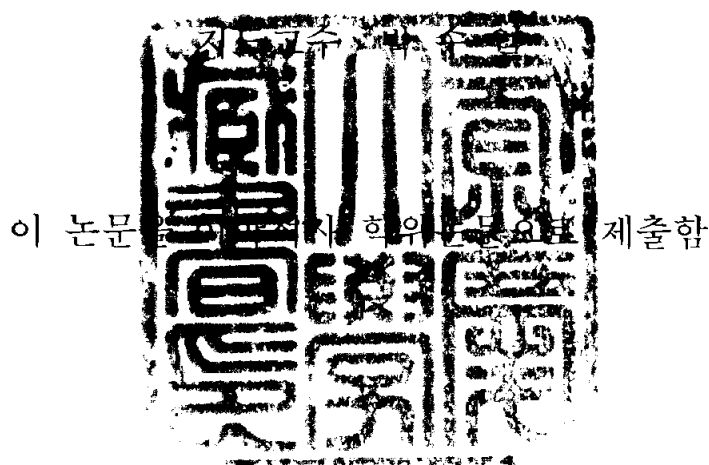


이학석사 학위논문

*Streptococcus iniae*의 형태학적 특성과
병원성



2004년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

김 현 정

김현정의이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 26일

주 심 농 학 박 사 허 민 도



위 원 이 학 박 사 김 기 홍



위 원 농 학 박 사 박 수 일



목 차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 세균의 분리	6
2. 세균의 형태학적 시험	7
3. 생화학적 성상 시험	7
4. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰	7
5. 시험 균주의 extracellular products (ECPs)에 대한 효소 활성 시험	8
5-1. 세균의 ECPs 추출	8
5-2. ECPs의 효소 활성 측정	8
5-3. ECPs의 세포 독성 효과 시험	9
5-4. ECPs가 chemiluminescence response에 미치는 영향	9
6. 시험 균주의 넘치 혈청에 대한 저항성 시험	9
6-1. 혈청의 준비	9
6-2. 넘치 혈청에 대한 시험균의 저항성 시험	10
6-3. 넘치 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화 시험	10
7. 시험 균주의 식균율과 식균 지수의 측정	10
8. 넘치 두신 macrophages에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정	11
8-1. 넘치 두신 macrophages의 분리	11
8-2. 시험균의 준비 및 시험균의 감작	11
8-3. Chemiluminescence (CL) response	12
9. 넘치 두신 macrophages의 bactericidal activity에 대한 저항성 시험	12
10. Macrophage 및 어류 주화 세포에 대한 각 균주의 invasion activity 시험	12
11. 병원성 시험	13
12. 통계학적 분석	14

III. 결 과	15
1. 세균의 형태학적 특성	15
2. 세균의 생화학적 특성	17
3. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰	17
4. 시험균의 extracellular products (ECPs)의 효소 활성 시험	19
5. 시험균 ECPs의 어류 주화 세포에 대한 세포 독성 시험	19
6. Chemiluminescence (CL) response에 대한 ECPs의 영향	22
7. 시험균의 넙치 혈청에 대한 저항성	23
7-1. 혈청에서의 생존능 시험	23
7-2. 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화	24
8. Whloe blood에서의 균주별 식균율과 식균 지수의 측정	26
8-1. Whloe blood에서의 균주별 식균율	26
8-2. Whloe blood에서의 균주별 식균 지수	27
9. 넙치 두신 macrophages의 균주별 CL response	28
10. 넙치 두신 macrophages에서의 균주별 생존능 측정	29
11. Macrophage 및 어류 주화 세포에 대한 각 균주의 invasion activity 시험	30
11-1. Macrophage에 대한 각 균주의 invasion activity	30
11-2. CHSE-214 cell line에 대한 각 균주의 invasion activity	31
12. 병원성 시험	34
IV. 고 찰	36
V. 요 약	42
VI. 감사의 글	44
VII. 참고 문헌	45

Morphological characteristics and pathogenicity of *Streptococcus iniae*

Hyun-Jeong Kim

Department of Fish Pathology, Graduate School

Pukyong National University

Abstract

Streptococcus iniae is one of the major bacterial pathogens of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. Pathogenesis of *S. iniae* will be related with many potential virulent factors. One of the most important factors is suggested the polysaccharide capsule possessing the anti-phagocyte and resistant to serum bactericidal activity. This study was carried out to investigate the interaction between polysaccharide capsule and immune responses such as phagocytosis and serum killing activity. The seven strains of *S. iniae* (KS1-KS7) and KCTC 3657 were used in this study. They were differentiated phenotypically into two groups, the viscous colonies (KS1, KS2 and KS3) and non-viscous colonies (KS4, KS5, KS6, KS7), but the strains in both groups were similar in physiological and biochemical characteristics. Electron microscopic examination of the viscous form revealed thick, electron-dense exopolysaccharide materials surrounding polycationic ferritin-pretreated cells, while the exopolysaccharide material was absent

around the non-viscous form.

To assess the virulence of these *S. iniae* strains, several factors were analyzed, such as pathogenicity for olive flounder, the activity of enzyme, ECPs cytotoxicity to CHSE-214, the effect of macrophages chemiluminescence (CL) response by ECPs were analyzed. The viscous type strains were more virulent than non-viscous type strains for olive flounder. In the enzymatic activities of bacteria, the virulent strains have the stronger leucine arylamidase activity than non-virulent strain. All of the tested *S. iniae* strains ECPs were cytotoxic for CHSE-214 cells and effected CL response of head kidney macrophages. The viscous *S. iniae* strains were resistant to normal serum killing activity, while non-viscous strains were susceptible to normal serum of bactericidal activity in olive flounder. The viscous strains were more resistant to opsonophagocytosis and decreased the CL response of head kidney macrophages of olive flounder. All of the tested *S. iniae* strains were efficiently destroyed by the macrophages after phagocytosis. Both virulent and non-virulent strains invaded and replicated in cultured fish cell line (CHSE-214). This cellular invasion may contribute to the pathogenesis of invasive *S. iniae* infection.

From the results, the virulent strains of *S. iniae* have polysaccharide capsule and they could resist to phagocytic clearance and serum killing activity. Also, invasion capability and direct cytotoxicity may be a mechanism to delay or avoid phagocytosis and host immune response.

I. 서 론

우리 나라의 어류 양식 생산의 대부분을 차지하는 넙치 양식은 1989년 이후부터 종묘 생산과 양식 산업이 활성화되면서 고밀도 사육 방법과 대규모 양식 기술 개발로 생산성이 더욱 증가되기 시작하였다. 해양수산부의 통계 자료에 따르면 2002년도에 국내 넙치 양식의 총 생산량은 23,343톤에 이르며 지역적으로 경상도와 전라남도를 비롯하여 넙치 생산량의 50% 이상을 차지하는 제주도 지역을 포함하는 남해안 지역에서 활성화되어 있다. 그러나, 생산성 향상은 고밀도 사육과 과다 사료 투여 등을 통한 스트레스나 수질 악화를 초래하여 양식 어류의 질병을 유발시키는 인자로 작용하여 큰 피해를 내고 있다. 해양 수산청의 집계 자료를 보면 특히, 넙치의 경우에 세균성 질병으로 인한 폐사율이 55%라는 높은 비율을 차지하고 있고, 세균성 질병 중 연쇄 구균에 의한 발병 보고가 약 17.4%를 기록하고 있다. 현재 넙치의 연쇄 구균병의 원인체로 분리되는 균들 중 *Streptococcus iniae*가 차지하는 비중이 점차 증가하고 있으며, 지역적으로도 넙치가 주요 양식 어종인 제주 지역에서 우점적으로 분리되는 연쇄 구균병의 원인체 중 대부분이 *Strep. iniae*인 것으로 확인된 바 있다 (우, 2002).

*Strep. iniae*는 우리 나라를 포함한 미국, 이스라엘, 오스트레일리아, 일본 등지의 담수 및 해수 양식에 막대한 경제적 손실을 입히는 연쇄구균병의 원인체이다 (Berridge et al., 1998). *Strep. iniae*는 Amazon River dolphins, *Inia geoffrensis*에서 최초로 보고된 이후 (Pier and Madin, 1976), 나일틸라피아, *Oreochromis nilotica*, 은어, *Plecoglossus altivelis*, 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*, 뱀장어, *Anguilla japonica*, 넙치, *Paralichthys olivaceus*, 망어, *Seriola quinqueradiata*, 홍민어, *Sciaenops ocellatus*, gilthead sea bream, *Sparus aurata*, European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, barramundi, *Lates calcarifer* 등 다양한 어종에서 보고되어 있다 (Kitao et al., 1981; Ohnishi and Jo, 1981; Ugajin, 1981;

Kawahara and Kusuda, 1987; Sakai et al., 1989; Zlotkin et al., 1998a; Bromage et al., 1999; Eldar and Ghittino, 1999; Eldar et al., 1999). 또한, 이 병원체는 질병에 걸린 사람에서도 분리 보고된 바 있다 (Weinstein et al., 1997). 최근에 이스라엘의 St. Peter's fish, *Tilapia* spp.와 무지개송어, *O. mykiss*의 세균성 뇌수막염 병소에서 분리 동정된 *Streptococcus shiloi*가 Eldar et al. (1995)에 의해 표현형, 혈청형, 유전형 (DNA-DNA hybridization)적으로 *Strep. iniae*와 동일하다는 것이 밝혀졌다.

일반적으로 *Strep. iniae*에 의한 질병은 고수온기에 많이 발생하며, 우리나라의 경우 대체로 수온이 18℃ 이상으로 상승하는 6월에서 다음해 1월까지 지속되는 경우가 많으며 발병되면 급성적으로 50% 이상의 대량 폐사를 일으키거나 만성적인 폐사를 일으키는 경향이 주로 나타난다 (우, 2002; 이, 2001; 전, 2000). *Strep. iniae*에 감염된 어류의 주요 증상으로는 체색의 흑화, 주둥이의 발적, 안구의 돌출과 각막의 백탁, 새개 내측의 발적과 농양 및 간의 울혈이 관찰되고 복수가 고이며 심한 경우 탈장이 되기도 한다 (Kusuda and Salati, 1999).

현재까지 포유류에서 질병을 일으키는 streptococcal pathogen의 병원성 요인에 대한 연구는 많으며, 그 중 가장 일반적으로 알려져 있는 병원체인 group A streptococcus (GAS)는 다양한 병원성 요인을 가지고 있는데, 균체 표면에 M protein과 hyaluronic acid capsule 등이 존재하여 식작용에 저항성을 나타내고, 숙주의 상피 세포에 쉽게 부착하여 세포 내로 침입하도록 돕는다 (Bisno et al., 2003). 이외에도 Streptolysin O나 Streptolysin S와 같은 cell associated hemolysin을 가지고 있어 in vitro와 in vivo 상에서 사람의 다양한 세포와 조직에 독성 작용을 하며 (Carr et al., 2001; Sierig et al., 2003), hyaluronidase, streptokinase와 streptococcal pyrogenic exotoxin B (Spe B)와 같은 효소는 조직에 손상을 입혀 농을 형성하고 숙주 조직 내로 병원체의 확산이 빠르게 일어나도록 한다 (Kuo et al., 1998; Bisno et al., 2003).

하지만, 현재까지 *Strep. iniae*의 혈청형이나 병원성 요인 등에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 최근에 이스라엘의 무지개송어 양식장에서 *Strep. iniae* 백신을 처리한 후 동종의 다른 균주에 의한 피해가 발생하여, 두 균주를 비교해 본 결과 arginine dihydrolase의 활성과 rapid amplified polymorphic DNA (RAPD) 기법으로 구별이 되었으며 (Zlotkin et al., 1998), 혈청학적 분석에서도 초기에 사용한 균주 (AD+ve)와 이후에 분리된 균주 (AD-ve) 사이에 항원적 차이를 나타내어 각각 Serotype I 과 Serotype II로 분류하였다. Serotype I에 대한 항혈청은 Serotype II와 응집이 일어나지 않지만, Serotype II에 대한 항혈청은 Serotype I 과 약간의 교차 반응이 일어나는 것을 확인할 수 있었다 (Bachrach et al., 2001). 그러나, 이러한 분류가 분리된 모든 *Strep. iniae*에 적용되는지 여부는 확실하지 않으며, 대부분 담수 어종에서 연구가 이루어지고 있어 해수어에서 분리되는 *Strep. iniae*의 특성과 병원성 요인에 대한 연구가 필요하다.

