

제주지역 양식넙치의 연쇄구균증 발생동향 및 원인균에 대한 분자적 동정

정용욱 · 강철영 · 김민주 · 허문수 · 오덕철¹ · 강봉조^{2,*}

제주대학교 해양과학부, ¹제주대학교 생명과학과, ²제주도해양수산자원연구소*

제주지역 양식넙치의 주요 세균성 질병의 일종인 연쇄구균증 발생동향과 특성을 분석하였다. 제주지역 양식넙치의 연쇄구균증은 연중 발생하는 양상을 보였으나 상대적으로 고수온기에 발생율이 높았으며 30 cm 이상의 개체에서 주로 관찰되었다. 2003년 6월부터 2005년 5월 사이에 분리된 연쇄구균 균주를 multiplex PCR assay 기법을 이용하여 종 조성을 분석한 결과 *Streptococcus iniae*와 *S. parauberis*로 동정되었으며 그 비율은 각각 46%와 54%이었다. *S. iniae*는 상대적으로 9월과 10월에 높은 분리율을 나타내었으나 *S. parauberis*는 3월과 4월에 분리율이 높게 나타났다. *S. iniae*와 *S. parauberis* 감염개체의 병리학적 증상은 일부분 유사하였으나 *S. iniae* 분리개체는 복부팽만, 탈장, 복수저류증상이 주로 관찰되는 반면, *S. parauberis* 분리개체는 체색흑화, 무안축 발적 증상이 두드러지게 관찰되었다. 이 두 종의 병원체 모두 ampicillin과 amoxicillin에 감수성이 높았으며, *S. iniae* 균주들은 *S. parauberis* 균주들보다 상대적으로 doxycycline, erythromycin, oxytetracycline에 감수성이 높았다.

Key words □ olive flounder, Streptococcosis, *S. iniae*, *S. parauberis*, multiplex PCR assay

양식어류의 연쇄구균증은 세균성 질병 중에서 피해규모가 매우 큰 질병으로서, 사육어종이 다양하고 병원체가 기회감염성을 나타내어 숙주가 다양하거나 또는 숙주 특이성으로 인해 관련된 병원체가 비교적 다양하여 *Streptococcus iniae*, *S. parauberis*, *S. diffcilis*, *S. shiloi*, *Lactococcus garvieae*, *L. piscium*, *Vagococcus salmoninarum* 등이 보고되고 있다(4, 5, 6, 7, 8, 9, 15). 또한 동일어종에 연쇄구균증이 발병해도 병원체의 종류에 따라 병원성이 달라지기도 하는데, 대표적인 어류 연쇄구균증 병원체 *S. iniae*와 *L. garvieae*의 병원성이 달라 동일어종에서도 병리학적 특성과 반수치사율(LD₅₀) 등이 다른 것으로 보고되어 있다(10).

양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 연쇄구균증 병원체에 대한 최초 연구보고는 Nakatsugawa(16)에 의해 일본산 넙치의 연쇄구균증 원인균을 *S. iniae*로 보고하였으며, 국내의 연구보고는 Lee 등(12)에 의해 생화학적 성장과 16S rRNA 유전자 gene의 특이서열을 이용하여 *L. garvieae*가 넙치의 연쇄구균증 병원체로 보고되었다. 또한 Jung 등(11)에 의해 생화학적 성장과 16S-23S ISR (Intergenic Spacer Region) 서열 등을 이용하여 *S. iniae*를 동정한 연구보고 등이 있다.

어류질병에 대한 예방을 위해서는 기본적으로 병원체에 대한 종수준의 동정, 혈청형의 분류, 병원성인자, 숙주의 감수성, 발병경로 등 질병에 대한 전반적인 연구가 요구된다. 그러나 양식어류의 질병은 여러 질병이 존재하고 다양한 어종이 여러 지역에 산재하여 체계적인 연구들이 부족한 실정이다.

