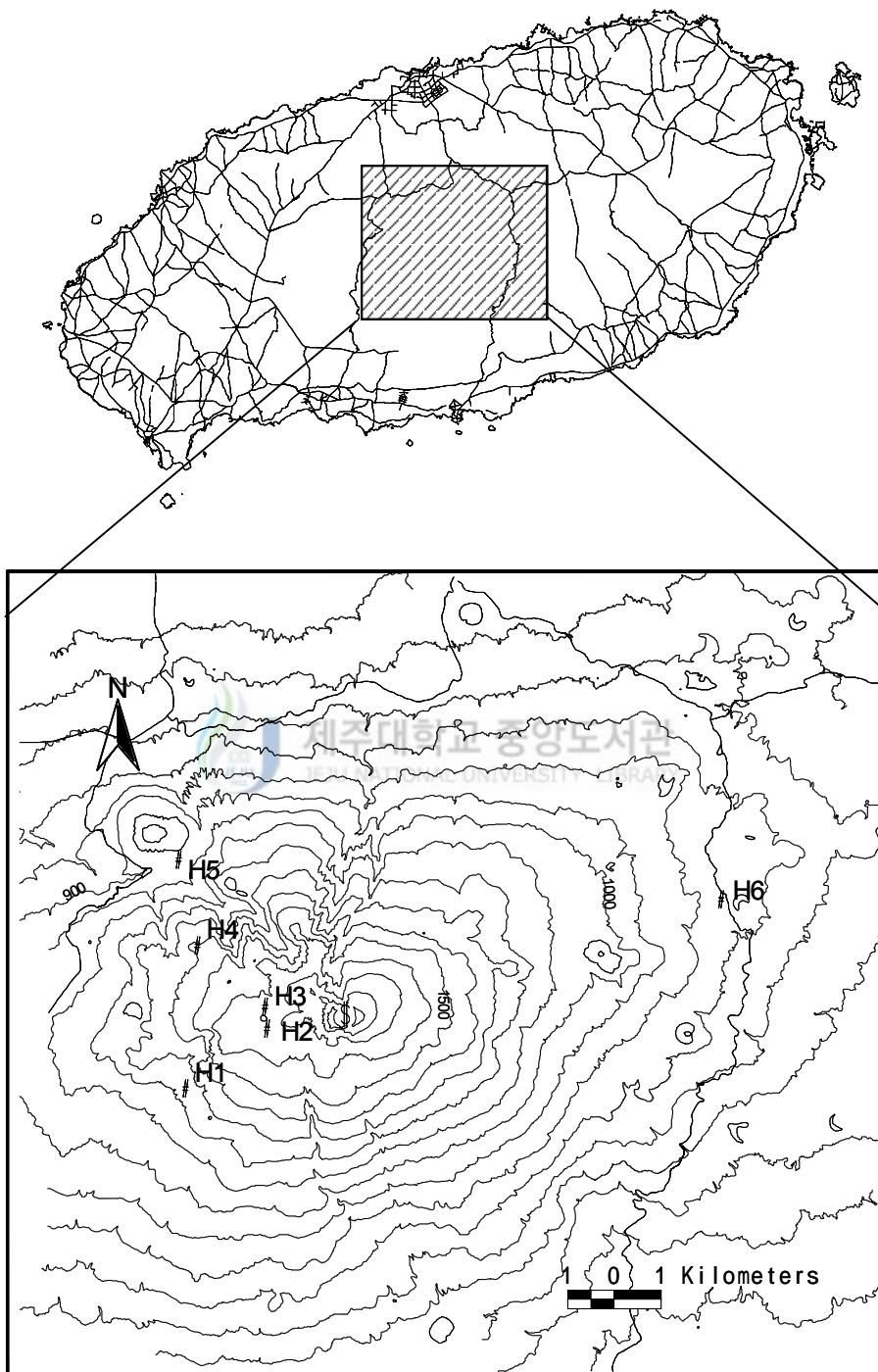


Fig. 1. Map of sampling sites (H1, H2, H3, H4, H5, H6).

2) 야생노루 분변

노루는 군집성이며 분변은 다른 동물의 것과 구별하기 쉬워 검체 채취가 용이하고 한라산에 서식하는 포유동물 중 서식밀도가 높기 때문에 샘플의 수질에 영향을 줄 수 있을 것이라 생각되어 2000년 3월부터 5월 사이에 한라산 등산로 주변에서 야생노루 51개체의 분변을 채취하여 멸균된 100mL 용기에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3) 생화학적 검사용 균주

생화학적 검사는 국립보건원에서 분양 받은 표준균주(ATCC 9610)와 한라산 등산로 주변샘물에서 분리된 26균주와 야생노루에서 분리한 3균주를 대상으로 하였다(Table 2).