*Strep. iniae*와 질병의 임상 증상 및 병리학적 증상이 유사한 것으로 알려진 *Lactococcus garvieae*의 경우 (Eldar and Ghittino, 1999), 병원성 요인으로 항원성의 차이와도 관련이 있는 capsule을 가지는 것으로 확인되었다 (Yoshida et al., 1996; Ooyama et al., 1999). 이러한 capsules은 capsules을 가지고 있지 않은 KG+ phenotype 항혈청과의 응집을 억제하고, 방어의 전신 phagocytes가 opsonophagocytosis하는데 있어서 저항성을 가지게 하는 것과 관련이 있을 것으로 추측되고 있다 (Yoshida et al., 1996, 1997). 또한, 교차 응집 반응 결과를 통해 KG- phenotype의 capsule이 KG+ 응집 항체에 대한 binding site를 cover하고 있으며, KG- phenotype cells을 이물질로서 인식하는데 있어서 capsule이 방해하는 것으로 여겨지고 있다 (Alim et al., 1996; Ooyama, 1999). Cwuprynski et al. (1988)는 capsulated bacteria는 capsule로 인해 serum opsonin과의 결합력이 감소되고 식세포 결합에 필요한 ligand에 접근하기 어렵

기 때문에 식작용에 저항성을 나타낸다고 하였다. 식작용에 대한 저항성 이외에도 capsulated bacteria는 specific antibody가 존재함에도 불구하고 complement-mediated serum killing activity에 저항성을 나타내었다 (Barnes et al., 2002). 세포 표면 성분 이외에도 cell-associated hemolysins과 같은 extracellular products (ECPs) 등이 어류에 병원성을 나타내는 streptococci에서 병원성과 관련이 있을 것으로 추정되고 있다 (Kawahara et al., 1989; Sakai et al., 1991; Yoshida et al., 1996).

현재까지 우리 나라 양식 넙치의 심각한 세균성 질병을 유발하는 *Strep. iniae*는 그 질병의 발생 빈도와 양식에서의 피해량은 크지만 질병에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이며, 이러한 질병에 대해 예방의 목적으로 안전하고 효과적인 백신의 개발과 보급이 절실하다. 그러나 이스라엘 송어 양식의 경우에 있어서는 연쇄 구균병의 예방책으로서 특이적인 *Strep. iniae* 백신을 처리하였으나 강한 병원성을 가진 동종의 다른 균주에 의한 피해 사례 (Bachrach, 2001)에 비추어 효과적인 vaccine 개발을 위한 균주간의 특성과 병원성에 대한 연구가 필요한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 우리 나라의 대표적 해수 양식 대상종인 넙치 및 조피볼락에서 분리된 *Strep. iniae*의 균주별 형태학적 특성에 따른 병원성의 차이와 다른 세균에서 일반적으로 알려진 여러 가지 병원성 요인을 함께 평가하여 *Strep. iniae* 병원성과 관련되는 기초적인 자료를 확립하고자 하였다. 즉, 균주 간에 병원성 요인으로 작용할 수 있는 세균 세포 외막의 capsule의 존재 여부를 확인하고 그에 따른 capsule과 병원성과의 상관관계를 조사하였다. 그리고 균주에 따른 extracellular products (ECPs)의 효소 활성과 세포 독성 효과 및 ECPs가 넙치 macrophage의 식작용에 미치는 영향을 평가하여 이들이 *Strep. iniae*의 병원성 요인으로 작용할 수 있는지를 평가하였다. 그리고 *Strep. iniae* 균주가 세포 표면 특성에 따라 숙주의 체액성 방어 기작에 저항성을 나타내는지 확인

하기 위해 넘치 정상 혈청과 항혈청에서의 생존능을 평가하였다. 또한, 넘치 macrophage의 식작용에 대해 이를 회피하는지를 확인하기 위하여 식균율과 식균 지수를 평가하였고 macrophage의 CL response를 통해 숙주 방어 작용에 대한 저항성을 평가하였다. 그리고, 세균이 식작용된 이후 macrophage 내에서의 생존 여부를 bactericidal activity를 통해 확인하였으며, macrophage와 일반적인 어류 주화 세포 내로 invasion할 수 있는지 여부를 확인하여 *Strep. iniae*의 병원성과 이에 관여하는 요인을 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세균의 분리

본 연구에 사용된 균주들은 40~800g의 넙치, *Paralichthys olivaceus*와 200g 전후의 조피볼락, *Sebastes schlegeli*에서 연쇄구균병의 증상이 전형적으로 관찰되는 안구 주위의 농양액, 복수액, 뇌, 간장, 비장, 신장 및 심장에서 조직을 무균적으로 적출하여 1.5% NaCl 첨가 BHIA 배지에 도말한 후 28℃에서 24~48시간 배양하여 분리한 균을 실험에 사용하였다. 비교를 위해 사용된 참조 균주로는 각각 Williams et al. (1990)의 KCTC 3651, *Streptococcus parauberis*, Pier et al. (1976)의 KCTC 3657 *Streptococcus iniae* 및 Kusuda et al. (1976)의 ATCC 49156, *Lactococcus garvieae*를 사용하였다.

Table 1. *Streptococcus iniae* strains used in this study

Strain		Origin	
Reference strains(n=3)	KCTC 3651	mastis sample milk	Williams & Collins, 1990
	KCTC 3657	Amazon freshwater dolphin	USA, 1972
	ATCC 49156	Yellowtail	Japan, 1974
Present isolated strains(n=7)	KS 1	Olive flounder	Tongyoung, 1998
	KS 2	Olive flounder	Tongyoung, 1998
	KS 3	Black rockfish	Jeju, 1999
	KS 4	Olive flounder	Jeju, 1998
	KS 5	Olive flounder	Jeju, 1999
	KS 6	Olive flounder	Jeju, 1999
	KS 7	Olive flounder	Jeju, 1999

2. 세균의 형태학적 시험

1.5% NaCl 첨가 BHIA 배지에서 28℃, 24~48시간 배양하여 순수 분리한 원인균의 colony 성장과 균의 형태, 크기, Gram 염색성 및 운동성을 관찰하였다.

3. 생화학적 성장 시험

MacConkey agar와 SS agar에서의 발육 상태를 조사하고, 10%, 40% bile이 첨가된 bile esculin medium (BEM)과 0.01% TTC 첨가 BHIA에서의 배양 상태를 확인하였으며, BHI broth를 이용하여 4%, 5%, 6%, 6.5% NaCl에 대한 증식 유무와 10℃, 25℃, 37℃, 45℃, pH 9.6 등의 조건 하에서 배양 특성을 조사하였다. 생화학적 성장 시험은 시험 균주를 1.5% NaCl 첨가 BHIA 배지에서 25℃, 48시간 배양한 다음 MacFaddin (2000)의 방법에 따라 수행하였다.

4. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰

Capsule의 유무를 확인하기 위해 TEM을 행하였다. 먼저 혈청학적 특징과 colony 형태의 차이 및 arginine dihydrolase 이용능 차이를 토대로 KS1, KS2, KS3 그리고 KS4, KS5, KS6 및 KS7을 시험 균주로 선정하였고 참조 균주로 KCTC 3657과 negative control로서 *Lact. garvieae* ATCC 49156을 사용하였다. 시료의 준비 과정은 Barnes et al. (2003)의 방법을 변형하여 행하였다.

각 균주를 BHIB에 접종한 후 25℃에서 24시간 배양한 후 3,000g, 10분간 원심 분리한 다음 phosphate-buffered saline (PBS, 0.2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2M Na_2HPO_4)으로 세척하고 약 Macfarland 2 standard의 탁도가 되도록 맞추었다. 현탁액은 각 균주에 대한 항혈청을 10배 희석이 되도록 첨가한 후 4℃에서 overnight 반응시킨 다음 3,000g, 10분간 원심 분리하여 집균한 후 phosphate buffer로 두 번 세척하였다. pellet은 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2, 4℃)에 24시간 전고정하고 3번 세척한 다음 phosphate buffer에 재현탁하여 polycationic

ferritin (Sigma)을 최종 농도가 1 mg ml^{-1} 이 되도록 첨가한 후 20°C 에서 30분간 반응시켰다. 1% osmium tetroxide (pH 7.2)로 4°C 에서 2시간 동안 후고정한 후 Alcohol 탈수 과정을 거쳐 propylene oxide로 치환한 후 Epon 혼합물로 열중합 처리를 한 다음 ultrathin section ($60\sim 90\text{nm}$)하였다. 이러한 과정을 거쳐 제작한 미세 절편을 grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 TEM (JEM 1200-II, JEOL)으로 관찰하였다.

5. 시험 균주의 extracellular products (ECPs)에 대한 효소 활성 시험

5-1. 세균의 ECPs 추출

각 시험균의 ECPs 추출은 Zhang & Austin (2000)이 행한 cellophane overlay 방법으로 실시하였다. 약술하면, 멸균된 셀로판지를 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA 배지 위에 깔고 1.5% NaCl이 첨가된 BHIB의 overnight 세균 배양액 0.2ml을 셀로판지 위에 퍼뜨린다. 28°C 에서 72시간 배양한 후 셀로판지 위에 배양된 세균을 차가운 0.1M PBS (pH 7.2) 1ml에 부유시켰다. 이를 4°C , 14,000rpm, 15분 동안 원심 분리한 후 ECPs로 구성된 상정액을 $0.45\mu\text{m}$ 와 $0.2\mu\text{m}$ 의 syringe filter에 여과시킨 다음 -70°C 에 사용할 때까지 보관하였다. ECPs의 단백질 농도 측정은 Bio-Rad kit를 이용하였으며 standard로 bovine serum albumin (BSA; Sigma)을 사용하여 실시하였다.

5-2. ECPs의 효소 활성 측정

API ZYM kit을 사용하여 평가하였다. 추출한 ECPs를 0.1M PBS (pH 7.2)로 10배 희석한 후 API ZYM kit의 각각의 cupule에 $65\mu\text{l}$ 씩 분주하여 28°C , overnight 배양 후 결과를 판정하였다.

5-3. ECPs의 세포 독성 효과 시험

세포 독성 효과를 보기 위하여 어류 주화 세포 Chinook salmon embryo (CHSE-214)을 사용하였다. 48 well plate (Falcon)에 CHSE-214를 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic (GibcoBRL)이 첨가된 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, pH 4, Sigma)을 사용하여 20℃, 24시간 단층 배양하여 세포 독성 시험을 실시하였다. 준비된 각 균주의 ECPs 농도는 원액, 10배 및 100배 희석액을 사용하여 각 well에 1% antibiotic-antimycotic만 첨가된 EMEM을 0.9ml 첨가한 후 각 농도의 ECPs를 0.1ml씩 첨가하였다. 그리고 negative control로 ECPs 추출시에 사용하였던 0.1M PBS를 사용하였으며, 20℃, 24시간 배양하여 세포 독성 효과를 확인하였다.

5-4. ECPs가 chemiluminescence response에 미치는 영향

2×10^5 cell ml^{-1} 로 조정된 macrophage를 96 well plate에 $50\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 실험에 사용하였으며, luminol (Sigma)은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 준비하였다. $50\mu\text{l}$ 의 세포액에 1mg ml^{-1} 의 ECP를 각각 2배, 8배, 32배, 128배, 512배 희석하여 $50\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 $100\mu\text{l}$ 의 luminol working solution을 넣어서 10분간 반응시킨 다음 준비한 감작 zymosan을 각각 $50\mu\text{l}$ 씩 첨가하였고, 대조구에는 Hank's balanced salt solution (HBSS)를 $50\mu\text{l}$ 첨가하여 lumicount (Packard)로 측정하였다. 측정 시간은 50분간이었으며 각 시료에 대한 peak 값을 구하였다.

6. 시험 균주의 넙치 혈청에 대한 저항성 시험

6-1. 혈청의 준비

시험에 사용한 혈청은 전장 25~30cm, 전중 140~150g인 넙치를 아미노 안식향산 에틸 50ppm으로 3~5분간 마취시킨 후 1회용 주사기를 사용하여 미부 정

맥에서 채혈하여 분리하였다. 채혈된 혈액은 상온에서 1시간 방치하고, 4℃에서 3시간 정치한 후 8,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 이렇게 분리한 혈청을 사용 전까지 -20℃에 보관하였다.

6-2. 넙치 혈청에 대한 시험균의 저항성 시험

시험균의 넙치 혈청에 대한 저항성 시험은 Barnes et al. (2003)의 방법으로 행하였다. 간략히 설명하면, 1.5% NaCl 첨가 BHIB에 28℃, overnight 배양한 균을 1,500g, 20분간 원심 분리하여 집균한 다음 멸균 PBS로 3회 세척하여 O.D₅₄₀ 0.6이 되도록 농도를 조정하였다. 파장 540nm에서 흡광도 값이 0.6일 때 약 1×10^7 cfu ml⁻¹이 되므로 이렇게 준비한 시험균액을 불활화한 정상 혈청과 1:1로 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 실험구에는 complement source로서 신선 혈청을 1:4가 되도록 첨가하고 대조구에는 PBS를 첨가하여 실온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 상징액을 PBS로 단계 희석하여 1.5% 첨가 BHIA 평판 배지에 10 μ l씩 spotting한 후 28℃에서 48시간 동안 배양하였다. 시험균의 반응 결과는 Miles & Misra (1938)에 따라 배양 후 생성된 colony의 수를 계산하였고 생존율은 대조구의 생존율과 비교하여 나타내었다.

6-3. 넙치 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화 시험

시간별 *Strep. iniae* 균주의 혈청에서의 생존능 시험에서는 KCTC 3657, KS1, KS2, KS3, KS4, KS5 균주를 이용하였으며, 시험균과 혈청 혼합액을 0, 1, 3, 6, 12시간 경과할 때마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)에 따라 배양 후 생성된 colony의 수를 계수하였다.

