

물에서 *Yersinia pseudotuberculosis*의 분리 방법에 대한 비교연구

조종래, 엄태현, 백인기¹

인제대학교 의과대학 진단검사의학과학교실, 일산백병원, 대한적십자사¹

목적 : *Yersinia pseudotuberculosis* 감염증은 사람과 동물에서 물이나 음식을 통하여 발생하며 전 세계에 걸쳐서 보고되고 있다. 물에서 *Yersinia*를 분리하기 위하여 여러 가지 많은 방법들이 시도되어 왔으나 분리율은 아직 낮은 상태다. 이에 저자는 물에서 *Y. pseudotuberculosis*가 가장 잘 분리되는 방법을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법 : 물에서 *Y. pseudotuberculosis*를 분리하는 방법 중 원심침전법과 직접 여과법 그리고 세포 내 배양법에서는 일정 농도의 *Y. pseudotuberculosis*를 사용하였으며, 저온증균 직접법과 저온증균 여과법을 비교하기 위해서는 *Y. pseudotuberculosis* 와 *Escherichia coli*(ATCC25922) 그리고 *Citrobacter freundii*(ATCC8090)를 같은 균 농도로 혼합하여 사용하였다. 원심침전법에서는 물을 5000rpm에서 1시간 동안 원침하여 침전물을 배양하였으며 여과법에서는 물을 음압여과시킨 여과지를 그대로 cefsulodin irgasan novobiocin (CIN) 배지 위에 덮어 균 집락을 조사하였다. 세포 내 배양법에서는 HeLa세포내로 침습한 *Yersinia* 만을 추출하여 CIN배지에 접종하였다.

결과 : 원심 분리법, 여과법, 그리고 세포 내 배양법을 비교한 결과 $3 \times 10^7/100\text{mL}$ 균농도에서는 여과법에서만 균이 분리되었고, $3 \times 10^8/100\text{mL}$ 균농도에서는 세 가지 방법 모두에서 균이 분리 되지 않았다. 그리고 저온증균 직접법과 저온증균 여과법의 비교에서 저온증균 직접법은 $3 \times 10^7/100\text{mL}$ 균농도까지 *Y. pseudotuberculosis*가 분리되었으며 저온증균 여과법은 $3 \times 10^8/100\text{mL}$ 농도까지 균이 분리되었다.

결론 : 물에서 *Y. pseudotuberculosis*를 분리하는 가장 효율적인 방법은 직접 여과법과 저온증균 후 여과법의 두 가지 방법을 병행하여 실시하는 것으로 판단되며 세포 내 배양법은 세포배양 등의 복잡한 전 단계를 거쳐야 됨으로 단순한 분리 방법으로는 부적당한 것으로 여겨진다.

서 론

*Yersinia pseudotuberculosis*는 그람 음성 장내세균으로서 주로 소아에게 발열, 복통, 발진을 주 증상으로 하는 장간막 림프절염(여시니아증)과, 합병증으로 급성 신부전증을 유발하기도 한다[1-12]. 야생 동물의 배설물로부터 오염된 웅달샘의 물(일명 약수물)이나 기타 소독되지 않은 물을 마시므로써 여시니아증이 발생하는 것으로 알려져 있으나[13-16], 물에서 이 균을 분리하는 방법은 상당히 까다롭다[14-17]. 이에 저자는 물에서 *Y. pseudotuberculosis*를 분리하는 가장 효율적인 방법을 찾고자 하였다.

접 수 일: 05/7/20 게재승인일: 05/8/31

교신저자: 조종래

(411-706) 경기도 고양시 일산구 대화동 2240번지

일산백병원 진단검사의학과

TEL: 031)910-7282 FAX: 031)910-7286

E-mail: chocr@ilsanpaik.ac.kr

재료 및 방법

1. 재료

1) 균주 : 물에서 *Y. pseudotuberculosis*의 분리 방법을 서로 비교하기 위하여 저자가 분리하였던 WP931106, WP931201, WP940601의 *Y. pseudotuberculosis* 3 균주와 대조균으로 *Escherichia coli* (ATCC25922) 그리고 *Citrobacter freundii* (ATCC8090)를 이용하였다.

2) 배양 세포 : *Y. pseudotuberculosis*의 세포 내 배양법 [17]을 위해서는 한국 세포 주 은행(Korean cell line bank, KCLB)에서 Human cervical epitheloid carcinoma cell line 인 HeLa (ATCC No., CCL 2 ; KCLB name, KCLB 10002) 세포를 분양 받아 사용하였다.