한편, 항생제에 대한 내성문제나 고품질의 식품에 대한 소비자의 욕구가 날로 증가되고 있는 가운데, 친환경적인 생산방법의 일부인 백신개발 필요성은 더욱 더 증가하고 있는 실정이다. 그러나 백신을 개발하기에 앞서 국내산 양식넙치 또는 기타 양식어류의 연쇄구균증 병원체에 대한 포괄적인 종 동정 연구, 혈청형에 대한 연구, 특히 본 질병이 유행시기, 성장에 따른 감수성의 차이 등 병리생태학적 기초연구들이 전반적으로 미흡한 실정이다. 또한 어류의 면역체계가 하등하여 특이항체 생성 소요기간이 포유동물에 비해 느리고, 면역학적 기억 지속기간이 낮은 특성을 가지고 있다(13, 18, 19). 따라서 어류 백신프로그램의 효과적인 적용에 있어서 이러한 병리 생태학적 기초연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 우리나라의 대표적 양식넙치(*P. olivaceus*) 생산지인 먼서도 아직 체계적으로 연구보고가 되어 있지 않고, 또한 지리적으로 격리되어 국지적이거나 국제적인 병원체의 유입이 제한적인 제주도 양식넙치의 연쇄구균증 병리생태학적인 연구를 수행하여 양식생물 질병방제 연구의 기초적 자료를 제시하고자 하여 실시하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

연쇄구균증 질병 발생동향 조사를 위해 2003년 6월부터 2004년 5월 사이에 제주도 내에서 대표적 넙치(*P. olivaceus*) 양식지역인 동부, 동남부, 서부의 넙치 양식장에서 외관상 질병에 감염된 것으로 추정되는 각각의 병어 1,365 개체에서 안구, 뇌, 신장

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 064-780-6090, Fax: 064-710-4155
E-mail: kbc1922@jeju.go.kr

등을 무균적으로 적출하여 본 연구에 사용하였으며, 외부적으로 정상적인 개체의 시료를 대조군으로 사용하였다. 연쇄상구균을 분리하기 위해 1.5% NaCl-BHIA (Brain Heart Infusion Agar, Difco, USA)와 용혈성을 감별하기 위한 혈액한천배지(Komed, Korea)에 분리된 조직액 및 조직을 도말한 후 30±0.5°C에서 24-48 시간 동안 배양하였다. 배양된 세균은 Thoesen 등(20)의 방법에 따라 *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Streptococcus* spp. 등으로 간이 동정을 실시하였으며, 분리된 *Streptococcus* spp. 중 용혈성별로 한 균주씩을 순수 분리한 후 1.5% NaCl-BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Difco, USA)에 배양 후 멸균 glycerol을 첨가하여 -80°C에 보관 후 중 동정에 이용하였다.

Multiplex PCR assay를 통한 *Streptococcus* spp.의 종 동정

2003년 6월부터 2005년 5월 사이에 연쇄구균증을 나타내는 병어 573 개체 중 무작위로 140 개체를 선발하였고, 이 개체들에서 분리된 *Streptococcus* spp. 198 균주에 대해 분자적 종 동정을 실시하였다. 각 균주들을 1.5% NaCl-BHIA에서 배양하였고, 2 - 3 개의 colony를 5% Chelex (BioRad, USA) 100 µl에 균질화하고 95°C에서 10분간 boiling하여 genomic DNA를 분리하였다. 분자적 종 동정은 Mata 등(14)의 방법을 응용하여 *S. parauberis*, *S. iniae*, *L. garveiae* 각 3종에 대해 동시에 종 동정이 가능한 3종의 primer set (Spa-2152, Spa-2870, LOX-1, LOX-2, pLG-1, pLG-2)을 이용한 multiplex PCR assay를 실시하였고, 1.2% agarose gel에서 수평 전기영동하여 각각의 병원체를 동정하였다. 또한 KCTC (Korean collection for type cultures)로부터 *Streptococcus iniae* KCTC 3657, *Streptococcus parauberis* KCTC 3651, *Lactococcus garveiae* KCTC 3772를 분양 받아 동정에 이용하였다. Primer sequence와 목적하는 증폭산물의 크기는 Table 1에 나타내었다.