7. 시험 균주의 식균율과 식균 지수의 측정

식균능의 실험에는 넙치의 whole blood를 사용하였으며 넙치의 미부 정맥으

로부터 heparin (Sigma)이 처리된 주사기로 어체당 0.5ml씩 채혈하였다. 채혈한 혈액은 siliconized tube에 넣고, 100mg ml⁻¹로 준비된 각 균액 30μl를 첨가하였다. 20℃로 유지된 shaking incubator에서 3시간 동안 반응시킨 후 시료를 채취하여 slide glass에 도말한 다음 May-Grunwald Giemsa 염색법으로 염색하고 검경하였다. 식세포에 대한 식균율과 식균지수를 아래 식을 이용하여 구하였다.

$$\text{식균율(\%)} = [\text{식균 작용을 한 식세포의 수} / \text{관찰한 식세포의 수}] \times 100$$

$$\text{식균지수} = \text{식균한 식세포의 총 식균수} / \text{식균 작용을 한 식세포의 수}$$

8. 넙치 두신 macrophages에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정

8-1. 넙치 두신 macrophages의 분리

넙치의 두신 macrophages는 Secombes (1990)의 방법에 따라 분리하였다. 넙치의 미부 정맥에서 채혈하여 순환 혈액을 가능한 한 모두 제거한 후, 무균적으로 해부하여 두신을 절취하였다. 이를 2% FBS, 1% penicillin/streptomycin 및 0.2% heparin이 함유된 L-15 medium (Sigma)을 2ml씩 소형 disposable petri dish에 분주한 뒤 40μm의 nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 siliconized tube에 미리 분주해둔 34%와 51% percoll 용액 위에 조심스럽게 중층시킨 다음 500g, 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구를 0.1% L-15 medium으로 2회 세척한 다음 0.1% trypan blue로 viability를 관찰한 후, 1×10⁵ cell ml⁻¹로 조정하였다.

8-2. 시험균의 준비 및 시험균의 감작

시험균의 준비는 1.5% NaCl 첨가 BHIB 5ml에 25℃, 24시간 배양한 균을 원심 분리하여 PBS에 3회 세척한 다음 생균 시험균으로 사용하였다. 세균의 감작은 생균 시험균의 습중량 0.01g에 넙치 혈청 500μl을 첨가하여 25℃, 30분간 진탕 배양 후에 원심 분리한 다음 PBS로 1회 세척하여 감작 생균 시험균으로 사

용하였다.

8-3. Chemiluminescence (CL) response

1×10^5 cell ml^{-1} 로 조정된 macrophage를 96 well plate에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 후 실험에 사용하였으며, luminol은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 준비하였다. $100 \mu\text{l}$ 의 세포액에 $100 \mu\text{l}$ 의 luminol working solution을 넣은 후 10분간 반응시킨 다음 준비한 생균 시험균과 감작 생균 시험균을 각각 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였고, 대조구에는 HBSS를 $50 \mu\text{l}$ 첨가하여 lumicount로 측정하였다. 측정 시간은 50분간이었으며 각 시료에 대한 peak 값을 구하였다.

9. 넙치 두신 macrophages의 bactericidal activity에 대한 저항성 시험

96 well plate에 부착된 macrophage monolayer에 생균 시험균을 1×10^5 cell well^{-1} 로 접종한 다음 plate를 150g, 5분간 원심 분리하여 25°C 에서 0시간과 5시간을 배양하였다. 배양 후 상정액을 제거하고, 차가운 0.2% tween 20을 함유한 멸균 증류수 $50 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 macrophage를 파괴시켰다. 여기에 BHIB $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 25°C , 18시간 시험균을 증식시킨 후 5mg ml^{-1} 농도로 준비된 MTT 염색액 $10 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 가볍게 흔들어 주었으며, 15분 후 micro plate reader를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였고, 생존능은 0시간에 대하여 5시간을 나누어서 백분율로 표시하였다.

10. Macrophage 및 어류 주화 세포에 대한 각 균주의 invasion activity 시험

각각의 균주가 어류 주화 세포에 침입할 수 있는지 여부를 확인하기 위한 실험은 Tang et al. (1993)의 방법을 따랐다. 48 well plate에 CHSE-214를 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic이 첨가된 EMEM을 사용하여 20°C , 24시간 단층 배양하였다. Macrophage는 0.1% FBS와 1% antibiotic-antimycotic이 첨가된

L-15 배지를 사용하여 2시간 동안 부착시킨 다음 세척을 통해 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 실험 시작하기 2시간 전에 배지를 제거한 후 항생제가 첨가되지 않은 새로운 배지로 교체하였다. 각 균주는 1.5% NaCl이 첨가된 BHIB에서 25℃, 24시간 배양한 후 PBS로 3회 세척한 다음 EMEM 배지와 L-15 배지에 각각 현탁하여 파장 540nm에서 흡광도 값이 0.6이 되도록 농도를 조정하였다. 각 균액은 단층 배양된 세포에 1ml씩 첨가한 후 25℃, 1시간 배양한 다음 배지를 제거하였다. 세포 바깥에 존재하는 세균을 없애기 위하여 $100\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicin을 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 2회 세척하고 0, 1, 3시간별로 반응시킨 다음 1% Triton X-100을 첨가하여 5분간 세포를 파괴시켰다. 상정액은 단계 희석한 다음 BHIA 배지에 drop하여 생성된 colony 수를 계산하여 아래와 같은 식으로 나타내었고 시간별 세포 내에서의 살균 반응 및 증식 반응도 조사하였다.

$$\text{Invasion (\%)} = \{(\text{Bacteria surviving gentamicin treatment}) / (\text{Bacteria added to cell monolayer})\} \times 100$$

11. 병원성 시험

병원성 시험에는 평균 체장 11 ~ 12.5 cm, 체중 9 ~ 11g과 체장 5 ~ 7 cm, 체중 3 ~ 5g의 건강한 넙치, *P. olivaceus*를 포함 인근의 양식장에서 분양 받아 실험실의 300 L 사육 수조에서 10일간 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. colony의 형태와 capsule 유무를 기준으로 하여 7개의 시험 균주와 3개의 참조 균주에 대한 병원성의 유무와 그 정도를 조사하기 위하여 연속 3회에 걸쳐 어체 통과시킨 각각의 균주들을 사용하여 넙치에 대한 공격 실험을 행하였다.

공격에 사용한 균액은 1.5% NaCl 첨가 BHIA에 24시간 배양한 후 각각의 균주를 멸균 생리 식염수에 현탁하여 파장 540nm에서 흡광도가 0.6 일 때의 균수가 약 1×10^7 CFU ml^{-1} 인 것을 감안하여 1×10^5 CFU ml^{-1} 이 되도록 조정한 후

넙치 한 마리당 0.1ml씩 복강 주사하였다. 수온은 $22\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지시켰으며 2주 동안의 누적 폐사율을 기록하였다. 각각의 군주별로 10마리씩 사용하였으며 누적 폐사율로써 병원성을 평가하였다. 대조구의 경우는 동일 조건하에서 멸균 생리 식염수를 0.1ml씩 복강 주사하였다.

실험 기간 중 먹이는 공급하지 않았으며 3일마다 50% 정도의 사육수를 환수시켰다. 폐사한 어류는 내부 장기에서 원인균의 분리를 시도하였으며 배양된 균에 대해서는 항혈청을 이용한 슬라이드 응집 반응과 PCR법을 통하여 원인균을 확인하였다. 또한, 시험어와 폐사어에 대해서는 외부 및 내부 증상을 관찰하였다.

12. 통계학적 분석

각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 P값을 측정하였고, $P<0.01$ 와 $P<0.05$ 수준에서 유의성을 평가하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세균의 형태학적 특성

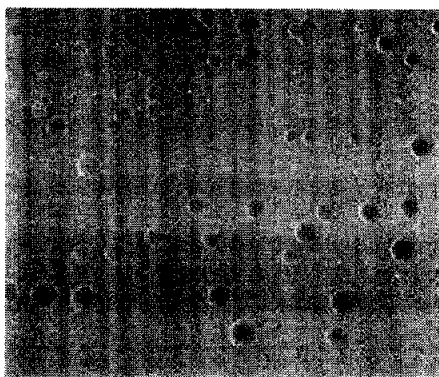
병어에서 분리된 모든 균주는 1.5% NaCl이 첨가된 TSA, BHIA 배지상에서 colony의 크기는 1~3 mm이었고, Gram 염색에서는 양성으로 chain을 구성한 연쇄 구균이 관찰되었다. colony의 형태는 Fig. 1과 같이 non-viscous form과 viscous form으로 구분되었고, 분포 정도는 KS1, KS2 및 KS3 균주가 viscous form이었으며, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주가 non-viscous form 인 것으로 확인되었다. 이들은 colony type에 따라 Gram 염색 상에서 chain당 cell의 수에 차이를 보였으며, 그 정도는 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Morphological characteristics of colony

Strains	Morphology of colony	Cells ¹ per chain
ATCC 49156	N.V ²	2.63
KCTC 3651	N.V	2.42
KCTC 3657	N.V	2.53
KS1	V ³	4.21
KS2	V	3.98
KS3	V	4.06
KS4	N.V	2.52
KS5	N.V	2.34
KS6	N.V	2.68
KS7	N.V	2.49

¹, The mean number of bacterial cells which composed each bacterial chain was determined by microscopic observation of smear preparation from the bacterial suspension on the slide glasses; ², Non-viscous ³, Viscous.

a)



b)

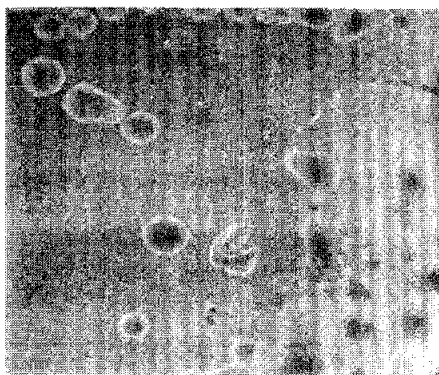


Fig. 1. Photograph of the non-viscous form and the viscous form. a) non-viscous; b) viscous.

2. 세균의 생화학적 특성

시험 균주와 참조 균주에 대한 배양 조건별 발육 시험과 생화학적 특성을 비교한 결과, 염분 농도별 발육 시험에서 viscous form인 KS1, KS2, KS3의 경우 5%와 6% NaCl 첨가 배지에서 증식을 하였으나, non-viscous form인 KS4, KS5, KS6, KS7의 경우 5% NaCl 첨가 배지에서 증식이 잘 되지 않았고 6% NaCl 첨가 배지에서는 증식이 완전히 억제되었다. 각 균주간의 생화학적 성상은 유사하였으나, arginine dihydrolase (AD) 이용능과 starch hydrolysis에서 차이를 나타내었다. 즉, KCTC 3657, KS1, KS2, KS3, KS4 균주는 AD 이용능과 starch hydrolysis가 positive이었으나 KS5, KS6, KS7 균주는 AD 이용능과 starch hydrolysis가 negative인 것으로 확인되었다.

3. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰

TEM으로 시험 균주의 capsule 유무를 확인한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 세균 세포의 형태는 구형으로 관찰되었다. 항혈청으로 안정화시키고 polycationic ferritin과 반응시킨 세균 세포의 초박 절편을 검경한 결과 시험 균주 중 viscous form인 KS1, KS2 및 KS3에서 세균 세포의 표면에 뚜렷한 capsule층이 관찰되었다. 그러나 non-viscous form인 KS4, KS5, KS6, KS7와 참조 균주인 KCTC 3657 및 negative control로서 사용한 ATCC 49156, *Lact. garvieae*의 세균 세포 표면에는 별다른 구조물이 관찰되지 않았다.

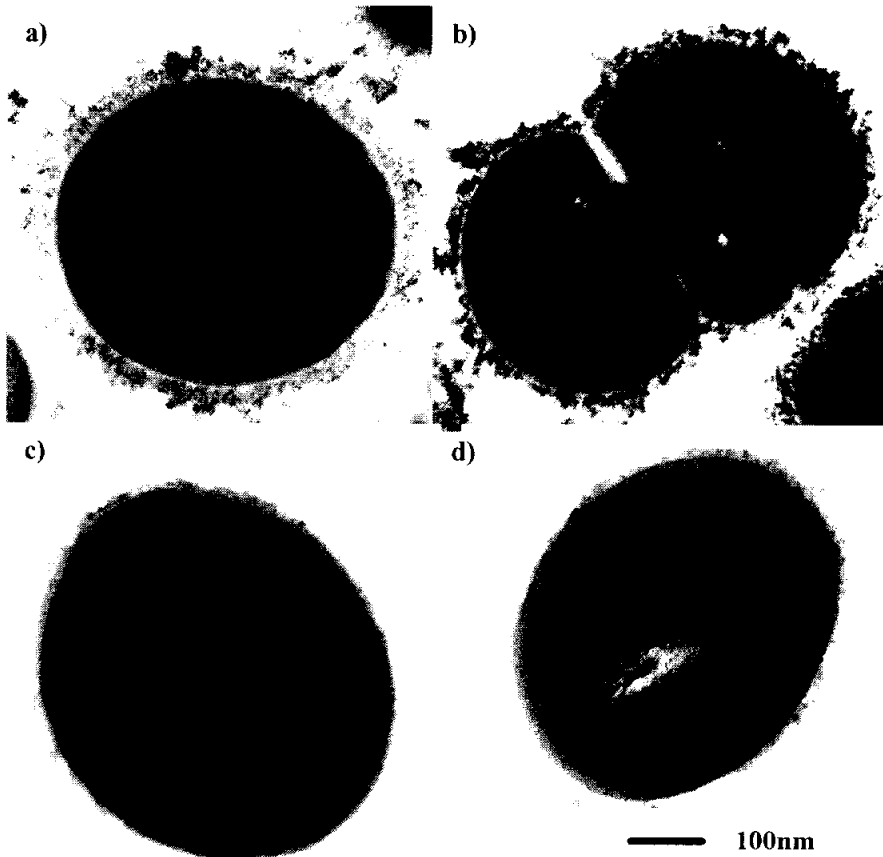


Fig. 2. Transmission electron micrograph of a) ferritin-labelled *Streptococcus iniae* Strain KS1 b) KS2 c) KS5 and of d) *Lactococcus garvieae* (capsule-negative control). Magnification $\times 50,000$.