3) Cefsulodin Irgasan Novobiocin(CIN) media : *Yersinia* selective agar base 59.5 gm(irgasan 4mg이 포함되어 있음, Difco, USA)을 증류수 1,000mL에 넣고 끓

여 완전히 녹인 후 가압 멸균하고 Cefsulodin 4 mg 및 Novobiocin 2.5 mg (Difco, USA)이 포함되어 있는 supplement 1 vial을 첨가하였다[18].

4) **저온증균배지** : 인산 완충 생리식염수액(pH=7.4) 100 mL에 0.25% peptone (Bacto-peptone, Difco, USA)과 0.25% mannitol (Mannitol salt agar, Becton dickinson, USA)이 되게 만들었다[16].

5) **LB(Luria-Bertini) 배양액** : Bacto-tryptone 10 gm, Bacto-yeast extract 5 gm, NaCl 10 gm을 탈이온수 950 mL에 넣고 5 N NaOH로 pH 7.0으로 조정하고 총량이 1,000 mL 되게 맞춘다. 이후 가압 멸균하여 냉장 보관하였다[19].

6) **음압 여과장치** : All glass filter system (Millipore, USA)과 구멍 지름이 0.22 μm인 여과지(Millipore, Cat. # GVWP 04700, USA)를 사용하였다[14].

2. 방법

1) 분리 방법 비교

(1) 원심침전법과 직접 여과법 그리고 세포 내 배양법
 LB broth에 25℃, 48시간 증균시킨, WP931106, WP931201, WP940601의 3 가지 균주를 각각 McFarland 1.0의 혼탁액으로 만든 뒤 10μL를 취하여 인산 완충 생리식염수액(pH=7.4) 1,000mL 씩에 희석하여 농도가 3×10⁷/mL이 되도록 만든 다음, 이 용액 각각 100μL, 10μL, 1μL를 취하여 인산 완충 생리식염수액(pH=7.4) 100mL 씩에 각각 희석하여 최종 균 농도가 3×10⁷/100mL, 3×10⁶/100mL, 그리고 3×1/100mL 되게 하였다. 원심침전법은 RC3C (DUPONT, USA) 원심분리기를 사용하여 미리 준비한 3가지 농도의 균 혼탁액 각각 100mL를 50mL 원심관에 나누어 5,000 rpm으로 1시간 동안 원침한 뒤, 침사액을 다시 하나의 원심관으로 모은 후, 다시 30분 동안 같은 방법으로 원침하여 상층액은 버리고 남은 100μL의 침사액을 직접 CIN배지에 도포하여 25℃, 48시간 동안 배양한 뒤 균 집락을 조사하였다[16]. 여과법은 음압여과

장치를 이용하는데, 균 혼탁액 100mL을 여과지에 통과시킨 뒤 이 여과지를 CIN 배지 표면에 1~2회 문지른 다음 배지에 덮어 25℃, 48시간 배양한 뒤 배지 표면과 여과지 밑에서 자란 균 집락을 조사하였다. 배양 세포에 침습한 *Y. pseudotuberculosis*를 분리할 수 있는 세포 내 배양법을 위해서는 한국 세포 주 은행에서 분양받은 Human cervical epitheloid carcinoma cell line인 HeLa세포를 25 cm²의 조직배양용 플라스크(Green TC-25, 녹십자의공, Korea)에 항생제가 들어 있지 않고 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL, Cat. No 430-3400EB, USA) 배양액으로 2번 계대배양하였다. 0.25%(1×) 트립신(Gibco BRL, Cat. No 610-5050AG, USA)에 30초간 처리하여 세포를 분리하고 50 mL Falcon 튜브에 옮겨 배양액 20 mL을 첨가하여 1,000 rpm, 10분간 원침하였다. 상층액은 버리고 가라앉은 HeLa 세포를 1×10⁶/mL로 맞추어 0.5 mL씩 5 mL 튜브에 분주하였다. 균 혼탁액은 원심침전법에서와 마찬가지로 5,000 rpm으로 1시간 동안 원침한 후, 상층액은 버리고 남은 100μL의 침사액을 HeLa 세포가 있는 5 mL 튜브에 각각 넣어 진탕한 뒤 37℃, 1시간 동안 배양하였다. Gentamicin (Gibco BRL, Cat. No 600-5750AD, USA) 1μg/mL 인산 완충 생리식염수액(pH=7.4)으로 800 rpm에서 5분간 2회 세척하고, 다시 인산 완충 생리식염수액(pH=7.4) 만으로 1회 더 세척하여 상층액은 버리고 남은 세포를 멸균 유리 막대로 부수어 전체 양을 측정 한 뒤, 그 중 10μL을 CIN 배지에 도포하여 25℃, 48시간 배양하였다.