***S. iniae*와 *S. parauberis* 감염에 의한 외부 병리학적 특이소견의 조사**

무작위로 선별된 140 개체의 연쇄구균증 병어들의 외부 병리학적 소견을 정리하여 특성을 조사하였다. 검사항목은 체색의 흑화, 복부팽만, 탈장, 복수지류, 복벽출혈, 안구돌출 및 출혈, 아가미 덮개출혈, 무안축 발적 등을 조사하였다.

약제 감수성 시험

종 동정이 완료된 198 균주에 대한 약제 감수성 시험은 Muller Hinton agar를 이용하여 Ampicillin 등 8 종의 항생제에

대해 disk 확산법을 이용하여 실시하였다. 감수성 시험에 사용한 항생제는 ampicillin, amoxicillin, ciprofloxacin, doxycycline, erythro-mycin, nalidic acid, oxolinic acid, oxytetracycline 등으로 BBL사 제품을 사용하였다. *S. iniae*와 *S. parauberis*의 항생제 감수성의 차를 알아보기 위해 균주별로 각 항생제에 대해 감수성이 유무에 따라 각 항목별 백분율로 나타내었고, 분리된 연쇄구균의 균종들 간에 특이 감수성 양상을 비교하였다.

결과 및 고찰

연쇄구균증의 발생동향

연쇄구균증 발생동향을 파악하기 위해 2003년 6월부터 2004년 5월까지 제주도내 넙치 양식장을 대상으로 세균성 및 기생충성 질병에 감염된 것으로 판단되는 시료집단에 대한 질병검사결과 전체 1,365건 중 301건이 복합 또는 단독으로 연쇄구균증에 감염된 것으로 조사되어 연쇄구균에 의한 감염률은 질병증상을 보여 채집된 시료의 약 22.1% 수준이었다.

넙치 시료크기별 연쇄구균증 발생동향은 각각 10 cm 미만의 치어에서 2건이 발생하였고 10 cm 이상 20 cm 미만의 개체군에서 12건, 20 cm 이상 30 cm 미만의 개체군에서 65건, 30 cm 이상 40 cm 미만의 개체군에서 137건, 40 cm 이상의 개체군에서 85건이 관찰되어, 넙치 치어단계에서부터 성어단계에 이르기까지 연쇄구균증이 발생하고 있으나 주로 30 cm 이상의 성어에 주로 발병하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 본 질병은 치어기의 개체에도 감수성을 보이고 있으나 비교적 양성기의 개체에 높은 발병양상을 나타내는 것으로 판단된다(Table 2).

월별 발생동향을 분석해 보면 주로 8월, 9월, 10월이 상대적으로 발생율이 높게 나타났으며, 사육수온이 낮은 1월과 2월에도 외관상 질병 감염으로 판단되어 채집된 시료의 각각 5.0%와 6.3%에서 *Streptococcus* spp.가 분리되어 월별로 발생비율은 차이가 있으나 연중 발병하는 특성을 나타내었다. 이러한 양상은 저수온기 육지부의 해수온도가 최저 약 5°C 전후까지 하강하는 것과는 달리 제주도의 양식장은 지하해수를 유입하여 사용함으로써 사육수온이 겨울철에도 13°C이상 유지된다(1)는 것과는 연관성이 높은 것으로 사료된다(Table 2).

일반적으로 질병의 감수성은 성장에 따른 면역체계의 발달 정도에 따라 반비례하고, 병원체 증식에 필요한 최적 증식온도 조건에 비례하는 등의 여러 양상이 복합적으로 관계되어진다. 그러나 본 연구 결과에서는 주로 30 cm 이상의 성어에게서 높은 감수성을 나타내었다. 이러한 특성은 양식어류의 관리사양 특성에

Table 1. Primer sequences used for species specific PCR detection assay and the expected amplicon sizes

Primer	Sequences (5' to 3')	Target gene	PCR amplicon size (bp)	Pathogen
Spa 2152	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG	23S rRNA	718	<i>S. parauberis</i>
Spa 2870	GCTTCATAIATCGCTATACT			
LOX-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	Lactate oxidase (<i>lctO</i>)	870	<i>S. iniae</i>
LOX-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA			
pLG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16S rRNA	1,100	<i>L. garveiae</i>
pLG-2	GCACCCTCGGGGTTG			