Table 2. Number of *Y. enterocolitica* strains isolated from different sampling sites and used for biochemical tests.

Source	Sites	No. of strains
Spring water	H1	5
	H2	3
	H3	2
	H4	5
	H5	7
	H6	4
FRD*		3
Total		29

FRD* represents feces of roe deer

2. 실험방법

1) *Y. enterocolitica* 분리

가) 한라산 등산로 주변의 자연샘물

한라산 등산로 주변 자연샘물에서의 *Y. enterocolitica* 분리는 환경부 먹는물공정시험방법(1997)에 의해 실시하였다. 2L의 샘플을 여과지 (Millipore: pore size 0.22 μ m)로 여과하여 0.288% KOH를 처리한 후 CIN (Yersinia selective agar base (Difco)에 Yersinia antimicrobial supplement 인 Cefsulodin, Novobiocin를 첨가) 배지로 28 $^{\circ}$ C에서 24~48 시간 배양하여 점액성이 없고 붉은색을 띠는 집락을 KIA (Klinger's Iron Agar) 사면배지에 접종하고 18시간 배양 후 alkaline slant/acid butt, H₂S 음성, gas 음성의 특징을 나타내는 균주를 선택하여 최종 생화학적 확인 동정을 실시하였다.

나) 노루의 분변(저온 증균법)

노루의 분변에서 *Y. enterocolitica* 분리는 국립보건원 감염병 실험실 진단 지침(1996)에 의해 실시하였다. 검체 5g을 저온증균배지에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 3주 동안 배양하면서 1주에 한번씩 CIN 배지에 획선 도말한 후 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하고, 가)의 방법을 따라 실험하였다.

다) *Y. enterocolitica*의 분포조사

한라산 등산로 주변의 자연샘물의 *Y. enterocolitica*의 분포조사는 5관법을 이용한 최확수법(Most Probable Number)에 의해 측정하였다. 1mL \times 5는 직접 CIN 배지에 중첩 접종하고, 10mL \times 5, 100mL \times 5는 여과지 (Millipore: pore size 0.22 μ m)로 여과하여, 이후 가)의 방법을 따라 실험하고 MPN 지수를 찾아 1L 당 MPN을 측정하였다.

2) 형태 및 Gram 염색상

CIN agar 배지와 nutrient agar 배지에 배양 후 전자현미경과 광학현미경으로 관찰하였으며 Gram 염색을 실시하였다.

3) 생물형 동정

Winblad (1978) 및 Cornelis (1987)의 방법으로 생화학적 성상에 의해 1, 2, 3, 4, 5, 3A, 3B의 7개의 생물형으로 분류하였다

4) 혈청형 동정

생화학적으로 *Y. enterocolitica*로 동정된 균주는 O혈청(O:1·2혼합, O:3, O:5, O:8, O:9)으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 혈청형을 분류하였다.



5) 시험관 내 병원성 관련 시험

가) 자가응집(Autoagglutination: AAG) 시험

Laird와 Cavanaugh (1980) 방법으로 실시하였다. 10% calf serum 25m MHEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid) 완충제를 함유한 MEM (Minimal essential medium)을 3mL 넣은 시험관에 Tryptic soy agar 사면 배지에서 48시간(26℃) 배양한 균을 접종하여 26℃와 37℃에서 18시간 배양하고 26℃ 배양 시 균등한 혼탁 발육을 나타내거나 37℃에서 배양 시 균체가 응집되어 시험관 바닥에 침전되고 상층액이 맑게 되는 균주를 양성으로 판정하였다.

나) CRMOX 시험

Riley와 Toma (1989) 방법에 따라 실시하였다. blood agar에서 (25℃ 18시간) 배양한 균을 Tryptic soy agar 40g을 증류수에 녹이고 고압멸균 후 55℃로 식힌 다음 각각 따로 멸균한 0.25M sodium oxalate 80mL, 0.25M magnesium chloride 80mL, 5% congo red 5mL, 20% galactose 10mL를 혼합한 CRMOX배지에 도말하여 37℃에서 24 시간 배양한 후 크고 무색인 집락은 음성으로 작고 적색인 집락은 양성으로 판정하였다.

