

넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 병어에서 분리된 연쇄상구균의 다양성

김종훈 · 김은희*
여수대학교 수산생명의학과

Diversity of the Streptococcal Strains Isolated from Diseased Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Jong-Hun KIM and Eunheui KIM*

Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

To evaluate the biological diversity of fish pathogenic streptococci, 35 strains isolated from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), were analyzed using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique with the oligonucleotide commercial primer 6 (Amersham Biosciences). Api 20 Strep test, drug resistance, and artificial infection were carried out for further characterization of the isolates. RAPD fingerprints showed similar pattern in 25 strains (about 71.4% of 35 isolates) and these strains were designed as RA group I. Similarities greater than 44% were obtained when the Dice coefficient was applied among the isolates of RA I. On the other hand, the reference *Streptococcus iniae* showed a similar RAPD profile to the isolates with similarity levels of 40-93.3%. RA I was suggested to be the dominant group isolated from olive flounder suffering from streptococcosis. However, the isolates of RA I group were not classified into the same species by the Api 20 Strep identification system. There was no peculiarity in drug resistance patterns of RA I group isolates against 7 antibacterial agents. However, only 3 of 25 isolates (0.12%) showed oxytetracycline (OTC) resistance and OTC might be a useful chemotherapeutic agent in controlling the streptococcosis by strains of RA I group in olive flounder. Fish injected intraperitoneally with 10^5 CFU of an isolate of RA I and RA III group showed 60% and 50% accumulative mortality for 20 days, respectively (20% in control or RA II). However further comparative studies about differences in virulence between isolates are needed.

Key words: RAPD profile, Streptococci, *Paralichthys olivaceus*, Fish pathogen, Drug resistance

서 론

양식어류의 연쇄상구균증 (Streptococcosis)은 여러 종의 연쇄상구균에 의하여 발생하는 질병을 통칭하는 이름으로 *Streptococcus* sp., *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus* sp. 등이 원인균으로 보고되고 있다 (Lee, 1994; Lee et al., 2001; Oh et al., 1998). 이는 질병에 관여하는 연쇄상구균의 종류가 다르기 때문인 것으로 보고 있지만, 연쇄상구균 균을 구성하고 있는 종 조성 자체가 다양할 뿐 아니라, 표준화된 분류 방법이 없다는 것도 이러한 다양성의 한 원인이 되었을 것으로 추정된다.

어류에서 연쇄상구균은, 최초 일본의 방어에서 분리되어 *Streptococcus* sp. (Kusuda et al., 1976)로 발표되었던 것을 그 후 *Enterococcus seriolicida* (Kusuda et al., 1991)로 명명하였다가, 다시 *L. garvieae* (Eldar et al., 1996)로 명명해 온 것처럼 분류에 어려움이 있다. 최근에는 연쇄상구균의 종 다양성을 연구하고 또 병원균의 역학조사를 위하여 많은 분자생물학적 기법들이 이용되고 있다. *L. garvieae* (Zlotkin et al., 1998a)나 *S. iniae* (Berridge et al., 1998)의 경우에는, 16S rRNA에 대한

specific primer가 개발되어 많은 연구에서 이용되고 있다. 그러나 Aoki et al. (2000)은 *L. garvieae*의 16S rRNA sequence가 *L. lactice*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. equi*의 sequence와 90% 이상의 상동성을 보이므로 특정 primer를 이용한 PCR에 의하여 *L. garvieae*만 특이적으로 구분해내는데 어려움이 있다는 것을 지적하였다.

한편 세균의 전체 DNA 구조차이를 이용하는 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis를 통하여 연쇄상구균의 종 간, 또는 종 내에서의 차이를 알고자 하는 다양한 연구가 진행되고 있다 (Eldar et al., 1999; Moschetti et al., 2001; Ravelo et al., 2003). Zlotkin et al. (1998b)은 RFLP ribotyping 방법을 이용하여 *S. iniae*가 wild fish로부터 해산양식어류로 전이되었음을 입증하였고, Dodson et al. (1999)은 RAPD 분석법과 repetitive primer PCR법으로 질병상태의 사람에서 분리된 *S. iniae*가 어류에서 분리된 것과 동일한 genotype임을 밝혔다.