4. 시험균의 extracellular products (ECPs)의 효소 활성 시험

API ZYM kit으로 효소 활성을 시험한 결과를 Table 4에 나타내었다. 모든 시험 *Strep. iniae* 균주의 ECPs의 효소 활성 시험에서는 모든 균주의 ECPs가 alkaline phosphatase와 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 양성 반응을 나타내었으며, KS1, KS2 및 KS3는 leucin arylamidase에 대해 강한 양성 반응을 보인 반면 KS4, KS5, KS6, KS7은 약한 양성 반응을 보이거나 음성 반응을 나타내었다.

5. 시험균 ECPs의 어류 주화 세포에 대한 세포 독성 시험

시험균 ECPs의 어류 주화 세포에 대한 세포 독성 시험 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 시험한 모든 *Strep. iniae* 균주와 참조 균주의 ECPs의 원액 및 10배 희석액은 CHSE-214에 대한 세포 독성 효과를 나타내었다.

Table 4. Enzymatic activities of ECP

Characteristics	<i>Streptococcus iniae</i>							ET ^a	EC ^b
	KCTC 3657	KS1	KS2	KS3	KS4	KS5	KS6		
alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
esterase	-	-	-	-	-	-	-	+ ^w	-
esterase lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
leucine arylamidase	+ ^w	++	++	++	-	-	+ ^w	+	+
valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cycline arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acid-phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	+	+
naphthol AS-BI phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+ ^w	+
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl- β glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	+ ^w	-
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a, *Edwardsiella tarda*, FSW 910410; ^b, *Escherichia coli*, ATCC 25922.

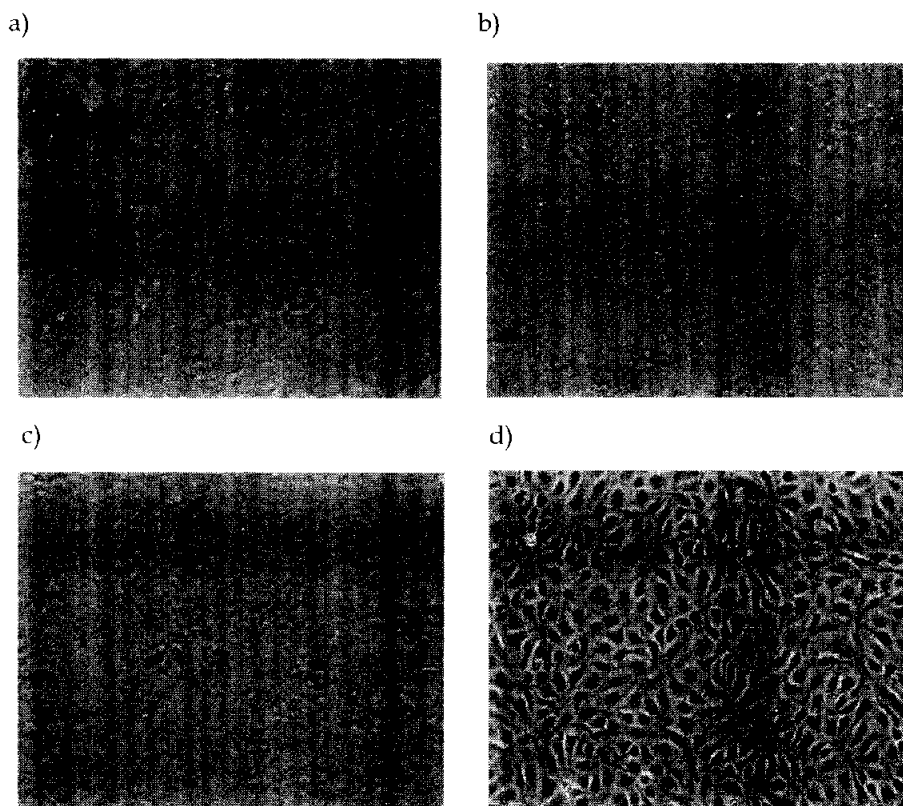


Fig. 3. Cytotoxic activity of a) *Streptococcus iniae* KS1 b) *Streptococcus iniae* KS6 , c) *Lactococcus garvieae* ATCC 49156 and d) control with 0.1M PBS on CHSE-214.

6. Chemiluminescence (CL) response에 대한 ECPs의 영향

넙치 두신 macrophage의 CL response에 대한 ECPs의 영향을 알아보기 위하여 각 군주의 ECPs를 농도별로 첨가하여 확인한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 시험한 모든 군주에서 ECPs의 농도가 높을수록 macrophage의 CL response에 영향을 많이 받았으며, $1.95\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 농도에서도 군주에 상관없이 크게 영향을 받는 것으로 확인되었다. 각 군주간의 ECP 농도에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

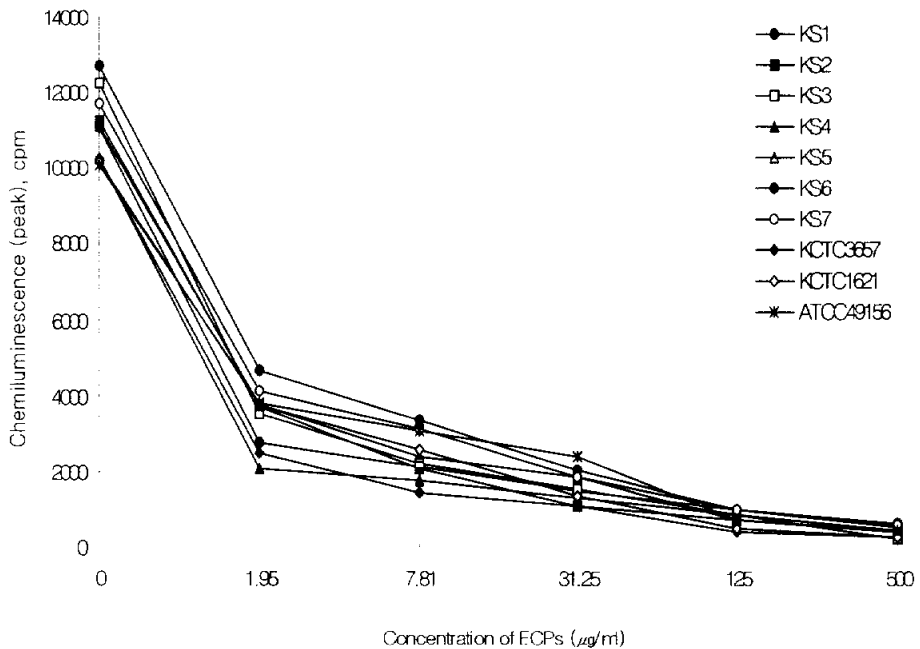


Fig. 4. Effect of ECPs concentration on chemiluminescence response of head kidney macrophage of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

7. 시험균의 넘치 혈청에 대한 저항성

7-1. 혈청에서의 생존능 시험

넘치 혈청에 대한 *Strep. iniae*의 균주별 저항성 시험의 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 넘치 불활화 혈청과 반응시킨 후 complement source로 넘치 신선 혈청을 첨가하여 각 균주의 생존능을 확인한 결과 KS1, KS2 및 KS3 균주의 경우 신선 혈청 대신 PBS를 첨가한 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. KS1, KS2 및 KS3은 혈청에 의해 살균되지 않고 오히려 증가하는 것을 확인할 수 있었던 반면, KCTC 3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주는 대조구와 비교하여 생존율이 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다.

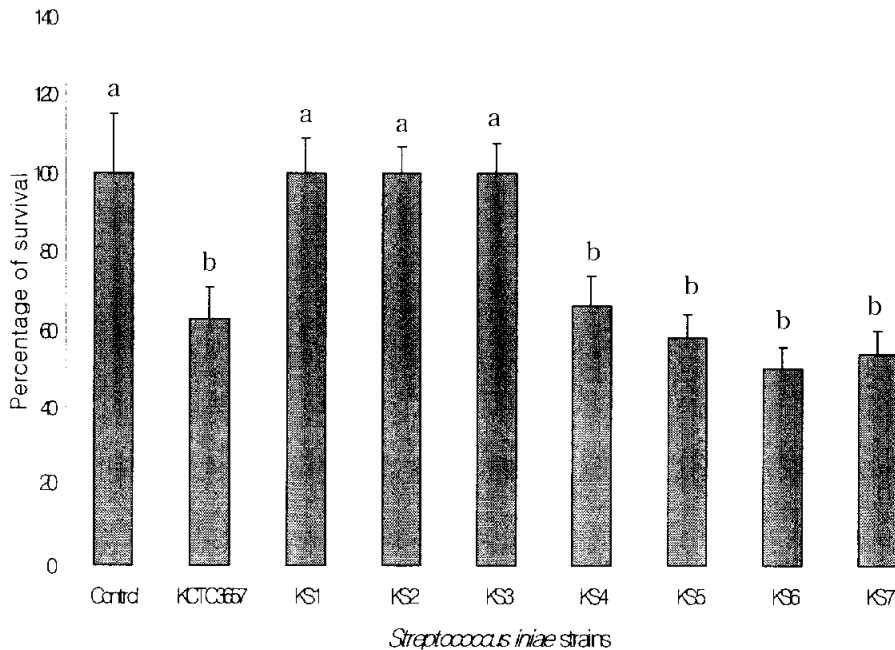


Fig. 5. Bactericidal activity of normal serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. a and b; significantly different ($P<0.01$).

7-2. 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화

혈청 내에 *Strep. iniae* 균주의 시간별 균 수 변화를 Fig. 6에 나타내었다. *Strep. iniae* 균주의 넙치 혈청에서의 시간별 균 수 변화를 측정한 결과 KS1, KS2 및 KS3은 넙치 신선 혈청에서 3시간 이후로 급격히 균 수가 증가하였다. 그에 비하여 KCTC 3657과 KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주는 넙치 정상 혈청에서 1시간 반응에서부터 균수가 감소하기 시작하여 12시간째까지 지속적으로 감소하였다. KS1, KS2 및 KS3 균주 사이의 유의적인 차이는 없었으며 KCTC3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주 간의 유의적인 차이도 확인할 수 없었으나, 균 수가 증가하는 그룹과 감소하는 그룹 사이에는 유의적인 차이가 있었다.

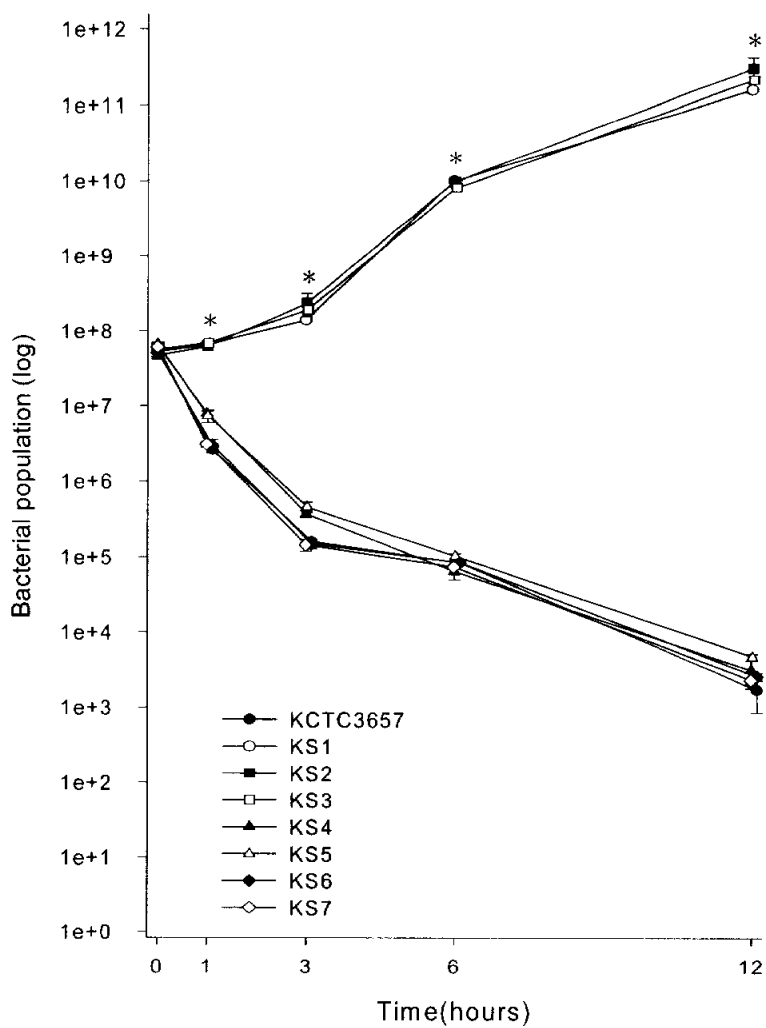


Fig. 6. Survival of various *Streptococcus iniae* strains in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

*significant difference between reference and other strains; $P < 0.01$.