6) 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험에 사용된 disc (직경 6mm)는 Difco사 제품을 사용하였으며, disc diffusion method로 실시하였다. Muller-Hinton broth에 균 부유액 농도를 McFarland No. 0.5 표준 비색관에 맞춘 후 미리 고압 멸균 조제한 Muller-Hinton agar상에 균액을 적신 면봉을 끌고루 접종하여 3~5분간 방치하였다가 배지 표면의 습기가 흡수된 후 disc간 거리가 15mm 정도 떨어지도록 놓고 핀셋으로 가볍게 눌러 밀착시킨 뒤에 16~28시간 배양한 후 zone reader를 사용하여 균의 억제된 직경거리를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 자연샘물의 *Y. enterocolitica* 분포

한라산 등산로 주변의 자연샘물의 *Y. enterocolitica* 분포 범위는 영실샘, 성판악샘, 어리목샘, 사재비샘, 노루샘 및 오름샘의 순으로 각각 8~49, 8~33, >2~8, >2~4, >2~4 및 >2~2 MPN/L를 나타내어, 등산로 입구 (영실샘, 성판악샘, 어리목샘)가 등산로 중간(사재비샘, 노루샘, 오름샘)보다 높은 수치를 보였다.

Table 3. Most probable numbers (MPN/L) of *Y. enterocolitica* distributed in spring waters.

Sites	Positive No.					Range
	1st	2nd	3rd	4th	5th	
H1	23	8	49	8	8	8~49
H2	>2	2	4	>2	2	>2~4
H3	>2	>2	>2	2	2	>2~2
H4	>2	4	4	>2	>2	>2~4
H5	8	2	8	2	>2	>2~8
H6	33	13	23	8	13	8~33

이 같은 결과는 대전광역시 관내 약수터 주변 토양에서 검체 1g을 저온증균방법으로 *Y. enterocolitica*를 24.6% 분리했다는 결과(남 등, 1999)와 각종 야생동물의 분변에서 균 분리가 보고된 바 동물의 분변이 토양을 오염시키고 오염된 토양 위를 흐르는 빗물에 의해 샘물로 유입됨으로써

오염이 되는 것으로 추정된다.

따라서 영실샘, 성판악샘, 어리목샘은 자연샘물이 일정 기간 계곡을 흘러 집수정에 모여지고 그 물이 관을 흘러 등산로 입구에 위치한 장소로 흐르도록 설치되어 있는 샘물로 계곡을 흘러 집수정으로 흘러들어 오는 시간 동안 토양이나 동물의 분변같은 오염원들에 의해 오염될 가능성이 높고 사재비샘, 노루샘, 오름샘은 바로 옆에서 솟아나는 자연샘물을 바로 음용 할 수 있게 설치된 샘물로 오염원들과 접촉 할 수 있는 시간이 짧은 결과가 아닐까 생각된다. 또한 고도별 동물의 서식 밀도와 고도차로 인한 기온의 차이도 고려될 수도 있을 것이다.

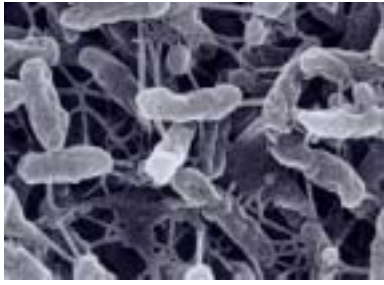
먹는물 공동시설(상시 이용인구 50인 이상인 시설로 시장·군수가 지정하는 시설)의 관리적인 측면으로 현재 2L 당 *Yersinia* 음성으로 되어 있는 먹는물공동시설 수질기준을 정성기준에서 정량기준으로 바꾸거나 병원성이 있는 종류에 한하여 기준을 설정하여야 할 것으로 생각된다.



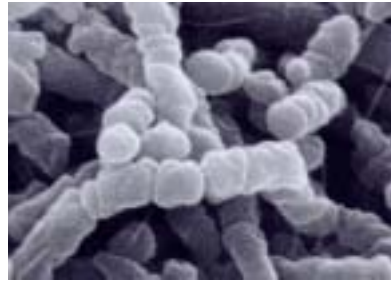
2. 형태 및 Gram 염색상

*Y. enterocolitica*의 편모는 30℃ 이하에서 배양한 균에서는 주편모가 있어 운동을 하고 36℃에서 배양한 균에서는 주편모가 없다(Krieg 등, 1984).