(2) 저온증균 직접법

Y. pseudotuberculosis (WP931201), *E. coli* (ATCC25922) 그리고 *C. freundii* (ATCC8090)의 3가지 균을 혼탁도 MacFarland 1.0으로 맞추어 각각 1μL 씩을 인산 완충 생리식염수액(pH=7.4) 30mL에 희석하였다. 희석된 균 혼탁액 1 mL 씩을 취하여 인산 완충 생리식염수액(pH=7.4) 100 mL에 혼합한 뒤 1mL, 0.1mL, 0.01mL를 취하여 각각의 최종 균 수가 3×10⁷/0.1mL, 3×10⁶/0.1mL, 3/0.1mL 되게 한 후 저온증균배지 100mL에 각각 접종하였다. 4℃에서 1주일간 증균한 뒤 50μL를 취하여 CIN 배지에 접종하

Table 1. Comparison of culture methods - Centrifugation, Filtration, and Intracellular culture

Species	Initial inoculum	Methods		
		Centrifugation	Filtration	Intracellular culture
WP931106	3×1/100mL	0	0	0
	3×10/100mL	0	0	0
	3×10 ⁷ /100mL	2*	78*	0
WP931201	3×1/100mL	0	0	0
	3×10/100mL	0	0	0
	3×10 ⁷ /100mL	0	3*	0
WP940601	3×1/100mL	0	0	0
	3×10/100mL	0	0	0
	3×10 ⁷ /100mL	0	31*	0

*: Number of isolates

Table 2. Comparison of culture methods - Direct inoculation versus Filter inoculation after cold enrichment

Initial inoculum	DICE*			FICE†		
	Y‡	C§	E¶	Y‡	C§	E¶
3 × 1/100mL	0	0	0	0	2.57 × 10 ³ /mL	0
3 × 10/100mL	0	0	0	1 × 10 ⁷ /mL	0	0
3 × 10 ² /100mL	2 × 10 ⁶ /mL	0	0	1 × 10 ⁷ /mL	0	0

*DICE : Direct inoculation after cold enrichment, †FICE : Filter inoculation after cold enrichment, ‡Y : *Y. pseudotuberculosis* (WP 931201), §C : *C. freundii*(ATCC 8090), ¶E : *E. coli*(ATCC 25922)

고 48시간 배양한 뒤 *Y. pseudotuberculosis*로 의심되는 작고 둥글고 건조하며 중심에 짙은 자주빛의 핵이 있는 붉은 균 집락의 수를 세었다.

(3) 저온증균 여과법

저온증균 직접법에서와 마찬가지로 4℃에서 1주일간 증균시킨 각 농도의 배양액 100mL 씩을 음압 여과하였다. 여과지를 0.072%의 KOH용액에 30초간 담근 후 CIN 배지에 심고, 25℃, 48시간 동안 배양한 후 *Y. pseudotuberculosis*로 의심되는 균 집락의 수를 세었다.

결 과

세 균주를 이용한 원심 분리법, 여과법, 그리고 세포 내 배양법을 비교한 결과 3 × 10/100mL 이하의 균 농도에서는 세 가지 방법 모두에서 균이 분리 되지 않았으며, 3 × 10²/100mL 균농도에서는 여과법에서 만 균 분리가 가능했다(Table 1). 그리고 저온증균 직접법과 저온증균 여과법의 비교에서 저온증균 직접법에서는 균 수 3 × 10²/100mL까지, 저온증균 여과법에서는 3 × 10/100mL까지 *Y. pseudotuberculosis*의 분리가 가능하였다(Table 2).