Table 2. Occurrence of streptococcosis related to the size and month of cultured flounder in Jeju island from 2003 to 2004

Month	No. of samples for infected with streptococci					Sum & ratio (%) ^a	No. of total diseased samples
	<10	10 ≤ < 20	20 ≤ < 30	30 ≤ < 40	40 ≤ -		
Jan.				9	6	15 (5.0)	75
Feb.		2	6	6	5	19 (6.3)	78
Mar.			1	10	12	23 (7.6)	92
Apr.		1	4	12	14	31 (10.2)	86
May	1	1	1	9	11	23 (7.6)	122
Jun.	1		6	5	9	21 (7.0)	182
Jul.		1	11	4	9	25 (8.3)	165
Aug.			10	16	5	31 (10.2)	117
Sep.		1	13	22	3	39 (13.0)	100
Oct.		1	9	16	3	29 (9.6)	140
Nov.		3	3	15	3	24 (8.0)	111
Dec.		2	1	13	5	21 (7.0)	97
Sum & ratio (%) ^b	2 (0.7)	12 (4.0)	65 (22.0)	137 (46.0)	85 (28.0)	301	
No. of total samples	163	434	371	264	133		1,365

ratio(%)^a, ^bStreptococcosis detection ratio by monthly(%)^a and fish size(%)^b.

기인된 것으로 판단되어지는데 첫째, 일반적으로 치어를 대부분 2월에서 3월에 입식하고 1년간 사육하여 치어기보다는 양성기에 고수온 환경에 지속적으로 노출되어지는 특성을 보이고 있고 둘째, 치어기의 공급 사료는 배합사료로서 제품 공정차원에서 병원체의 제거가 이루어지나, 양성기의 급여사료는 병원체의 제거가 고려되지 않은 어류 생육과 어분 등이 첨가된 자체 제작 습사료를 공급하여 병원체에 의한 경구 감염이 이루어질 수 있는 개연성을 가지고 있다. 셋째, 사육수조 사용기간에 비례하여 병원체의 균총이 상주하거나 점차 늘어날 수 있는 특성 등으로 인해 치어기보다는 양성기의 개체에 감수성이 높아진 것으로 판단된다.

제주도 양식납치의 연쇄상구균증 관련 병원체의 동정 및 생태학적 특성

2003년 6월부터 2005년 5월 사이에 연쇄구균증을 나타내는 병어 573 개체 중 무작위로 140 개체를 선발하였고, 이 개체들에서 분리된 *Streptococcus* spp. 198 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 모두 Gram 양성 구균, Catalase 음성, Cytochrome oxidase 음성이었다. 또한 대조구로 채집된 외견상 정상어의 경우는 신장, 뇌 등의 조직시료로부터 세균이 분리되지 않았다(자료 미제시).

분리균주에 대한 종 동정을 실시하기에 앞서 국내 해산어 연쇄구균증 원인균과 연관성이 있을 것으로 추정되는 *S. iniae*

(KCTC 3657), *S. parauberis* (KCTC 3651), *L. garvieae* (KCTC 3772) 등 국내 보유 표준균주에 대해 먼저 분자생물학적 종 동정을 실시하였다. 분석 기법은 각각의 어류 연쇄구균 병원체 종 특이 primer들을 모두 일시에 사용하여 각각의 종 동정이 일시에 가능한 multiplex PCR assay(14)의 방법에 따라 실시하였다. 표준균주에 대한 multiplex PCR 기법을 수행한 결과 비특이적인 반응은 관찰되지 않았으며, *S. iniae* (KCTC 3657), *S. parauberis* (KCTC 3651), *L. garvieae* (KCTC 3772) 모두 예상되었던 각각의 증폭산물, 약 870 bp, 718 bp, 1,100 bp의 증폭산물을 확인하였다(Fig. 1). 각각의 표준균주들에 대한 multiplex PCR 기법을 수행한 결과 Table 1에 나타난 증폭 크기와 일치함에 따라 *S. iniae*, *S. parauberis*, *L. garvieae* 등 3 종의 연쇄구균증에 병원체에 대한 종 동정이 가능함을 확인하였다.