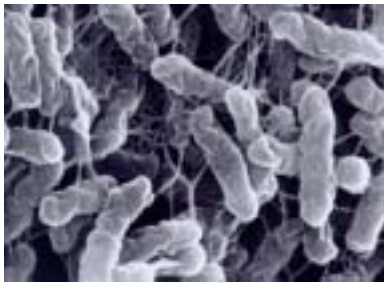
운동성 시험은 표준균주와 시험균주 모두 26℃에서 배양한 균주에서는 양성이었으나 36℃ 배양한 균주에서는 음성반응을 보였으며 전자현미경 사진에서도 26℃에서 배양한 균주는 주편모가 보이고 36℃에서 배양한 균주에서는 주편모가 보이지 않아 Krieg 등 (1984)의 결과와 일치하였다 (Fig. 2).



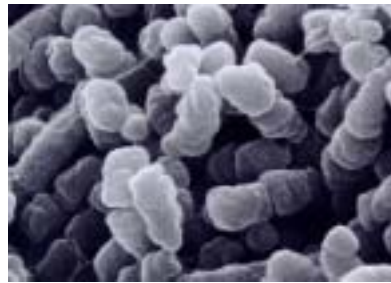
A: 26°C, ATCC 9610



B: 36°C, ATCC 9610



C: 26°C, an isolated



D: 36°C, an isolated



Fig. 2. Electron micrographs of *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 and isolated from spring water cultured at different temperatures.

CIN 배지상에서 집락의 형태는 표준균주와 시험균주 모두 획선 도달했을 때 *Y. enterocolitica* 집락은 점조성이 없고 반투명하며 그 중간에 붉은 색을 띠는 형태를 보였으나, 검체를 여과한 여과지(Millipore: pore size $0.22\mu\text{m}$)를 CIN 배지 위에 올려놓고 배양한 집락의 형태는 전체적으로 아주 얇은 분홍색을 띠었고 먹는물수질공정시험법에 기재된 점액성이 없고 중심부가 짙은 적색을 띠는 작은 집락을 찾기는 어려웠다.

광학현미경하에서 Gram 염색 결과 Gram 음성, 단간균의 형태를 보였다(Table 4).

Table 4. Gram stain and morphological characteristics of the isolates

Items	Morphological characteristics		
	Spring waters	Feces of roe deer	ATTC 9610
Colony color*	Trace pink	-	Trace pink
Colony trait on CIN agar	Nonmucoid and translucent with reddish center	Nonmucoid and translucent with reddish center	Nonmucoid and translucent with reddish center
Gram stain	Negative	Negative	Negative
Morphology	straight rods to coccobacilli	straight rods to coccobacilli	straight rods to coccobacilli

* Colony color membrane filter containing cells grown on CIN Agar

3. 분리된 *Y. enterocolitica*의 생화학적 특징

분리된 *Y. enterocolitica*의 생화학적 검사 결과는 Table 5와 같으며, 자연샘물에서 분리한 균주와 노루에서 분리한 균주의 생화학적 특성은 거의 같았으나 Inositol 분해만이 샘플 80.8%, 노루 100%로 차이가 있었다. 이는 서울 북부 지역 옹달샘에서 inositol에 대한 양성율이 16.7%(변 등, 1998), 경주마 분변에서 76.7%를 보인 것과 차이를 나타내었으며(장 등, 1994), 또한 서울시 약수터에서 분리한 *Y. enterocolitica*에서는 ONPG, ornithine, indole 및 inositol 등 4개의 물질에서 각각 78.6%, 40.6%, 60.0%, 59.5%의 양성을 보인 것(함 등, 1998)과 차이를 나타냈다.

이런 생화학적 다양성과 그에 따른 생물형이나 혈청형의 분포도 가검물의 종류와 분리지역에 따라서 차이가 인정되어지고 있다.

Table 5. Biochemical tests for the isolates based on API kit.

Test or substrate	Spring waters	Feces of roe deer
ONPG	100	100
Arginine decarboxylase	0	0
Lysine decarboxylase	0	0
Ornithine decarboxylase	100	100
Citrate	0	0
H ₂ S	0	0
Urease	100	100
Phenylalanine	0	0
Indole	100	100
V-P(37°C)	0	0
Gelatine	0	0
Glucose	100	100
Manitol	100	100
Inositol	80.8	100
Sorbitol	100	100
Rhamnose	0	0
Melibiose	0	0
Amygdaline	100	100
Arabinose	100	100
Sucrose	100	100
Oxidase	0	0

4. 생물형 동정

*Y. enterocolitica*는 생화학 특성에 의하여 7개의 생물형으로 분류되는데(Winblad, 1978 및 Cornelis, 1987) 시험에 사용된 29균주의 생물형은 Table 6과 같이 1형이 24주(82.8%), 2형이 5주(17.2%)이었고 나머지 생물형은 검출되지 않았다.