우리나라의 양식넙치에 있어서 연쇄상구균증은 매년 반복적으로 출현하여 많은 경제적 손실을 일으키고 있다 (Oh et al., 1998). 그러나 이들 원인균의 분류학적 위치가 분명하지 않아

*Corresponding author: ehkim@yosu.ac.kr

대부분 *Streptococcus* sp.라고 보고되고 있으며 (Lee, 1994; Oh et al., 1998), 얼마나 다양한 연쇄상구균 종이 본 질병에 관여하고 있는지도 알려져 있지 않다. Eldar and Ghittino (1999)는 무지개송어의 *L. garvieae* 감염과 *S. iniae* 감염에 의한 질병은 서로 유사한 증상을 보이지만, 이들의 병리학적 소견이 매우 다를 뿐 아니라, 병원균의 독력에도 상당한 차이가 있다는 것을 보고하였다. 그러므로 원인균을 정확히 알고 차별화된 질병대책을 세우는 것은 아주 중요하다고 할 수 있다. 우리나라의 경우 어류병원성 연쇄상구균의 종 다양성에 관한 연구보고는 거의 없다. 그러나 최근 Lee et al. (2001)이 생화학적인 성상 및 혈청학적 특징과 *L. garvieae*에 대한 특이 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과에 근거하여 우리나라 해산어류에서 분리된 연쇄상구균들의 종 조성을 조사하였다. 그 결과 35 시험균 중의 21 균주가 *L. garvieae*이며, *Enterococcus* sp. 5균주, *Streptococcus* sp. 9균주로 보고하여 *L. garvieae*가 우점적임을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 넙치 병어로부터 분리된 연쇄상구균들의 RAPD profiles을 조사하여 질병 원인균의 다양성을 알아보고, 우점적으로 출현하는 종들의 생물학적 특성 및 약제감수성 경향의 차이를 조사함으로써 치료 및 예방 대책을 수립할 수 있는 근거를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 연쇄상구균 분리주는 총 35균주로 모두 남해안에서 양식되는 넙치의 병어에서 분리되었다 (Table 1). 한편 참고균주인 *E. faecalis* (KCTC3206), *L. garvieae* (KCTC3772), *S. entericus* (KCTC13925), *S. iniae* (KCTC3657), *S. parauberis* (KCTC3651), *S. pyogenes* (KCTC3096)는 균주센타로부터 구입하여 사용하였다. 이들은 모두 그람양성 구균이며 catalase를 생성하지 않았으며, 1% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion (BHI) 배지로 30°C에서 배양되었다. 세균의 용혈성은 5% sheep blood가 첨가된 blood agar배지 (아산제약)로 확인하였다.

DNA 시료 준비

세균의 total DNA solution은 boiling 방법으로 준비하였다. BHI broth를 이용하여 30°C에서 24시간 배양한 세균배양액을 9.0×10^8 cfu/mL로 조정하였다. 세균 배양액 5 mL부터 세균을 모아 멸균증류수로 3회 세척한 후, 50 µL의 멸균증류수에 다시 부유하여 100°C에서 5분간 끓였다. 이것을 8,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 -20°C에 보관해두고 사용하였다.

RAPD profile analysis

연쇄상구균들의 DNA 구조상의 차이를 보기 위하여 Romalde et al. (1999)의 방법에 따라 RAPD pattern을 분석하였다. Ready-To-Go-RAPD analysis beads와 10-mer Random primer

Table 1. Origin of the streptococci isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their group classified according to the RAPD profiles

RA group	Strain	Origin	Yr of isolation
I	128	Cheju	2002
I	135	Cheju	2002
I	150	Cheju	2002
I	28	Cheju	2001
I	29	Cheju	2001
I	32	Cheju	2001
I	37	Cheju	2001
I	56	Cheju	1998
I	52	Goheung	1998
I	114	Haenam	2002
I	111	Namhae	2002
I	112	Namhae	2002
I	113	Namhae	2002
I	92	Wando	2002
I	93	Wando	2002
I	94	Wando	2002
I	95	Wando	2002
I	120	Wando	2002
I	124	Wando	2002
I	125	Wando	2002
I	141	Yeonggwang	2002
I	68	Yeosu	2001
I	69	Yeosu	2001
I	169	Yeosu	1998
I	171	Yeosu	1998
II	129	Cheju	2002
II	13	Cheju	2001
II	64	Cheju	2000
II	65	Cheju	2000
II	143	Yeonggwang	2002
III	63	Yeosu	1998
IV	127	Cheju	2002
V	55	Cheju	1998
V	54	Wando	1998
V	53	Yeosu	2001

(Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 PCR 30 cycles (denature, 95°C, 1 min.; annealing, 35°C, 2 min.; extension, 72°C, 2 min.)을 실시하였다. Primer는 PCR band 형성이 양호한 것으로 입증된 P5 (AACGCGCAAC)와 P6 (CCCGTCA-GCA)를 사용하였다 (Ravelo et al., 2003; Song et al., 2003). PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 나타나는 DNA band pattern으로 비교하였으며 DNA band profile의 유사성에 근거하여 연쇄상구균들을 RAPD group으로 분류하였다. 전기영동 상에서 나타나는 main band들은 필요에 따라 Dice coefficient ($Sd = [2A / (2A + B + C)] \times 100$; A, matching band 수; B and C, 서로 다른 band 수)를 계산하여 균주간 유사도를 평가하였다.