8. Whole blood에서의 균주별 식균율과 식균 지수의 측정

8-1. Whole blood에서의 균주별 식균율

넙치 whole blood에서의 *Strep. iniae* 균주별 식균율을 조사한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. KCTC 3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주는 KS1, KS2 및 KS3 균주에 비해 유의적으로 높은 식균율을 나타내었다. 그러나, KS1, KS2 및 KS3 균주 간이나 KCTC 3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주 간 식균율에는 유의적인 차이를 확인할 수 없었다.

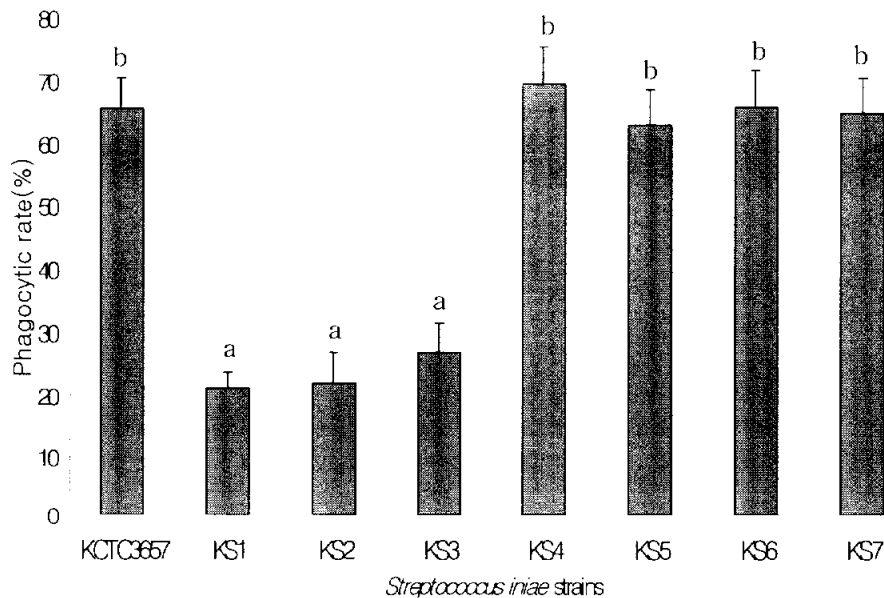


Fig. 7. The phagocytic rate of leukocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to *Streptococcus iniae* strains for 3hr incubation. a and b; significantly different ($P < 0.01$).

8-2. Whloae blood에서의 균주별 식균 지수

넙치 whloae blood에서의 *Strep. iniae* 균주별 식균 지수를 조사한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. KS1, KS2 및 KS3 균주의 경우 다른 균주들에 비해 식균 지수가 유의적으로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 식균율의 결과와도 일치하며, 이들 균주들은 넙치 macrophages와 거의 반응하지 않는 것으로 나타났다.

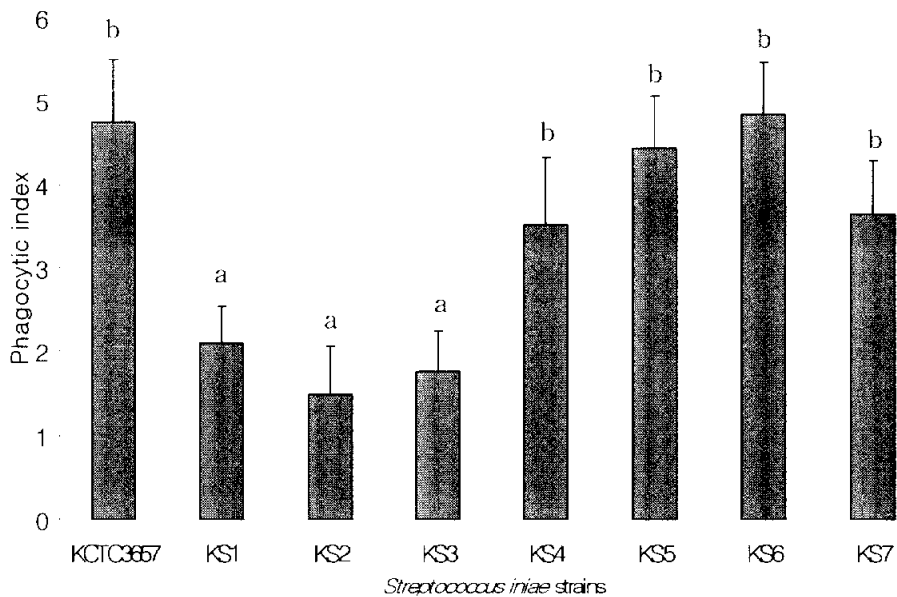


Fig. 8. The phagocytic index of leukocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to *Streptococcus iniae* strains for 3hr incubation. a and b; significantly different ($P < 0.05$).

9. 넙치 두신 macrophages의 균주별 CL response

각 균주에 대한 넙치 두신 macrophage의 CL response의 변화를 Fig. 9에 나타내었다. 신선 혈청으로 감작하지 않았을 경우에는 zymosan을 사용한 대조구에 비해 모든 균주에서 유의적으로 활성이 낮은 것으로 나타났지만, 균주간의 유의적인 차이는 없었다. 신선 혈청으로 감작한 경우에는 capsule을 가지는 KS1, KS2 및 KS3의 균주는 capsule을 가지지 않은 KCTC 3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주에 비해서 macrophage 활성이 낮은 것으로 확인되었다. 따라서, capsule을 가지는 KS1, KS2 및 KS3의 균주는 감작 유무와 무관하게 macrophage에 식작용되지 않는 것으로 나타났다.

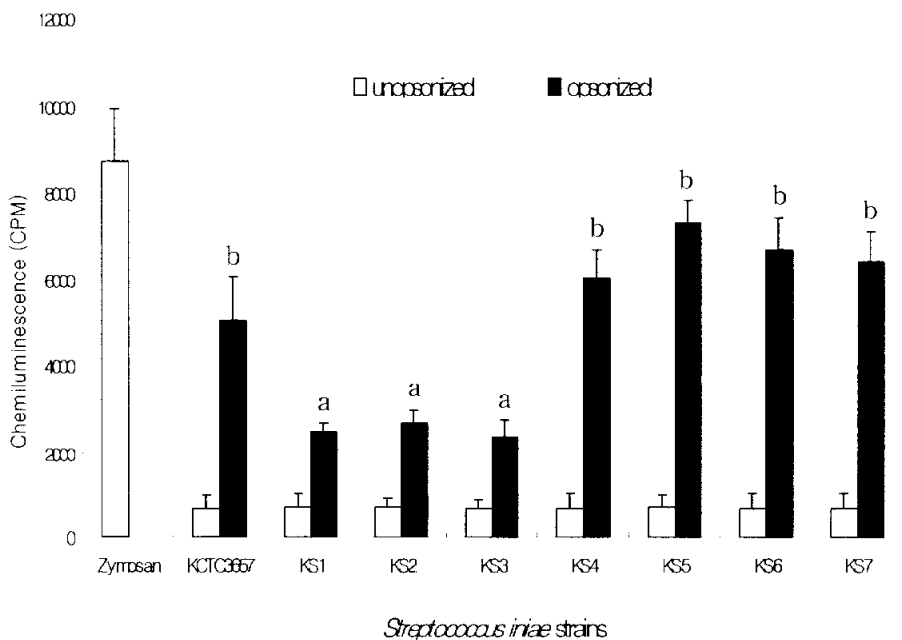


Fig. 9. Peak chemiluminescence of head kidney macrophages of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to opsonized or nonopsonized *Streptococcus iniae* strains for 30 min incubation.

a and b; significantly different ($P<0.01$).

10. 넙치 두신 macrophages에서의 균주별 생존능 측정

Strep. iniae 균주가 넙치 두신 macrophages에서 생존할 수 있는지 여부를 확인하고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 모든 균주에서 5시간 동안 반응시킨 후의 균 수가 0시간에 비하여 유의적으로 감소되어 macrophage에 의해 살균된 것을 확인할 수 있었다. 각 균주 간에도 KS1, KS2 및 KS3 균주의 생존율이 KCTC 3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주의 생존율보다 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다.

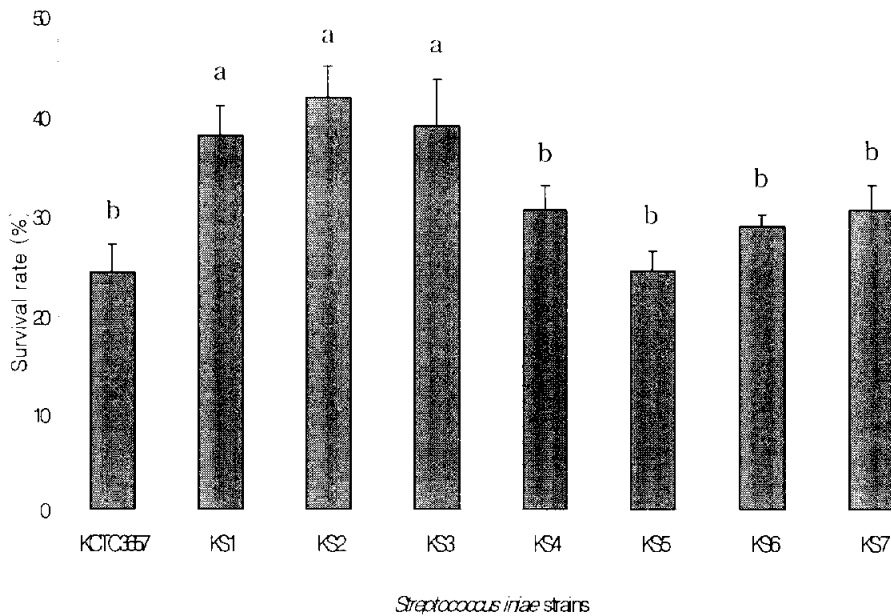


Fig. 10. Survival rate of various *Streptococcus iniae* strains incubated with head kidney macrophages for 5hr incubation of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

a and b; significantly different ($P < 0.01$).

11. Macrophage 및 어류 주화 세포에 대한 각 균주의 invasion activity 시험

11-1. Macrophage에 대한 각 균주의 invasion activity

Macrophage에 대한 *Strep. iniae* 균주의 invasion activity를 측정한 결과와 macrophage내에서 시간에 따른 균 수의 변화를 각각 Fig. 11와 Fig. 12에 나타내었다. *Strep. iniae* KS1, KS2 및 KS3 균주는 KCTC 3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 그리고 *E. tarda*, FSW 910410 및 *Staph. aureus* subsp. *aureus*, KCTC 1621에 비해 macrophage 내로 invasion을 거의 하지 않는 것으로 나타났다. 이것은 식작용 결과와도 일치하며 macrophage의 식작용을 회피하는 것으로 여겨진다. macrophage 내로 invasion한 후의 균은 *E. tarda*, FSW 910410을 제외하고는 macrophage 내에서 균 수가 지속적으로 감소하였다. 참조 균주인 *E. tarda*는 macrophage 내로의 invasion율이 높으며 macrophage 내에서 증식하는 것을 확인할 수 있었다.

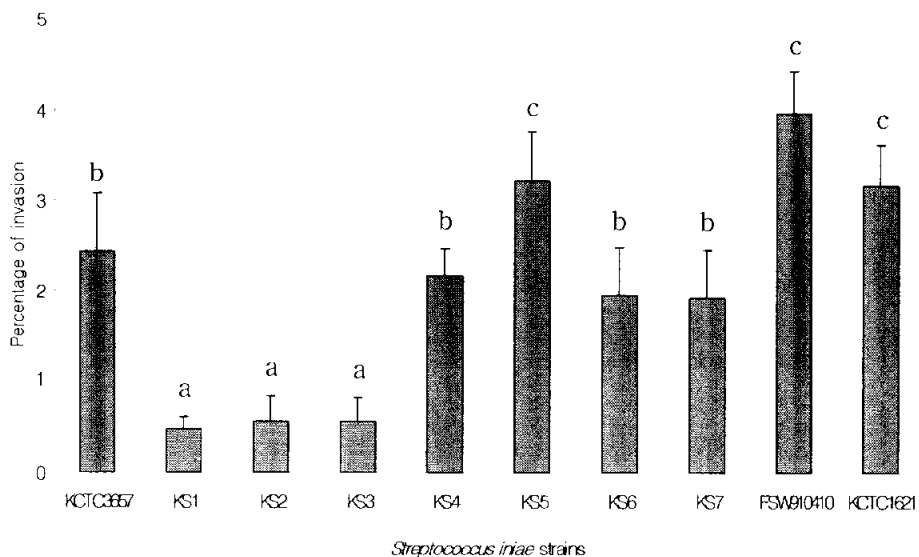


Fig. 11. The invasion rate of *Streptococcus iniae* strains to head kidney macrophages of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* for 1hr incubation in vitro. a, b and c; significantly different ($P<0.01$).