Table 6. Biotypes of the isolates from spring waters and feces of roe deer.

Specimen	No. of strain	Biotypes						
		1	2	3	3A	3B	4	5
H1	5	5	-	-	-	-	-	-
H2	3	2	1	-	-	-	-	-
H3	2	2	-	-	-	-	-	-
H4	5	3	2	-	-	-	-	-
H5	7	5	2	-	-	-	-	-
H6	4	4	-	-	-	-	-	-
FRD*	3	3	-	-	-	-	-	-
Total	29	24	5	-	-	-	-	-

FRD* represents feces of roe deer

이는 경주마 분변 중 *Y. enterocolitica*의 생물형 분포가 1형 및 2형 (장 등, 1994)에 속하였다는 결과와 동물원 야생동물에서 분리한 *Y. enterocolitica* 27균주 모두가 1형이었다는 보고(박 등, 1994)와 비슷한 경향이였다.

반면 광주광역시 샘물에서 분리한 균주의 생물형이 1형 및 2형 외에

3A(8.7%) 및 3형(4.3%)이 분포하였다는 결과(배 등, 1998)와는 차이를 보였다. 또한 국내 돼지에서는 1형과 2형 외에 3B형이 57.1% 이었다는 결과(박 등, 1992) 및 수입돼지 및 개의 분변에서 분리한 205균주 생물형이 1형 11.2%, 2형 9.2%, 3형 12.6%, 3A형 19.5%, 3B형 47.3%의 분포를 보인 결과(조 등, 1994)와 급성장염환자에게서 분리한 12균주에 대한 생물형이 3B 및 2형 각 6균주 이었다는 결과(최 등, 1989)와 차이를 보였다.

5. 혈청형 동정

*Y. enterocolitica*의 57개 혈청형(Kapperud 등, 1984) 중 O:1·2혼합, O:3, O:5, O:8, O:9의 5가지 혈청형에 대한 응집 반응 결과는 8/29 (27.6%) 균주에서 혈청형이 분류되었고 혈청별로는 오름샘에서 분리한 2균주가 O:1·2혼합형에, 노루샘 2균주와 영실샘 및 사재비샘 각각 1균주 총 4균주가 O:5형에 응집을 보였고 어리목샘에서 분리된 2균주가 O:8형에 응집반응을 보였다. 그러나 노루에서 분리된 균주를 포함한 나머지 21/29(72.4%) 균주는 응집반응이 일어나지 않았다.

이런 낮은 응집 반응 결과는 몇 안 되는 혈청형을 가지고 실험을 실시한 결과로 많은 종류의 O항원 혈청을 사용하면 다양한 종류의 혈청형을 파악할 수 있으리라 사료된다.

국내 돼지에서 O:3형 79.9%, O:9형 14.5%, O:8형 9.4%의 혈청형 분포를 보인다고 보고 한 결과(박 등, 1992), 수입돼지 및 개의 분변에서 분리한 균주의 혈청형이 O:3형, O:8형, O:5형, O:1·2형, O:9형, O:8형이 각각 34.1%, 27.8%, 13.1%, 12.6%, 4.8%, 13.1%, 12.6%, 4.8%와 미분류 혈청형 7.3%라는 결과(조 등, 1994)와는 큰 차이를 보였다.

Table 7. Serotypes of the isolates from spring waters and feces of roe deer.