고 찰

전 세계에 널리 퍼져있는 *Y. pseudotuberculosis*는 장내 세균과의 *Yersiniaceae* 속에 속하며 *Yersinia pestis*와 *Yersinia enterocolitica*와 함께 사람에게 감염을 일으키는 주요한 병원균이다[22]. *Y. pseudotuberculosis*는 고열과 설사 및 복통을 수반하는 장간막 림프절염 외에 급성 신부전 [13,14,23], 결절성 홍반[15,16], 패혈증[1,10,16], 급성 충수돌기염[9] 등의 합병증을 유발하기도 한다. 장티푸스나 콜레라 같은 수인성 질환을 유발하는 균들은 예방 대책이나 치료법이 비교적 잘 알려져 있으나 여시니아증을 유발하는 원인균인 *Y. pseudotuberculosis*는 아직 국내에 잘 알려져 있지 않은데, 그 원인은 임상 검체로부터 균의 분리가 어렵고, 특히 주요한 감염원으로 알려진 소독 처리되지 않은 물에서 *Y. pseudotuberculosis*를 분리하는 방법이 까다로우며 분리율이 낮기 때문으로 생각된다[24]. 그러므로 물에서 *Y. pseudotuberculosis*의 분리 방법을 연구하여 균의 분리율을 높이는 일은 질병의 진단 및 예방에

중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

대변에서 *Yersinia spp.*의 검출을 위하여 Pai 등[25]은 저온증균 배양법을 소개하였고, Weissfeld 등[26]은 저온증균배양 후 KOH사용을 권하였으며, Head 등[18]은 선택배지로서 CIN의 사용을 추천하였다. 물에서 *Yersinia spp.*의 검출은 여러 가지 방법들이 사용되었는데 Sato 등 [14,15]은 음압여과 분리법과 아울러 1mL에서 16mL의 물을 전처리 과정없이 CIN배양액이 담겨져 있는 큰 배양 접시에 직접 접종하기도 하였으며, Fukushima[16,17]는 원심 분리 후 KOH처리하는 방법과 세포 내 침습 균을 세포배양법을 이용하여 분리하기도 하였다. 국내에서는 백 등[27]이 Sato의 음압여과법[14]과 Weissfeld의 KOH 처리법[26]을 이용하여 물에서 11 균주를 분리하여 보고하였다. 이렇듯 많은 연구자들이 물에서 *Y. pseudotuberculosis*를 분리하는 여러 가지 방법들을 제시하였지만 실제로 검사실에서 이들 여러 가지 실험 방법들 중 어느 방법이 좋을지 판단하기란 쉽지 않다. 이에 저자는 물에서 *Y. pseudotuberculosis*를 분리하기에 가장 효율적인 방법을 찾고자 하였다.

저자는 원심 분리법, 여과법, 세포 내 배양법, 그리고 저온증균 직접법과 저온증균 여과법의 5가지 방법을 3 × 10²/100mL, 3 × 10/100mL, 그리고 3 × 1/100mL의 3가지 농도의 균액을 이용하여 비교하였다. 원심분리법은 많은 물을 고속으로 원심할 수 있는 큰 용량의 고속 원심분리기를 필요로 하는 것과 원심 후 상층액을 버릴 때 균의 일부가 함께 버려져 최종 분리 균수가 적은 단점이 있었다. 여과법은 조사대상 물속에 있는 균을 거의 빠뜨리지 않고 배양할 수 있는 장점은 있으나 *Y. pseudotuberculosis*가 적고 다른 균들이 많을 경우에는 다른 균들에 의해 *Y. pseudotuberculosis*가 억제되어 균을 분리하기 어려운 단점이 있었다. 본 연구의 결과에서는 물 100mL당 균 수가 3개 및 30개인 물에서는 세가지 방법 모두에서 균이 자라지 않았다. 균 수가 300개일 때, 원심분리법에서는 한 균주에서, 여과법에서는 3 가지 균주 모두에서 *Y. pseudotuberculosis*가 분리 되는 것을 보여 주어 여과법이 더 우수한 것을 보여 주었다. 세포 내 배양법은 세포 내 침습성 균을 직접 분리할 수 있는 장점은 있으나 세포 배양에 따르는 어려움과 세포 밖에 있는 균을 사멸 시키는 일 그리고 세포 안에 있는 균을 세포 밖으로 돌출 시키는 일 등의