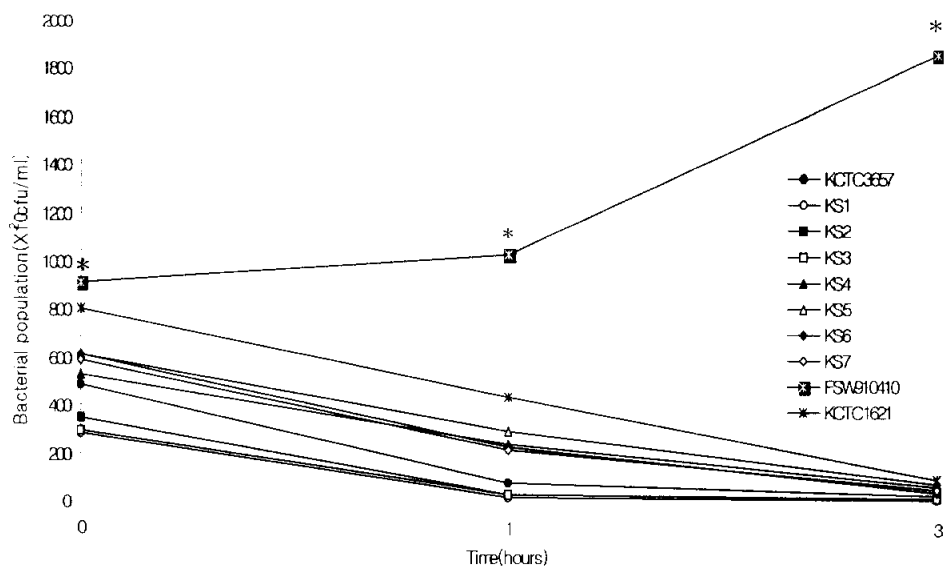


Fig. 12. Survival rate of various *Streptococcus iniae* strains in head kidney macrophage of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, for 3hr incubation in vitro.

*significant difference between *Edwardsiella tarda* and other strains; $P < 0.01$.

11-2. CHSE-214 cell line에 대한 각 균주의 invasion activity

CHSE-214 cell line에 대한 *Strep. iniae* 균주의 invasion activity를 측정한 결과와 CHSE-214 cell line 내에서의 시간에 따른 균 수의 변화를 각각 Fig. 13과 Fig. 14에 나타내었다. 모든 균주가 CHSE-214 cell line 내로 어느 정도 invasion 할 수 있었으나, 각 균주간의 유의적인 차이는 없었다. 모든 균주는 CHSE-214 cell line 내에서 3시간까지는 지속적으로 증식하다가 이후로는 더 이상 증식이 이루어지지 않았다.

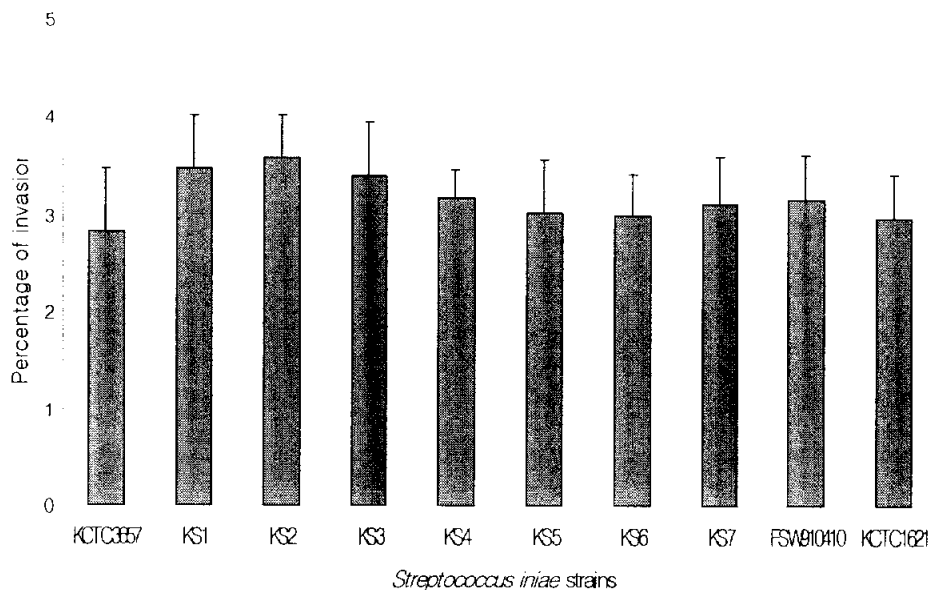


Fig. 13. The invasion rate of CHSE-214 cell line incubated with *Streptococcus iniae* strains for 1hr.

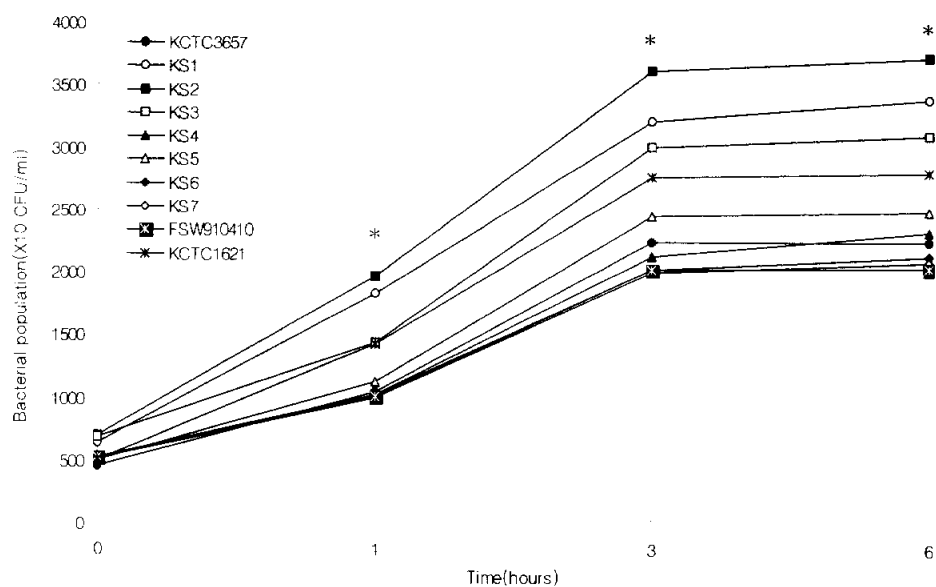


Fig. 14. Survival rate of various *Streptococcus iniae* strains in CHSE-214 cell line.

*significant difference between viscous and non-viscous strains ; $P < 0.01$.

12. 병원성 시험

Fig. 15에는 *Strep. iniae*의 분리 균주와 참조 균주 및 *Lact. garvieae*와 *Strep. parauberis*의 참조 균주로 넙치에 대한 병원성을 시험한 결과를 나타내었다. 공격 균액의 평균 농도는 1×10^5 CFU fish⁻¹이었고, colony의 형태가 viscous form이고 전자 현미경상에서 capsule이 확인되었던 KS1, KS2, KS3의 균주의 경우 주사 후 2일째부터 폐사하기 시작하여, 10일째에 모두 폐사하였다. 그에 비해 colony의 형태가 non-viscous form이고 capsule이 확인되지 않은 KS4, KS5, KS6 및 KS7과 3개의 참조 균주는 10~40%로 상대적으로 낮은 폐사율을 나타내었다. 폐사어와 생존 개체의 공통적인 병변으로서는 안구의 백탁과 간울혈이 나타났고 간헐적으로 복부 팽만의 증상이 보였다. 그러나 대조구에서는 폐사를 일으키지 않았으며 어떤 병적인 증상도 나타나지 않았다. 시험 균주를 사용한 시험구와 참조 균주 시험구의 폐사어 및 생존 개체 모두에서 원인균이 분리되었다.

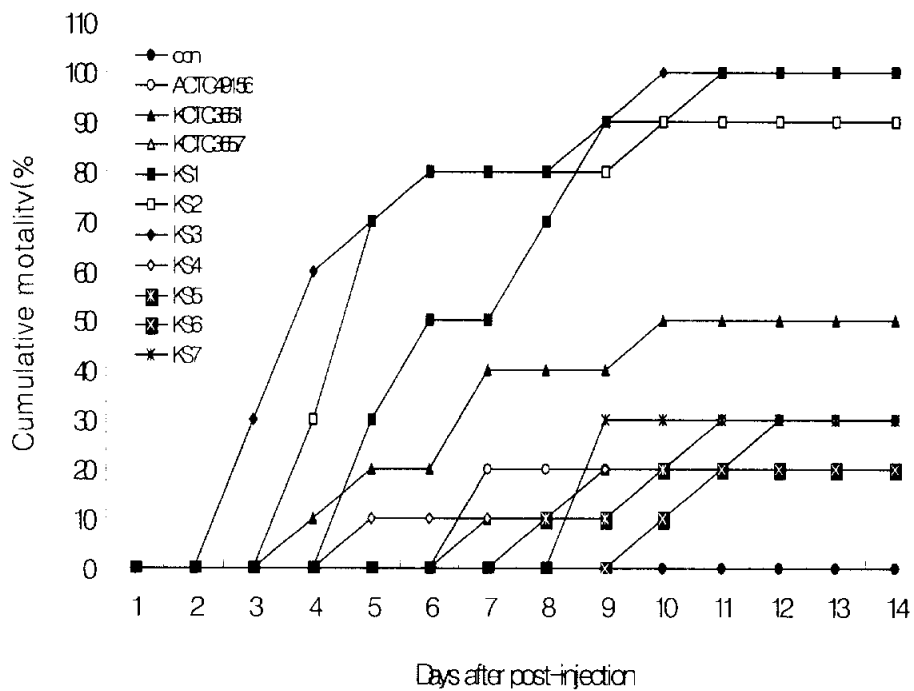


Fig. 15. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, after intraperitoneal injection with the tested strains, *Streptococcus iniae*, and reference strains, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* and *Lactococcus garvieae*. The tested groups were challenged with 0.1 ml of bacteria suspension for $1 \times 10^5 \text{ CFU ml}^{-1}$ and the control group was injected 0.1 ml saline fish⁻¹.

IV. 고 찰

우리 나라의 대표적인 해수 양식 어종인 넙치에서 심각한 피해를 입히는 연쇄 구균병의 원인체는 대부분이 *Streptococcus iniae*인 것으로 확인되었다 (우, 2002). *S. iniae*는 일본, 미국, 이스라엘 등지의 많은 나라에서 피해가 보고되고 있으나 다른 많은 어류 병원체들과 달리 혈청학적 특성이나 병원성 관련 요인들에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 최근에 이스라엘의 무지개송어에서 분리된 *S. iniae*의 혈청학적 특성을 arginine dihydrolase (AD) 이용능에 따라 구분하여 AD 양성 of Serotype I 과 AD 음성 of Serotype II로 분류하였고, RAPD analysis를 통해서도 그 pattern상의 차이가 확연히 구분되었지만 (Bachrach et al., 2001; Barnes et al., 2003a,b), 본 연구에서는 넙치에서 분리된 *Strep. iniae*의 AD 이용능에 따른 혈청형의 구분과 병원성 차이를 확인할 수 없었다. 이것은 분리 지역과 어종에 따라 혈청형이 달라질 수 있음을 시사하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 넙치에서 분리된 *Strep. iniae*의 형태학적 특성에 따른 혈청학적 차이를 평가하고 그에 따른 병원성의 차이와 다른 세균에서 일반적으로 알려진 여러 가지 병원성 요인을 함께 평가하여 *Strep. iniae* 병원성과 관련되는 기초적인 자료를 확립하고자 하였다.

본 연구에서 분리된 *Strep. iniae* 균주들 중 점성을 나타내는 colony type의 균주가 분리되었다. 이들은 분리 보고된 연쇄구균의 colony 형태와 많은 차이를 보였으며, 이들 균주들은 chain 당 cell의 수가 non-viscous form의 균주들과 비교하여 더 많은 것으로 나타났다. 또한, 이러한 균주들을 ferritin과 반응시킨 후 전자 현미경으로 관찰하였을 때, 세균 세포 주위로 두꺼운 층의 capsule이 형성되는 것을 확인할 수 있었는데, 무지개송어에서 분리된 점액성의 viscous form 이고 capsule을 가지고 있는 β -hemolytic *Streptococcus* spp. (Yoshida et al., 1996b)와 유사하였다. 다른 점이 있다면 무지개송어에서 분리된 균주는 5회 이

상의 계대 배양을 통해 colony의 형태가 점성이 없는 작고 흰 colony로 변화하였으나, 본 연구에서 분리된 균주는 10회 이상의 계대 배양에도 동일한 viscous form으로 유지되었다. 이는 사용한 배지에 첨가되는 NaCl과 관련이 있을 것으로 보이며 본 연구에서 분리한 균주의 경우에도 1.5%의 NaCl이 첨가된 배지에서 계속 계대 배양하였을 때는 그 특성이 변화하지 않았지만, NaCl이 첨가되지 않은 일반 배지에서 수회 계대 배양을 할 경우 colony의 형태가 점성이 없는 작고 흰 colony로 변화하는 것을 확인할 수 있었으므로 염분 농도에 따른 배양 특성인 것으로 사료되었다.