Specimen	No of strain	Serotypes					
		O:1 · 2 mixed	O:3	O:5	O:8	O:9	Untypable
H1	5	-	-	1	-	-	4
H2	3	-	-	2	-	-	1
H3	2	2	-	-	-	-	-
H4	5	-	-	1	-	-	4
H5	7	-	-	-	2	-	5
H6	4	-	-	-	-	-	4
FRD*	3	-	-	-	-	-	3
Total	29	2	-	4	2	-	21

FRD* represents feces of roe deer

Y. enterocolitica 혈청형의 분포는 유럽이나 일본에서는 식중독 원인 혈청형으로 O:3과 O:9가 흔하지만 미국의 경우 우유로부터 분리된 혈청형 O:8이고 최근에는 O:3로 바뀌고 있다(Eley, 1996). 이렇듯 검체의 종류와 분리지역에 따라 차이가 인정되고 있으며(조 등, 1994) 또한 비병원성 균주는 생물형 1형인 경우 혈청형 O:5, O:6, O:7, O:8 등은 주로 환경가검물(물, 식품, 토양, 동식물)에서 자주 분리되고 사람으로부터 분리한 *Y. enterocolitica* 대부분이 O:3형, O:9형이라는 결과(최 등, 1989)와 비교하여 볼 때 제주도에서 분리한 *Y. enterocolitica*는 인체 병원균이 아닌 것으로 추정된다.

6. 시험관내 병원성 관련 정상

Y. enterocolitica.의 병원성을 규명하기 위한 적당한 *in vivo* 실험법은 아직 개발되어 있지 않아, *in vitro*에서 발병기작을 밝히기 위한 다양한 시험법이 개발되어 있다(Laird와 Cavanaugh 1980, 장 등, 1994).

Laird와 Cavanaugh (1980)는 우연히 조직배양 배지인 MEM에서 36℃로 배양된 균주가 자가응집을 일으키는 것을 관찰하고, 이 균주를 쥐에 먹여 보았더니 병원성을 나타내고 자가응집을 일으키지 않은 균주는 병원성을 나타내지 않은 것을 알았다. 그 후부터 *Y. enterocolitica* 병원성을 구분하는데 자가응집법이 널리 사용되고 있다.

Table 8. Virulence test for the isolates from spring waters and feces of roe deer.

Specimen	No of strain	AAG [†]	CRMOX
H1	5	-	-
H2	3	1	-
H3	2	-	-
H4	5	-	-
H5	7	1	-
H6	4	-	-
FRD*	3	-	-
Total	29	2	-

FRD* represents feces of roe deer

[†] Autoagglutination

자연샘물 및 야생노루에서 분리한 *Y. enterocolitica* 29주에 대한 시험관내 병원성 관련 성상은 Table 8과 같이 2주(6.9%)만이 자가응집시험이 양성이었으며 검체별로는 노루샘과 어리목샘에서 분리한 균주에서 각각 1균주가 자가응집시험에 양성을 보였을 뿐 나머지 시험관내 병원성 시험에는 모두 음성이었다.

*Y. enterocolitica*의 시험관내 시험법으로 CRMOX 반응이 다른 시험관내 시험과 높은 상관성을 나타낸다고 보고하였다(박 등, 1992). CRMOX 반응을 기준으로 볼 때 CRMOX 반응이 음성인데 AAG 반응에서 6.9%의 양성을 보인 결과는 특이하다 할 수 있다.

또한 환자에서 분리한 *Y. enterocolitica*에서도 CRMOX 반응이나 AAG 반응에서 음성을 나타낸 것(장 등, 1994)으로 보아 *Y. enterocolitica*에 시험관내 시험은 많은 연구가 필요하다고 생각되고, *Y. enterocolitica*의 병원성은 40~48 megadalton 크기의 plasmid의 보유와 진핵세포에 대한 침투능력과 관련된 *ail* (attachment-invasion locus) 유전인자를 보유한 *Y. enterocolitica*는 100% 병원성이 있는 것으로 알려져 있다(임 등, 1999). 따라서 중합효소연쇄반응을 이용하여 *ail* 유전자를 확인함으로써 병원성 여부를 판단하는 것이 바람직하다고 사료된다.

7. 항생제 감수성

Y. enterocolitica 29균주에 대한 항생제 감수성 시험 결과는 Table 9와 같이 aminoglycosides 계열인 amikacin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, tobramycin 과 tetracyclines 계열인 tetracycline 및 기타 chloramphenicol에서는 높은 감수성을 보였으나, β -lactam penicillin 계열인 ampicillin, penicillin과 cephalosporins 및 기타 cepherns 계열인 cephalothin에서는 내성을 나타냈다.

Y. enterocolitica 균의 항생제 내성에 관한 보고는 국내에서 분리된 균

주의 대부분은 chloramphenicol, kanamycin, tetracycline 등의 항생제에는 높은 감수성을 보여준 반면 ampicillin, cephalothin 등에는 내성을 보였다고 보고한 결과(조 등, 1994)와 일치하였다. 그리고 경주마 분변에서 분리

Table 9. Antibiotic test for *Y. enterocolitica* isolated from spring water and feces of roe deer.