상기의 실험방법과 동일한 조건의 multiplex PCR assay를 실시하여 병원체의 종 동정 분석을 실시한 결과 전체 대상 균주 198 균주 중 *S. iniae*가 91 균주로 46%의 검출률을 보였고, *S. parauberis*가 107 균주로 54%의 검출률을 보였다. 그러나 Lee 등(12)의 연구보고로 양식 납치(*P. olivaceus*)의 연쇄구균증 병원체로 여겨졌던 *L. garvieae*는 본 연구에서는 검출되지 않았다(Table 3). 또한 multiplex PCR assay를 통한 동정결과와 용혈성 시험결과를 비교해 볼 때 *S. iniae*는 β 용혈성이었고 *S.*

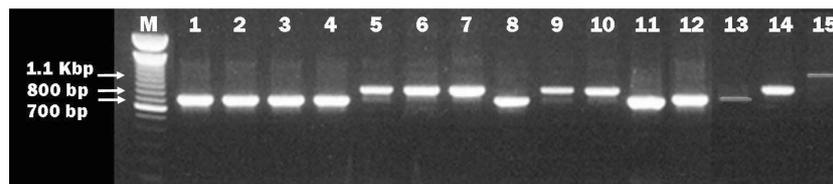


Fig. 1. Multiplex PCR assay for detection of *S. parauberis* (718 bp), *S. iniae* (870 bp) and *L. garvieae* (1,100 bp). 198 isolated strains of streptococci identified to *S. parauberis* and *S. iniae* species in Jeju island flounder farms from 2003 to 2005. M, 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA); lane 1-12, isolated strains; lane 13, *S. parauberis* (KCTC 3651); lane 14, *S. iniae* (KCTC 3657); lane 15, *L. garvieae* (KCTC 3772).

Table 3. Monthly isolation rate of *S. iniae*, *S. parauberis* and *L. garvieae* associated of streptococcosis flounders related in Jeju Island from June 2003 to May 2005

Month	No. of isolated streptococcosis causative pathogens			No. of tested strains
	<i>S. parauberis</i>	<i>S. iniae</i>	<i>L. garvieae</i>	
Jan.	2	3	-	5
Feb.	5	5	-	10
Mar.	15	5	-	20
Apr.	19	5	-	24
May	13	7	-	20
Jun.	6	3	-	9
Jul.	7	9	-	16
Aug.	8	11	-	19
Sep.	4	15	-	19
Oct.	11	15	-	26
Nov.	8	9	-	17
Dec.	9	4	-	13
Sum	107	91	-	198
Isolate rate(%)	54	46	0	

*parauberis*는 α 또는 γ 용혈성을 보였다. 본 연구에서는 *S. iniae*, *S. parauberis*에 대한 병원성 규명을 위한 감염실험은 수행되지 않았으나 연쇄구균증 소견을 보이는 대부분의 시료에서 다른 세균은 분리되지 않았고 *Streptococcus* spp.가 공통적으로 분리된 점, 대조구로 사용한 정상어류 시료로부터 세균이 분리되지 않은 점(자료 미제시)등을 볼 때 제주도 양식농가의 연쇄구균증은 *S. iniae*와 *S. parauberis* 두 종이 직간접적으로 관여하는 것으로 추정된다. 국내의 경우 해산 양식어류의 연쇄구균증 원인균과 관련한 연구는 대부분 *S. iniae*에 대해서 연구가 이루어졌으며, 국내외적으로 어류의 전형적인 연쇄상구균 병원체로 알려져 있다 (18).