TEM을 통하여 cell wall 표면의 capsule 유무를 관찰한 결과 viscous form에서는 capsule이 확인되었으나 참조 균주와 non-viscous form에서는 capsule을 확인할 수 없었다. 이러한 세균의 cell wall 표면의 capsule은 일반적으로 polysaccharide로 구성되어 있으며 드물게 amino acid polymers로 구성되어 있는 것도 있다. Barhrach et al. (2001)는 *Strep. iniae*에서 추출한 carbohydrate antigen extracts를 항혈청과 반응시켰을 때 면역 침강 반응의 pattern 변화를 확인하여 polysaccharide capsule이 존재할 가능성이 있음을 보고하였다. 또한, polycationic ferritin에 의해 extracellular fibrous layer가 강하게 염색된 것을 통해 acidic polysaccharide가 존재한다는 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 세포 표면의 anionic site와 ferritin의 정전기적인 결합에 의한 것이다 (Wai et al., 1998; Johnson et al, 1992; Danon et al., 1972).

API ZYM test를 사용하여 효소 활성을 시험한 모든 *Strep. iniae* 균주의 ECPs는 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase 효소 활성을 나타내었으며, KS1, KS2 및 KS3는 leucine arylamidase에 대하여 강한 양성 반응을 보인 반면 KS4, KS5, KS6, KS7은 약한 양성 반응을 나타내거나 음성 반응을 나타내었다. 이들 효소의 활성 차이가 병원성과 연관이 있을 것으로 여겨진다. 또한, ECPs를 이용하여 어류 주화 세포인 CHSE-214에 대한 cytotoxicity를 시험한 결과 모든 *Strep.*

*iniae*의 ECPs는 CHSE-214에서 cytotoxic effect를 나타내었고, 효소 활성을 억제시키는 FBS를 첨가하였을 경우 세포가 ECPs에 영향을 받지 않아 ECPs 성분에 의해 cytotoxic effect가 나타났음을 확인할 수 있었다. 그리고 ECPs가 비특이적 면역 반응의 주요 세포인 macrophage의 활성화에 영향을 미치는지 여부를 확인한 결과 균주에 상관없이 macrophage의 CL response에 대해 $1.95\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 농도에서도 활성이 억제되었고, ECPs의 농도가 높아질수록 macrophage의 활성이 더욱 억제되었다. 숙주 세포에 손상을 입히는 것은 pathogenesis의 초기 단계로 여겨지며 많은 streptococcal pathogens에서 확인되었다 (Charland et al., 2000; Gibson et al., 1999; Nizet et al., 1997). 실제로 포유류의 streptococcal pathogen으로 잘 알려진 *Streptococcus pyogenes*의 ECPs에는 streptolysin S, streptolysin O, hyaluronidase, streptokinase 및 protease 등이 포함되어 있으며 이들은 invasion factors와 protein toxins으로 작용하여 적혈구, polymorphonuclear leukocytes 및 tissue-culture cells 등과 같은 숙주 세포와 조직을 손상시켜 괴사를 일으키고 systemic toxicity를 가지며 toxic shock syndroms을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Bisno et al., 2003; Carr et al., 2000; Basma et al., 1999). 또한, 혈관 내피 세포 등에 손상을 입히게 되면 세균이 혈류를 통해 이동하여 전신 감염을 유발시킬 가능성이 높으며, 실제로 *Strep. iniae*는 세포의 손상과 blood-brain barrier의 손상으로 인한 meningoencephalitis을 유발하는 병원체로 알려져 있다 (Fuller et al., 2001). 본 연구의 결과 사용된 각 균주로부터 분리된 ECPs는 균주에 따라 차이는 없으나, 모두 어류 주화 세포에 cytotoxicity를 나타내었고 macrophage의 CL response도 억제하는 역할을 하므로 *Strep. iniae*의 병원성과 관련이 있을 것으로 사료된다.

넙치 혈청 내의 살균 작용에 대한 *Strep. iniae* 균주별 저항성을 시험한 결과 시험 균주 중 capsule을 가진 균주는 모두 넙치 혈청 내에서 생존할 수 있을 뿐

만 아니라 오히려 증식할 수 있는 것으로 나타났다. 그러나, capsule을 가지지 않는 균주들은 넙치 혈청에서 시간이 지남에 따라 균 수가 감소하는 것으로 관찰되었다. 어류의 혈청에는 세균 세포벽의 구성 성분인 peptidoglycan을 파괴할 수 있는 lysozyme 및 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화되는 complement가 존재하여 침입한 세균을 용균시킬 수 있다. 또한 세균의 성장에 필요한 철의 양을 조절할 수 있는 transferrin이 존재하여 침입한 세균의 성장을 억제할 수 있고, 세균의 protease 활성을 억제하는 여러 가지 anti-proteases가 존재한다 (Ellis, 2001). 그러나 병원성 세균의 경우는 이러한 어류 숙주의 면역 반응을 회피하거나 억제할 수 있는 여러 가지 기작을 가지고 있다. 예를 들어, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Lact. garvieae*, *Strep. pyogenes*, *Strep. pneumoniae* 등은 polysaccharide capsule을 가지며, *Aeromonas salmonicida*는 A-layer를 가지고 있어서 어류 혈청 내에서 생존할 수 있다 (Daly et al., 1996; Magarinos et al., 1996; Barnes et al., 2002; Bisno et al., 2003). 본 연구에서는 capsule을 가지는 *Strep. iniae* 균주가 capsule을 가지지 않는 균주에 비해 serum killing에 저항성을 나타내는 것을 확인할 수 있었고 이를 통해 capsule이 *Strep. iniae* 균주의 병원성에 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

Macrophage는 광범위의 병원체를 비특이적으로 식작용하여 살해할 수 있고, 면역 반응의 초기에 accessory cell로서 작용함으로써 어류의 비특이적 면역 반응에서 중요한 역할을 담당하고 있다 (Secombes, 1990). 병원성 세균의 경우는 이러한 macrophage의 식작용을 억제하거나 회피할 수 있는 여러 가지 기작을 가지고 있다. 예를 들어, *Aero. salmonicida*, *Staph. aureus* 및 *Photo. damsela* subsp. *piscicida*의 경우, 식세포의 respiratory burst 활성을 통하여 생성된 reactive oxygen species를 무독화시킬 수 있는 superoxide dismutase와 catalase와 같은 효소를 가지고 있어 oxygen radicals의 살균능을 감소시킴으로써 macrophage의 식작용에 저항성을 나타내는데 중요한 작용을 하는 것으로 나타

났다 (Barnes et al., 1999; Barnes et al., 1996; Mandell, 1975). 또한, *Photo. damsela* subsp. *piscicida*의 polysaccharide capsule과 *Aero. salmonicida*의 A-layer 등은 macrophage의 식작용을 회피하는데 작용하는 것으로 확인되었다 (Daly et al., 1996; Magarinos et al., 1996). 이러한 anti-phagocytic surface components는 식세포 결합에 필요한 ligands에 접근하기 어렵고 serum opsonins과의 결합력을 감소시켜 식작용에 저항성을 나타내게 하는 것으로 보여진다 (Czuprynski, 1988). 본 연구에서 *Strep. iniae* 균주 중 capsule을 가지는 균주의 경우 신선 혈청으로 감작한 경우에도 macrophage에 의한 식작용을 회피하는 것으로 확인되었고, macrophage내로 세균이 internalization되는 비율도 capsule을 가지지 않는 균주보다 훨씬 낮은 것으로 확인되었다. 또한, macrophage 내에서 시간에 따른 균 수를 확인한 결과 식작용된 *Strep. iniae* 균주의 균 수는 점차적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 참조 균주로 사용한 *E. tarda*의 경우는 macrophage 내에서 균 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해서 볼 때, *Strep. iniae* 균주의 경우는 *E. tarda*에 비해 macrophage의 식작용을 억제할 수 있는 능력이 부족하고 이는 *Strep. iniae* 균주가 catalase 활성을 가지지 않는 것과 관련이 있을 것으로 사료된다. 따라서, 위와 같은 사실들은 *Strep. iniae* 균주가 macrophage의 식작용 및 CL response와 같은 면역 반응을 억제하는 것이 아니라 이를 회피하는 능력을 가지고 있으며 이것이 병원성을 나타내는 주요한 요인으로 작용할 수 있음을 시사하고 있다.

GAS (group A streptococci), GBS (group B streptococci), *Strep. pneumoniae* 및 *Strep. suis*와 같은 많은 streptococcal pathogen의 뚜렷한 특징 중의 하나는 host tissue에 부착하고 세포 내로 침입할 수 있다는 것이다 (Charland et al., 2000; Ring et al., 1998; Rubens et al., 1992). 세균의 숙주 세포에 대한 invasion이란 in vitro 상에서 non-phagocytic cells 내로 세포가 internalization 되는 것을 말한다. 이런 부착과 침입은 host clearance mechanism에 대한 저항

성을 나타내게 하거나 cell barriers를 손상시켜 전신 감염을 용이하게 한다. Gram-negative bacteria 중에서 *Photo. damsela* subsp. *piscicida*의 경우 EPC (epithelioma papulosum carpio) cell lines에 부착하고 침입을 할 수 있었으며, 최대 6~9시간까지 세포 내에 생존해 있는 것으로 확인되었고 (Lopez-Doriga et al., 2000), non-phagocytic cells내에서 생존하면서 macrophage respiratory burst에 의한 oxidative attack와 같은 숙주의 방어 기작이나 항생제의 영향을 피할 수 있을 것으로 보여진다 (Magarinos et al., 1996a; Yoshida et al., 1997b; Barnes et al., 1999). 본 연구에서, *Strep. iniae*의 시험 균주 모두 CHSE-214 cell line내로 invasion할 수 있었으며 세포 내에서 어느 정도 증식할 수 있는 것으로 확인되었다. 이것은 *Strep. iniae*가 숙주의 방어 기작을 피하기 위하여 non-phagocytic cell내로 침입하는 것으로 보이며 세포 내에서 증식할 수 있는 것은 *Strep. iniae*가 조직으로 감염이 확산될 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, 넙치 병원성 *Strep. iniae*는 cell wall 표면에 존재하는 capsule을 가지고 있으며 이것으로 넙치 두신 macrophage의 식작용을 회피하고 넙치 혈청의 세균 살해능에 저항성을 나타내는 것으로 사료된다. 그리고 CHSE-214와 같은 어류 주화 세포에 침입하여 증식할 수 있어 숙주 방어 기작을 피하고 세포 및 조직으로 확산됨으로서 병원성을 나타내는 것으로 사료되었다.

V. 요약

우리 나라의 양식 넙치에서 *Strep. iniae*에 의한 연쇄 구균병이 큰 피해를 내고 있으나 원인균의 병원성 기구에 대해서는 의문점이 많다. *Strep. iniae*의 병원성에는 많은 요인들이 복합적인 작용을 할 것으로 추정되고 있다. 그 중 polysaccharide capsule과 같은 cell wall surface material이 중요한 역할을 할 것으로 추정되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 *Strep. iniae*의 병원성 요인으로 작용할 수 있는 capsule의 존재 여부를 확인하고 그에 따른 capsule과 병원성과의 상관 관계를 조사하였다. 즉, 집락의 형태학적 특성에 따라 viscous form (V+)과 non-viscous form (V-)의 균주로 구분하여 그 특성을 비교 분석하였다. 분리균의 생리학적 및 생화학적 특성을 비교하였으며 polycationic ferritin을 처리하여 capsule의 유무를 확인하고 각 균주의 ECPs 효소 활성과 CHSE-214 cell line에 대한 세포 독성 효과 및 ECPs 농도에 따른 넙치 두신 macrophage의 chemiluminescence response에 대한 영향을 조사하였다. 또한, 넙치 혈청에서의 생존능 및 넙치 두신 macrophage의 식작용에 대한 저항성을 측정하였고 macrophage 내에서의 생존능과 일반 어류 주화 세포 내로의 침입 여부를 평가하였다.

그 결과 분리균의 생리학적 및 생화학적 특성으로는 항원성 및 병원성 차이를 구분할 수 없었으나 형태학적으로는 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉, V+인 경우 cell wall 표면에 capsule이 존재하며 ECPs 효소 활성도 더 강한 것으로 나타났지만, V-에서는 capsule이 존재하지 않으며 ECPs의 효소 활성도 없거나 약한 것으로 확인되었다. 모든 균주들의 ECPs는 CHSE-214 cell line에 대해 세포 독성 효과를 나타내었으며 ECPs는 낮은 농도에서도 넙치 두신 macrophage의 CL response를 억제하였다. 그리고 V+는 넙치 혈청에서 증식할 수 있지만 V-는 넙치 혈청에 의해 살균되는 것으로 나타나 넙치의 체액성 면역

요소에 대한 저항력이 없는 것을 알 수 있었다. 또한, V+는 넙치 신선 혈청으로 감염한 경우에도 V-에 비해 macrophage의 식균율이 낮았으며 식균된 이후에는 균 수가 지속적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었고 일반 어류 주화 세포 내로 침입하여 생존 및 증식할 수 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, V+는 capsule의 존재와 ECPs의 활성을 통해 병 원성을 나타내는 것으로 사료되었다.