Groups	Antibiotics	Spring water	FRD*
Aminoglycosides	Amikacin	S	S
	Gentamycin	S	S
	Kanamycin	S	S
	Streptomycin	S	S
	Tobramycin	S	S
Tetracyclines	Tetracycline	S	S
β-lactam penicillin	Ampicillin	R	R
	Penicillin	R	R
	Carbenicillin	I	I
Cephalosporins and other cepherns	Cefoxitine	I	I
	Cephalothin	R	R
Others	Chloramphenicol	S	S

FRD* represents feces of roe deer

※ S: susceptible, I: intermediate, R: resistant

한 *Y. enterocolitica* 항생제 감수성 시험 결과(장 등, 1994) 및 식품에서 분리한 *Y. enterocolitica*에 대한 항생제 감수성 시험 결과(임 등, 1999)와 동물원 야생동물에서 분리한 *Y. enterocolitica* 27균주에 대한 항생제 감수성 시험 결과(박 등, 1994)와 본 조사에서 얻은 결과가 일치하였다.

V. 참고문헌

- 김경숙, 정운섭, 이삼열, 유연해, 설준희. 1981. 소아의 *Y. enterocolitica* 감염 1예. 대한병리학회지. 15: 429
- 국립보건원. 1996. 감염병 실험실 진단 지침. pp127-130.
- 김홍진, 정희영, 이철, 김병기, 정운섭. 1981. *Shigella*로 오인된 *Y. enterocolitica*에 의한 감염 1예. 대한소아학회지 24: 78
- 남승우, 권의라, 박선경, 빙혜선, 김지영. 1999. 대전광역시 관내 약수터에 대한 *Y. enterocolitica* 균 조사. 대전광역시보건환경연구원보. 1: 7-24
- 박석기, 최철순, 전윤성. 1992. 돼지에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 생물형/혈청형 및 항균약제 감수성. 대한수의학회지 32: 63
- 박석기, 최성민. 1991. 서울지역 옹달샘물의 저온세균에 관한조사.서울시 보건환경연구원보 27: 12-15
- 박석기, 윤은선, 김은정. 1994. 동물원 야생동물에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 생물형, 혈청형 및 항생제 감수성. 대한수의학회지. 34(1): 85-91
- 배동원, 하동룡, 정재근, 조배식, 기혜영, 김선희. 1998. 자연샘에서 분류한 *Y. enterocolitica*의 성상에 관한 연구. 광주광역시보건환경연구원보. 2: 7-26
- 변신철, 최성민, 강신명, 최용석, 이영기, 유영아, 김성원. 1995. 먹는샘물 기준으로 평가한 옹달샘물의 위생 세균학적 연구조사 서울시 보건환경연구원보 31: 1-5
- 변신철, 노우섭. 1998. 서울 북부 지역 옹달샘에서 분리한 *Yersinia* 균속에 관한 연구. 한국환경위생학회지. 24: 141-150
- 성기창, 최원필. 1987. 동물에 있어서 *Yersinia* 균속의 분포와 특성에 관한 연구. 대한수의학회지. 27: 235.

- 식품의약품 안전청. 2000. 식품공전(별책)
- 안승례, 서진태, 지현숙, 이중달. 1981. 성인 장염 환자에서 분리된 *Y. enterocolitica* 5예. 대한병리학회지. 15: 449
- 이영희, 정태화, 이중삼. 1988. 한국에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 병원성에 관한 연구. 미생물학회지. 26: 262-269
- 일본약학회편. 일본 위생시험법 · 주해. 1990
- 임순영, 이동하, 박선희, 박영식, 윤석원, 김창민. 1999. 식품에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 특성조사. 한국식품과학회지. 31: 183-188
- 장영대, 박석기. 1994. 경주마 분변에서 분리한 *Yersiniae*의 생물형, 혈청형 및 항균약제 감수성. 국립수의공중보건학회지. 18(3): 269-277.
- 조현호, 이제용, 서광욱, 이홍길, 김옥경, 김용환, 강호조. 1994. 수입돼지 및 개의 분변 유래 *Yersinia enterocolitica*균의 분포와 특성. 국립수의공중보건학회지. 18(2): 117-125.
- 최철순, 김관옥, 정상인, 양용태. 1989. 급성위장염 환자의 분변에서 분리된 *Yersinia* 균종 및 *Y. enterocolitica*의 혈청군과 생물형. 대한미생물학회지. 24: 143-153.
- 탁연빈. 1992. *Yersinia enterocolitica*의 신속증균법. 국립수의공중보건학회지. 16(1): 1-6.
- 함희진, 안미진. 1998. 최근 5년간 서울시내 약수터에서 분리한 여시니아속균의 균종별 분포 및 생화학적 성장조사. 서울시보건환경연구원보. 환경부. 1999. 먹는물수질공정시험방법
- CDC. 1982. Epidemiologic Notes and Reports Outbreak of *Yersinia enterocolitica* - Washington State. 31(41): 562-564.
- Cornelis, G., Y. Laroche, G. Balligand and G. Vauters. 1987. *Yersinia enterocolitica*: a primary model for bacteria invasiveness. *Rev Infect Dis.* 9: 64