한편, 양식터봇(*Scophthalmus maximus*)의 연쇄구균 병원체로 보고된 α 용혈성 *S. parauberis*는 출혈 및 농양을 동반한 안구돌출, 복부 또는 복벽의 점상출혈, 비장과 신장의 점액성 출혈을 유발하는 것으로 보고되었고(6), 인위 감염결과 3×10^4 cells/fish 농도에서 50% 이상 폐사하여 병원성이 인정되고 있다(5). 국내 양식농가에서의 연구보고는 Baeck 등(3)이 제주도에서 연쇄구균증을 보이는 양식농가에서 *S. parauberis*를 분리하여 보고한 바가 있고, 인위 감염결과 *S. parauberis*에 의한 폐사와 내부 장기의 병리학적 소견 그리고 외부증상이 *S. iniae*에 의한 외부증상과 다름을 보고한 바가 있다(2). 본 연구의 결과가 제주도라는 지역적 제한성이 존재하고 비록 2년간의 연구로 단기간의 조사라는 점을 감안할 때 보다 장기적인 연구가 필요하고, 또한 양식농가(*P. olivaceus*)의 연쇄구균증 병원체로서 *L. garvieae*에 대해 보다 면밀한 연구와 더불어 병원성에 대한 세부연구가 좀더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

*S. iniae*와 *S. parauberis*의 월별감염현황은 *S. iniae*의 경우 고수온기 또는 소강기인 9월과 10월이 상대적으로 높은 검출률을 나타냈으며, *S. parauberis*의 경우 사육수온이 14°C에서 17°C사

이인 3월부터 5월에 상대적으로 높은 검출 비율을 보였다(Table 3). Nguyen 등(17)에 의하면 *S. iniae*는 고수온기에 전염성이 높은 병원체로 보고하였고, 9월에서 10월까지 많이 검출되는 것으로 보고하여 본 연구내용과도 일치하는 특성을 보였다. 한편 아직 *S. parauberis*에 의한 연쇄구균증 발병 최저온도에 대한 연구 보고는 없으나, 스페인에서 사육되어지는 저온성 양식어종인 터봇(*S. maximus*)에 연쇄구균증을 유발하고 있는 것으로 알려져 있다(6). 따라서 본 연구에서 *S. parauberis*가 주로 고수온기보다는 저수온기에 상대적으로 높게 분리되고 있는 것으로 볼 때, 각 연쇄구균 원인균의 우점적인 유행시기는 사육수온과 연관성이 있을 것으로 사료된다.

***S. iniae*와 *S. parauberis*에 의한 양식농가 병어의 임상학적 특성**

S. iniae, *S. difficile*에 감염된 어체의 임상학적 소견은 안구돌출, 뇌수막염, 패혈증이 주요 병리학적 소견으로 보고되고 있고 *L. garvieae*의 경우 패혈증에 의한 급성 전신 질환을 보여 각 병원체간에 병리학적 특성이 다른 것으로 알려져 있다. 또한 치사율도 각각 다른 것으로 보고되었다(7, 9, 10). 따라서 제주도 양식농가에서 분리된 각 병원체에 의한 외부 병리학적 특성과 각 병원체의 병원성에 대한 상관관계에 대한 연구도 필요하다고 사료된다.

본 연구조사에서 각각 *S. iniae*와 *S. parauberis* 감염으로 관찰된 양식농가의 외부임상소견을 조사해본 결과 전체적으로는 흑화, 복부팽만, 탈장, 복수저류, 복벽내출혈, 안구돌출 및 출혈, 아가미 덮개출혈, 무안측(non-ocular side) 발적 등이 관찰되었다. *S. iniae* 감염개체는 대조적으로 복부팽만, 탈장, 복수저류가 높은 비율로 조사되었고 *S. parauberis* 감염개체는 체색흑화 및 무안측 발적이 대조적인 증상이었다(Table 4). 외부병리학적 소견과 해당 병원체의 병원성의 상관관계는 좀 더 체계적인 연구가 이루어져야 될 것으로 사료되나, 본 연구 결과에서 밝혀진 *S. parauberis* 감염 개체의 외부병리학적 특성은 추후에 병원성이나 이에 따른 병리학적 특성을 평가하는 데에 있어 유용한 기초 자료로 활용될 것으로 기대된다.