VI. 감사의 글

언제나 아버지처럼 너그러움과 이해심으로 보살펴주신 박수일 지도교수님께 진심으로 감사드리며, 선생님의 가르침을 마음에 새겨 더욱 발전하는 모습으로 보답하고자 합니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 논문에 지도와 조언을 해주신 허민도 교수님과 김기홍 교수님께 진심으로 감사드립니다. 많은 가르침 주신 정준기 교수님, 정현도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사드립니다.

항상 관심 가져주시고 격려해주신 국립수산물과학원 동해수산물연구소 방종득 과장님, 국립수산물과학원 병리과 김진우 과장님, 김이청 연구관님, 최혜승 연구사님, 이주석 연구사님, 지보영 연구사님께 감사드립니다.

실험어도 제공해 주시고 꾸준한 관심과 격려를 보내주신 이재일 선배님, 박영수 선배님, 최성재 선배님, 이찬열 선배님께 감사드리며, 한결같은 마음으로 후배들을 아껴주시는 박현식, 조미영, 이상윤, 손영찬, 강민진, 황미혜, 권문경, 원경미, 박찬일, 김도형, 고석형, 성명희, 성연정 선배님께 진심으로 감사드리고, 마음은 항상 곁에 있는 한현자 선배님께 깊은 감사를 드립니다.

논문의 계획 과정부터 세심하게 신경써주시고 조언해주신 우승호 선배님께 깊은 감사를 드리며, 실험실의 만행으로 언제나 든든한 버팀목이 되어주신 이덕찬 선배님과 김수미 박사님께 감사드립니다. 실험에 많은 도움을 주고 큰 힘이 되어준 최정현 후배님께도 감사를 드립니다. 그리고 항상 말은 바 최선을 다해주고 실험실을 잘 이끌어나갈 최광진 선배님, 김은진, 오영은, 손새봄, 김윤희, 정영은, 김유정 후배님께 감사드립니다. 서로에게 충고와 조언을 아끼지 않고 함께 노력하며 동고동락한 최현숙 선배님과 동기 홍미주양에게 깊은 감사를 드립니다. 대학원 생활을 함께 하며 여러 가지로 도움을 준 김영화, 송승엽, 이대심, 이은혜, 최혜정 학형에게 고마운 마음을 전합니다.

항상 마음으로 위해주고 아껴주는 동기 김진희양과 장연화양에게 고마움을 전하며, 6년간 서로에게 기쁨과 위로가 되어준 98 동기들에게 고마운 마음을 전합니다. 그리고 자주 만나지는 못하지만 언제나 다정한 친구로 곁에서 힘이 되어준 박지영양에게 고마움을 전합니다.

지금의 제가 있게 하시고 언제나 한결같은 사랑과 신뢰로 저를 보듬어주시는 정신적인 지주이신 어머니와 대견하고 사랑스러운 동생 현수에게 그 동안의 미안한 마음을 대신하여 이 논문을 바칩니다.

VII. 참고 문헌

- Alim, A. R., K. Kawai and R. Kusuda (1996). Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. J. Fish Dis., 19, 39-46.
- Bachrach, G., A. Zlotkin, A. Hurvitz, D. L. Evans and A. Eldar (2001). Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Sterptococcus* vaccine. Infect. Immun., 67, 3756-3758.
- Barenès, A. C., F. M. Young, M. T. Horne and A. E. Ellis (2003). *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Dis. Aquat. Org., 53, 241-247.
- Barnes, A. C., M. T. Horne and A. E. Ellis (2003). *Streptococcus iniae* expresses a cell surface non-immune trout immunoglobulin-binding factor when grown in normal trout serum. Fish & Shellfish Immunol., 15, 425-431.
- Barnes, A. C., C. Guyot, B. G. Hansen, K. Mackenzie, M. T. Horne and A. E. Ellis (2002). Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). Fish & Shellfish Immunol., 12, 155-168.
- Barnes, A. C., M. C. Balebona, M. T. Horne and A. E. Ellis (1999). Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. Microbiol., 145, 483-494.
- Barnes, A. C., M. T. Horne and A. E. Ellis (1996). Effect of iron on expression of superoxide dismutase by *Aeromonas salmonicida* and associated resistance to superoxide anion. FEMS Microbiol. Lett., 142, 19-26.
- Berridge, B. R., J. D. Fuller, J. Azavedo, D. E. Low, H. Bercovier and P. F.

- Frelier (1998). Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. J. Clin. Microbiol., 36, 2778-2781.
- Bisno, A. L., M. O. Brito and C. M. Collins (2003). Molecular basis of group A streptococcal virulence. Lancet Infect. Dis., 3, 191-200.
- Bromage, E. S., A. Thomas and L. Owens (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi, *Lates calcarifer*. Dis. Aquat. Org., 36, 177-181.
- Carr, A., D. D. Sledjeski, A. Podbielski, M. D. Boyle and B. Kreikemeyer (2001). Similarities between complement-mediated and streptolysin S-mediated hemolysis. J. Biol. Chem. 276, 41790-41796.
- Charland, N., V. Nizet, C. E. Rubens, K. S. Kim, S. Lacouture and M. Gottschalk (2000). *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. Infect. Immun. 68, 637-643.
- Czuprynski C. J. (1988). Bacterial evasion of cellular defense mechanisms: an overreview. In: Virulence mechanisms of bacterial pathogens (ed. by Roth, J. A.). pp. 141-160, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Danon, D. L., L. Goldstein, Y. Marikovsky and E. Skutelsky (1972). Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. J. Ultrastruct. Res., 38, 500-510.
- Eldar, A., S. Perl, P. F. Frelier and H. Bercovier (1999). Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. Dis. Aquat. Org., 36, 121-127.
- Eldar, A and C. Ghittino (1999). *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis. Aquat. Org., 36, 227-231.
- Eldar, A., P. F. Frelier, L. Assenta, P. W. Varner, S. Lawhon and H. Bercovier (1995). *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing

- septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*.
Int. J. Syst. Bacteriol., 45, 840-842.
- Fuller, J. D., D. J. Bast, V. Nizet, D. E. Low and J. C. S. Azavedo (2001).
Streptococcus iniae virulence is associated with a distinct genetic profile.
Infect. Immun., 69, 1994-2000.
- Gibson, R. L., V. Nizet and C. E. Rubens (1999). Group B streptococcal
beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells.
Pediatr. Res., 45, 626-634.
- Johnson, J. A., P. Panigrahi and J. G. Morris, Jr. (1992). Non-O1 *Vibrio*
cholerae NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines
colony morphology, serum resistance and virulence in mice. Infect.
Immun., 60, 864-869.
- Kawahara, E., H. Sakoh, S. Nomura and R. Kusuda (1989). Haemolysin
production by beta-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail,
Seriola quinqueradiata. Fish Pathol., 24, 229-233.
- Kawahara, E. and R. Kusuda (1987). Direct fluorescent antibody technique for
differentiation between α - and β -hemolytic *Streptococcus* spp. Fish
Pathol., 22, 77-82.
- Kitao, T., T. Aoki and R. Sakoh (1981). Epizootic caused by β -hemolytic
Streptococcus species in cultured freshwater fish. Fish Pathol., 15, 301-307.
- Kuo, C. F., J. J. Wu, K. Y. Lin, P.J. Tsai, S. C. Lee, Y. T. Jin, H. Y. Lei and
Y. S. Lin (1998). Role of streptococcal pyrogenic exotoxin B in the mouse
model of group A streptococcal infection. 66, 3931-3935.
- Kusuda, R. and F. Salati (1999). *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*.
In: Fish disease and disorders, vol. 3, Viral, bacterial and fungal
infections (eds. by Wood, P. T. K. and D. W. Bruno), pp. 303-317, CABI
Publishing, New York.
- Kusuda, R., K. Kawai, T. Toyoshima and I. Komatsu (1976). A new
pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus* isolated from

- an epizootic of cultured yellotail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 42, 1345-1352.
- Lopez-Doriga, M. V., A. C. Barnes, N. M. dos Santos and A. E. Ellis (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. Microbiol., 146, 21-30.
- MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria (3rd ed. by Williams, L and Wilkins), USA.
- Magarinos, B., J. L. Romalde, M. L. Lemos, J. L. Barja and A. E. Toranzo (1996a). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. FEMS Microbiol. Lett., 138, 29-34.
- Magarinos, B., R. Bonet, J. L. Romalde, M. J. Martinez, F. Congregado and A. E. Toranzo (1996b). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. Microb. Pathog., 21, 289-297.
- Mandell, G. L. (1975). Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. J. Clin. Invest., 55, 561-566.
- Marouni, M. J., E. Ziomek and S. Sela (2003). Influence of group A streptococcal acid glycoprotein on expression of major virulence factors and internalization by epithelial cells. Microb. Pathog., 35, 63-72.
- Miles, A. A. and S. S. Misra (1938). The estimate of the bacterial power of the blood. J. Hygiene, 38, 873-885.
- Nguyen, H. T., K. Kanai and K. Yoshikoshi (2001). Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 36, 40-41.
- Nizet, V., R. L. Gibson, E. Y. Chi, P. E. Framson, M. Hulse and C. E. Rubens (1996). Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. Infect. Immun., 64, 3818-3826.
- Ohnishi, K. and Y. Jo (1981). Studies on streptococcal infection in

- pond-cultured fishes. I. Characteristics of a β -hemolytic *Streptococcus* isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. *Fish Pathol.*, 16, 63-67.
- Ooyama, T., A. Kera, T. Okada, V. Inglis and T. Yoshida (1999). The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Dis. Aquat. Org.*, 37, 121-126.
- Pier, G. B. and S. H. Madin (1976). *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 545-553.
- Ring, A., J. N. Weiser and E. I. Tuomanen (1998). Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.*, 102, 347-360.
- Rubens, C. E., S. Smith, M. Hulse, E. Y. Chi and G. van Belle (1992). Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. *Infect. Immun.*, 60, 5157-5163.
- Sakai, M., E. Kawahara, S. Atsuta and M. Kobayashi (1991). Virulence factors in β -haemolytic *Streptococcus* sp. In: Diseases in Asian aquaculture (eds. by Shariff, M., J. R. Arthur and R. Subasinghe), pp. 299-304, Asian Fisheries Society, Fish Health Section, Manila.
- Sakai, M., S. Atsuta and M. Kobayashi (1989). Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with β -hemolytic streptococcal bacterin. *Fish Pathol.*, 24, 169-173.
- Scott, A. L. and P. H. Klesius (1981). Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. *Dev. Biol. Stand.*, 49, 243-254.
- Secombes C. J. (1990). Isolation of salmonids macrophages and analysis of their killing activity. In: Technique in Fish Immunology, vol. 1 (eds. by Stolen, S., T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Robertson and W. B. van Muiswinkel), pp. 137-154, SOS Publication, Fair Haven, USA.
- Ugajin, M. (1981). Studies on *Streptococcus* sp. as a causative agent of an

- epizootic among the cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*, in Tochigi Prefecture, Japan, 1980. Fish Pathol., 16, 119-127.
- Wai, S. N., Y. Mizunoe, A. Takade, S. I. Kawabata and S. I. Yoshida (1998). *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance and biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol., 64, 3648-3655.
- Weinstein, M. R., M. Litt, D. A. Kertesz, P. Wyper, D. Rose, M. Coulter, A. McGeer, R. Facklam, C. Ostach, B. M. Willey, A. Borczyk and D. E. Low (1997). Invasive infections due to a fish pathogens, *Streptococcus iniae*. S. *iniae* Study Group. N. Engl. J. Med., 337, 589-594.
- Yoshida, T., M. Endo, M. Sakai and V. Inglis (1997a). A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Org., 29, 233-235.
- Yoshida, T., T. Eshima, Y. Wada, Y. Yamada, E. Kakizaki, M. Sakai, T. Kitao and V. Inglis (1996). Phenotypic variation associated with an anti-phagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. Dis. Aquat. Org., 25, 81-86.
- Yoshida, T., V. Inglis, N. Misawa, R. Kruger and M. Sakai (1997b). In vitro adhesion of *Pasteurella piscicida* to cultured fish cells. J. Fish Dis., 20, 77-80.
- Yoshida, T., Y. Yamada and M. Sakai (1996). Association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in β -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health, 8, 223-228.
- Zhang, X. H. and B. Austin (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. J. Fish Dis., 23, 93-102.
- Zlotkin, A., H. Hershko and A. Eldar (1998). Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Appl. Environ. Microbiol., 64, 4065-4067.

- 우승호 (2002). 해수 양식 어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성. 부경대학교, 석사 학위 논문
- 이덕찬, 이재일, 박찬일, 박수일 (2001). 해산 양식어류로부터 분리된 연쇄구균증의 원인균, *Lactococcus garvieae*에 대한 연구. J. Fish Pathol., 14, 71-80.
- 전세규(2000). 양식 어류 질병(해산어편). 한국수산신보사