- Cliver, D.O. 1990. *Yersinia enterocolitica*. In Cliver, D.O. (ed.). *Foodborne Diseases*. Academic Press, San Diego. pp224-228
- Doyle, M.P., M.B. Hugdahl and S.L. Taylor. 1981. Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 661-666.
- Eley, A.R. 1996. *Microbiol Food Poisoning*: 2nd ed., Chapman and Hall. pp30-32
- Gourdon, F., J. Beytout, A. Reynaud, J. Romaszko, D. Perre and P. Theodore. 1999. Human and Animal Epidemic of *Yersinia enterocolitica* O:9, 1989-1997, Auvergne, France. Volume 5(5).
- Kaneko, K.I., S. Hamada, Y. Kasai and E. Kato. 1977. Occurrence of *Yersinia* spp. in dogs. *Japan. J. Vet. Sci.* 39: 407.
- Kapperud, G and T. Bergan. 1984. Biochemical and serological characterization of *Yersinia enterocolitica*. In Bergen, TO ed., *Methods Microbial.* 15: 295
- Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* : 1. Baltimore: Willaiams and Willkins. pp498-506.
- Laird, W.J. and D.C. Cavanaugh. 1980. Correlation of autoagglutination and virulence in *Yersinia*. *J. Clin. Microbiol.* 11: 430-432.
- Riley, M. and S. Toma. 1989. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo red-magnesium oxalate agar medium. *J. Clin. Microbiol.* 27: 213-214.
- Winblad, S. 1978. *Yersinia enterocolitica*. *Method in Microbiol.* 12: 37

<Abstract>

A Study on *Yersinia enterocolitica* Isolated from Some Spring Waters and Feces of Roe Deer in Mt. Halla

Han, Chang-Soo

Biology Education Major

Graduated School of Education, Cheju National University Jeju, Korea

Supervised by Professor Oh, Duck-Chul

Yersinosis is known as an infectious disease caused by *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. Some strains of *Y. enterocolitica* give rise to illness in humans. This study was conducted to examine the characteristics of *Y. enterocolitica* strains isolated from six spring waters near the hiking road of Mt. Halla as well as from the feces of roe deer. Data were obtained in several approaches such as biochemical characterization, biotypes, serotypes, virulence and antibiotic test for the isolates, and MPN (most probable number/L) techniques.

Most probable numbers (MPN/L) of *Y. enterocolitica* in spring waters were distributed ranging from 8 to 49 in Yeongsil-spring, 8 to 33 in Seongpanak-spring, >2 to 8 in Eorimok-spring, >2 to 4 in Sajaebi-spring and Noru-spring, and ≥ 2 in Oreum-spring. This suggested that *Y. enterocolitica* strains might be distributed much more in spring waters in the lower altitude than those in the higher altitude.

Twenty nine strains of *Y. enterocolitica* from spring waters and feces of roe deer were selected for several tests. Twenty four strains

* A thesis submitted to the Committee of the Graduate School of Education, Cheju National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Education in February, 2002.

(82.8%) were found to belong to biotype 1, and the rest (17.2%) were biotype 2.

Autagglutination positive was observed in two of them (6.9%). Analysis of serotypes, O:1 · 2 mixed form, O:3, O:5, O:8, and O:9 for the isolates revealed that O:1 · 2 mixed type was identified in two strains (6.9%), O:5 type was in four strains (13.8%), and O:8 type was in other two strains (6.9%), while in the other twenty one strains (72.4%), agglutination for the five serotypes was not observed.

Antibiotic test for strains of *Y. enterocolitica* selected showed that it was resistant to ampicillin, cephalothin, and penicillin.