*S. parauberis*와 *S. iniae* 균주들의 항생제 감수성 비교를 실시

Table 4. Comparison of external symptoms of olive flounder infected by *S. parauberis* and *S. iniae* in Jeju aqua culture area

Symptoms	Incidence of symptoms (%)	
	<i>S. parauberis</i>	<i>S. iniae</i>
Darkened surface	26.2	10.7
Distended abdomen	3.9	17.9
Protruded anus	1.0	22.6
Ascitic fluid in the peritoneal cavity	9.7	29.8
Haemorrhaging in the inner surface of abdomen	24.3	22.6
Exophthalmia	18.4	23.8
Haemorrhaging in the eye	17.5	14.3
Haemorrhaging in the opercular region	14.6	10.7
Haemorrhaging in the non-ocular side	20.4	4.8

Table 5. Comparison of antibiotics susceptibility ratio between *S. parauberis* and *S. iniae*

Antibiotics	Rate of antibiotics susceptibility (%)	
	<i>S. parauberis</i>	<i>S. iniae</i>
Ampicillin	96.1	95.1
Amoxicillin	99.0	97.6
Ciprofloxacin	74.5	67.5
Doxycycline	47.1	85.5
Erythromycin	47.1	91.6
Nalidixic acid	1.0	0
Oxolinic acid	14.7	2.4
Oxytetracycline	18.6	57.8

한 결과 *S. parauberis*와 *S. iniae* 균주들에서 공통적으로 높은 감수성을 보인 항생제는 ampicillin과 amoxicillin과 같은 페니실린계 항생제로 95% 이상의 높은 감수성을 보였으며, *S. parauberis*의 경우 *S. iniae*와는 달리 상대적으로 doxycycline, erythromycin, oxytetracycline에 대해 낮은 감수성을 보였다(Table 5). 따라서 두 병원체 모두 양식현장에 공통적으로 존재하며 독립 혹은 혼합 감염 양상을 나타내기 때문에 진단과 치료연구에 본 연구 결과의 활용이 기대된다.

상기의 연구 결과들을 종합해 본다면 제주도 양식넙치(*P. olivaceus*)의 연쇄구균증은 육지부와는 달리 계절에 따라 변동폭은 있으나 연중 발생하고 있으며, 주로 30 cm 이상의 성어에 높은 감수성을 보이고 있고, 연쇄구균증에 관련된 종은 *S. iniae*와 *S. parauberis*로 판단되는데, 대체로 고수온기에는 *S. iniae*에 의한 감수성이 높아지는 반면에 저수온기를 기점으로 수온이 14°C에서 17°C사이로 변동하는 봄철에는 *S. parauberis*에 의한 감수성이 높아지는 특성을 나타내고 있다.

본 연구는 양식넙치의 연쇄구균증 예방대책 연구의 일환으로 발생동향 분석 및 원인균의 종 동정에 대한 기초 연구로써 어류 백신개발 등의 예방학적 연구 등에 유용하게 이용될 것으로 사료되며, 또한 넙치 연쇄구균증의 병리학적 연구의 필요성에 따라 현재 저자의 연구실에서 *S. iniae*와 *S. parauberis*에 대한 감염학적 특성을 연구 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 제주대학교 친환경해양산업뉴프론티어전문인력양성 사업에 의하여 지원되었음.

참고문헌

1. 강봉조. 2003. 제주지역 양식장의 질병증상 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리되는 세균의 특성에 관한연구. 제주대학교 박사학위논문. p.10-20
2. 조미영, 이덕찬, 최희정, 강봉조, 정승희, 김진우. 양식넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리한 *Streptococcus parauberis*의 병원성. 2006년도 수산관련학회 공동학술대회 발표요지집. p. 516-517