여러 가지 어려움이 뒤 따르는 문제점이 있다. 저온증균 배양법의 실험에서는 *Y. pseudotuberculosis*만 물에 접종하여 실험하는 것은 의미가 없다고 판단되어 실제 약수물이나 우물물과 비슷한 조건을 만들기 위하여 물속에 존재하는 *E. coli* ATCC25922와 *C. freundii* ATCC8090를 *Y. pseudotuberculosis*와 함께 배양액 속에 넣었다. 이는 저온증균 배양에서 다른 균들이 존재할 때 *Y. pseudotuberculosis*의 분리를 어떻게 하는 것이 가장 효율적인 분리 방법이 될 것인가를 알려줄 것으로 기대하였다. 연구 결과에서와 같이 저온증균 배양 후 직접 평판 배지 위에 접종하는 것 보다는 여과하여 그 여과지를 KOH 처리한 뒤 CIN에 심는 방법이 더 효율적인 것으로 나타났다. 그리고 처음 물속에 접종한 균의 수가 낮은 $3 \times 1 / 100\text{mL}$ 에서 *C. freundii*가 많이 자란 이유는 물속에 *Y. pseudotuberculosis*의 수가 적으면 *C. freundii*에 의해 *Y. pseudotuberculosis*의 성장이 가려져 검출이 어렵다는 것을 실험적으로 보여 주었고, $3 \times 10 / 100\text{mL}$ 와 $3 \times 10^2 / 100\text{mL}$ 균 농도에서 *Y. pseudotuberculosis*만 배양된 이유는, *C. freundii*나 *E. coli*가 성장하기 어려운 낮은 온도와 알카리 전처리 등의 조건들 때문에 이 정도의 균 농도에서는 *Y. pseudotuberculosis*가 더 잘 성장한 것으로 보인다.

이상과 같은 실험 결과에서 물에 *Y. pseudotuberculosis* 수가 많을 경우에는 직접 여과법이, 균 수가 적을 때는 저온증균 후 여과법이 가장 효율적으로 이 균을 분리하는 방법으로 판단되어 실제 실험실에서는 두 방법의 병용이 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Park MS and Choi Y. *Yersinia pseudotuberculosis* infection complicated with acute renal failure. J Korean Med Assoc 1990;33:1.
2. Jung GH, Kim YM, Kim MW, Kim SK, Park MS, Jang JG. A Case of Acute Interstitial Nephritis Associated with *Yersinia Pseudotuberculosis* Infection. J Korean Pediatr Soc 1990;33:1122-7.
3. Lee HJ, Jung HI, Choi Y, Shin MJ, Moon HR. Epidemic of Acute Renal Failure and Kawasaki Disease-Like Illness caused by *Yersinia pseudotuberculosis* Infection. J Korean Med Assoc 1988;31:747-56.
4. Jung KH, Ju HJ, Kim YM, Kim SK, Park MS, Jang JG et al. A Case of Erythema Nodosum due to *Yersinia Pseudotuberculosis*. J Korean Pediatr Soc 1990;33:528-33.
5. Chung YH, Choi TY, Chung WS, Park SH, Kim CW, Kim KH. A case of septicemia and erythema nodosum with *Y. pseudotuberculosis*. Korean J Clin Pathol 1981;1: 89-94.
6. Goo JS, Moon HR, Kim DW, Park MH, Cho HI, Kim SI. A Case of *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia. Korean J Pathol 1982;16:536-9.
7. Kim JJ, Kang CK, Lee KY, Jung YS, Lee SY, Han DS. A Case of *Yersinia Pseudotuberculosis* Septicemia. Korean J Clin Pathol 1985;5:11-5.
8. Park HJ, Kim E, Kim JM, Kim YB, Hong CS, Lee WY, et al. A Clinical Study on 32 cases of Non-plague Yersiniosis. Korean J Infect Dis 1987;19:39-46.
9. Takeda H, Mori M, Tanaka T. Nephropathy of *Yersinia pseudotuberculosis* infection. Media-circle 1985;30:415.
10. Lee MK, Lee WI, Lee HJ, Sun JT. A Case of Septicemia due to *Yersinia pseudotuberculosis* serovar O5. Korean J Clin Pathol 1993;13:637-42.
11. Seo IH and Choi TY. Four Cases of *Yersinia* Species Isolated by Using CIN Media. Korean J Clin Pathol 1992;12: 369-74.
12. Goo MS, Ahn SI, Yoo BY. A Case of Mesenteric Lymphadenitis due to *Yersinia pseudotuberculosis* 5b. Korean J Infect Dis 1993;25:253-8.
13. Inue M, Nakashima H, Kamikasa H, Tanimoto H, Ishida T, Tanaka T, et al. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in the Okayama Prefecture. Media-circle 1985;30:367.
14. Sato K and Komazawa M. Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from drinking water. Media-circle 1985;30: 426.
15. Sato K and Komazawa M. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children due to untreated drinking water. Contrib Microbiol Immunol 1991;12:5-10.
16. Fukushima H. Direct isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from fresh water in Japan. Appl Environ Microbiol 1992;58:2688-90.
17. Fukushima H. Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from a stream water using direct alkaline inoculation and HeLa cell treated technique. Media-circle 1994;39:19.
18. Head CB, Whitty DA, Ratnam S. Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. J Clin Microbiol 1982;16:615-21.
19. Choi YK. Clinical molecularbiology method. 1st ed. Seoul; Korea Medical Publishing, 1993;44.
20. Ewing WH. Edward and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. New York; Elsevier Science Publishing, 1986;462.
21. Joo HJ, Jung GH, Kim YM, Kim SK, Park MS, Jang JG, et al. An Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* Infection. J Korean Pediatr Soc 1990;33:342-50.
22. Inoue, M, Nakashima H, Ishida T, Tsubokura M, Sakazaki R. Isolation of *Y. pseudotuberculosis* from water. Zentralbl Bakteriolog Hyg Mikrobiol[B] 1988; 186:338-43.
23. Pai CH, Sorger S, Lafleur L, Lackman L, Marks MI.:

- Efficiency of cold enrichment techniques for recovery of *Yersinia enterocolitica* from human stools. J Clin Microbiol 1979;9:712-5
26. Weissfeld AS and Sonnenwirth AC: Rapid isolation of *Yersinia* spp. from feces. J Clin Microbiol 1982;15:508-10
27. Paik IK, Cho CR, Goo JW, Kim EC. *Yersinia pseudotuberculosis* Infection in Northeastern Part of Seoul. Korean J Infect Dis 1994;26:1-7.

Comparative study for Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from Water

Chong Rae Cho, Tae Hyun Um, and In Ki Paik¹

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Inje University, Ilsanpaik Hospital, and Seoul Seobu Blood Center, Korea Red Cross¹, Seoul, Korea

Background: *Yersinia pseudotuberculosis* is recognized throughout the world as a cause of water- or food born infections in human and animals. Although many attempts have been made to define optimal conditions for the isolation of the organism from water, their isolation yields remain low; therefore, we tried to find an effective method for the recovery of *Y. pseudotuberculosis* from water.

Methods: Water samples were deliberately contaminated with *Y. pseudotuberculosis* at various levels and then processed by the following three isolation methods: centrifugation, direct filtration, and intracellular culture. For the centrifugation method, the water samples were centrifuged at 5000 rpm for 1 hr and the final precipitates were inoculated in cefsulodin-irgasan-novobiocin (CIN) media. For the filtration method, the water samples were filtered by negative pressure and the filter papers were put directly on CIN media. For the intracellular culture method, the organisms were extracted from the HeLa cells that had been infected with *Y. pseudotuberculosis* and inoculated on CIN media. We also examined the efficacy of the filtration method after cold enrichment with a mixture of *Y. pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Citrobacter freundii*.

Results: With the concentration of $3 \times 10^2/100$ mL, *Y. pseudotuberculosis* was isolated only by the filtration method; however, none of the culture methods were good enough to recover the organism from the water sample when the concentration was $3 \times 10/100$ mL. With cold enrichment, however, the recovery was much more efficient; the organism grew after direct inoculation or after filter inoculation when the starting concentrations were $3 \times 10^2/100$ mL or $3 \times 10/100$ mL, respectively.

Conclusion: A combined use of direct filtration and filter inoculation after cold enrichment is the most effective method to yield *Y. pseudotuberculosis* isolation. The introduction of effective methods for the isolation of *Y. pseudotuberculosis* from untreated drinking water would increase the awareness by the public of the health hazard of spring water.

(Korean J Clin Microbiol 2005;8(2):136–141)

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, Water, Isolation method

Address reprint requests to : Chong Rae Cho, Laboratory Medicine, Ilsanpaik Hospital,
2240, Daehwadong, Ilsangu, Goyang, Kyunggido 411-706, Korea.
Tel. +82-31-910-7282 Fax. +82-31-910-7286 E-mail: chochr@ilsanpaik.ac.kr