3. Baeck, G.W., J.H. Kim, D.K. Gomez and S.C. Park. 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *J. Vet. Sci.* 7, 53-58.
4. Berovier, H., C. Ghittino, and A. Eldar. 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organism. *Dev. Biol. Stand.* 90, 153-160.
5. Curras, M., B. Magarinos, A.E. Toranzo, J.L. Romalde. 2002. Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. *Dis. Aquat. Org.* 52, 129-136.
6. Domenech, A., J.F. Fernandez-Garayzabal, C. Pascual, J.A. Garcia, M.T. Cutuli, M.A. Moreno, M.A. Moreno, M.D. Collins, and L. Dominguez. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.* 19, 33-38.
7. Eldar, A., Y. Bejerano, and H. Bercovier. 1994. *Streptococcus shiloi* and streptococcus *difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.* 28, 139-143.
8. Eldar, A., A. Horovitz, and H. Bercovier. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56, 175-183.
9. Eldar, A., M. Goria, C. Ghittino, A. Zlotkin, and H. Bercovier. 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1005-1008.
10. Eldar, A. and C. Ghittino. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: similar but different diseases. *Dis. Aquat. Org.* 36, 227-231.
11. Jung, Y.U., B.J. Kang, G.T. Park, and M.S. Heo. 2004. Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region for identification in the fish pathogenic *Streptococcus iniae*. *J. Fish Pathol.* 17, 91-98.
12. Lee, D.C., J.I. Lee, C.I. Park, and S.I. Park. 2001. The study on the casual agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.* 14, 71-80.
13. Leong, J.C., E. Anderson, L.M. Bootland, P.W. Chiou, M. Johnson, C. Kim, D. Mourich, G. Trobridge. 1997. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Dev. Biol. Stand.* 90, 267-77. Review.
14. Mata, A. I., A. Gibello, A. Casamayor, M. M. Blanco, L. Dominguez, and J. F. Fernandez-Garayzabal. 2004. Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3183-3187.
15. Muzquiz, J. L., F. M. Royo, C. Ortega, I. D. Blas, I. Ruiz, and J. L. Alonso. 1999. Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19, 114-119.
16. Nakatsugawa, T. 1983. A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology* 17, 281-285.
17. Nguyen, H.T., K. Kanai, and K. Yoshikoshi. 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. *Aquaculture*. 205, 7-17.
18. Tatner, M. 1986. The ontogeny of humoral immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12, 93-105.
19. Tatner, M.F. and M.J. Manning. 1983. The ontogeny of the cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 69-75.
20. Thoesen, J. C. 1994. Bluebook, suggested procedure for the detec-

tion and identification of certain finfish and shellfish pathogens.
American fisheries society.

(Received June 20, 2006/Accepted September 24, 2006)

ABSTRACT: Characterization of Streptococcosis Occurrence and Molecular Identification of the Pathogens of Cultured Flounder in Jeju Island

Yong-Uk Jeong, Chul-Young Kang, Min-Ju Kim, Moon-Soo Heo, Duck-Chul Oh¹, Bong-Jo Kang^{2,*} (Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, ¹Department of Life Science, College of Natural Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, ²Jeju Province Fisheries Resources Research Institute, Jeju 699-810, Korea)

Streptococcosis of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) is an important bacterial disease in Jeju island. In this study, we investigated monthly infection pattern of this disease in different size of the flounder fish. Even though the disease occurred throughout the year, the infection ratio was relatively higher in the months with warm water season. The infection was more prevalent in adult flounder over 30 cm total length compare to these of small size fish. Two infectious species of streptococcosis pathogens were detected by multiplex PCR assay. Detection ratios of *Streptococcus iniae* and *S. parauberis* reached up to 46% and 54%, respectively, from June 2003 to May 2005 in Jeju island. *S. iniae* occurred intensively from September to October, whereas *S. parauberis* reported from March to May. *S. iniae* and *S. parauberis* infections of cultured flounder share some common features, but clinical findings showed considerable differences between two diseases. Distended abdomen, protruded anus and ascitic fluid in the peritoneal cavity are evident lesions detected in *S. iniae* infection, whereas, flounders infected by *S. parauberis* showed prominent lesions such as darkened surface and haemorrhaging in the non-ocular side. Both streptococcosis pathogens were sensitive to antibiotics, such as ampicillin and amoxicillin. However, *S. iniae* strains were more sensitive to doxycycline, erythromycin and oxytetracycline than *S. parauberis* strains.