API 20 Strep profile

API 20 Strep (bioMerieux, France) kit를 이용하여 일부 균들의 profile을 비교하였다. API 20 Strep kit는 제조회사의 manual

에 따라 사용하였으며, 4시간 배양결과와 24시간 배양결과를 APILAB identification System (APILAB Plus, V 3-3-3. bio-Merieux, France)으로 분석하였다.

항균제 내성 pattern 비교

분리균에 대한 각종 항균제의 MIC를 Murray et al. (1999)의 방법에 따라 two fold broth dilution으로 결정하였다. 각 세균을 BHI broth로 배양하여 대수 증식기에 있는 균 부유액을 10^4 CFU/mL가 되도록 조정하였다. 사용한 항균제는 양식현장에서 비교적 사용빈도가 높은 것으로 알려진 ampicillin (ABPC), erythromycin (EM), florfenicol (FFN), flumequine (AR), norfloxacin (NFLX), oxolinic acid (OA), oxytetracycline (OTC)의 7종이다. BHI broth를 이용하여 각각의 항균제를 100 µg/mL에서부터 1/2씩 12단계까지 연속 희석하여 각 희석계열을 96 well plate에 100 µL씩 준비한 후, 세균 부유액을 10 µL씩 접종하였다. 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 균의 성장여부를 대조구와 비교하여 조사하였으며, 각 분리균이 내성을 나타내는 항균제 profile을 비교하였다. 한편 항균제 disc (BBL, Becton Dickinson, MD, USA)를 이용한 agar 확산법으로, 조사되지 않은 다른 약제와의 복합 내성 여부를 조사하였다.

분리균의 병원성

연쇄상구균들의 RAPD 그룹별 균주의 넘치에 대한 병원성을 알아보기 위하여 복강 주사법으로 인위감염을 실시하였다. 시험 균주를 BHI broth로 30°C에서 24시간 배양한 후, 원심 분리하여 침전하였으며 멸균생리식염수로 균을 3회 세척하여 배지 성분을 제거한 후, 다시 멸균생리식염수로 10^6 CFU/mL이 되도록 부유하였다. 한편 50-100 gram의 건강한 넘치를 60 L의 해수가 들어있는 수조에 10마리씩 수용하였다. 25 ppm의 MS222용액에 시험어를 침지하여 마취시킨 후, 1 mL의

주사기를 이용하여 시험균을 10^5 CFU/fish 가 되도록 주사하였으며 대조구는 멸균생리식염수를 동량 주사하였다. 시험기간 동안 사료는 투여하지 않았으며, 사육수의 온도는 20°C 전후를 유지하였고 격일로 사육수의 1/2을 교환하면서 세균주사 후 20일 동안의 누적폐사를 조사하였다.

결과 및 고찰

RAPD profile의 다양성

10-mer random primer 6를 이용하여 넘치에서 분리된 35균주와 참고 균주에 대하여 RAPD pattern 분석을 실시하여 그 결과를 Fig. 1과 2에 제시하였다. 넘치에서 분리된 균주들은 전기 영동 상에서 나타나는 band pattern을 기준으로 5 group으로 구분할 수 있었다 (Table 1). 1 kb 근처에 2개의 뚜렷한 main bands를 공유하는 group을 RA I, 1개의 main band를 형성하는 group을 RA II, 0.5 kb 이하에 band를 형성하는 group을 RA III, 0.5와 1 kb 사이에 band를 형성하는 group을 RA IV, 그리고 전혀 band를 형성하지 않는 group을 RA V로 분류하였다. RA I에는 시험균 35주 중의 25균주 (약 72.4%)가 속해 있어서 우점적으로 출현하는 group임이 밝혀졌다. RA I group에 속하는 균주들은 각각 제주 분리균 8주, 여수 분리균 4주, 완도 분리균 7주, 남해 분리균 3주 그리고 영광, 해남, 고흥 분리균이 각각 1주씩 속해 있었다. RA I group으로 분류된 균주들 간의 유사도를 근거로 하여 dendrogram을 작성하였다 (Fig. 3). 이들은 44%의 유사도를 보이는 두 genogroup으로 구분되었으며, 각 group내의 균주들은 66% 이상의 유사도를 나타내었다. RA I group의 RAPD profile을 6종의 표준 균주들의 것과 비교해 보았다 (Fig. 2). *E. faecalis*는 primer 6에서 band를 형성하지 않았지만, RA I group 균주들은 *S. iniae* 표준 균주와 유사한 pattern을 보여, 40-93.3%의 상동성을 나타냄으

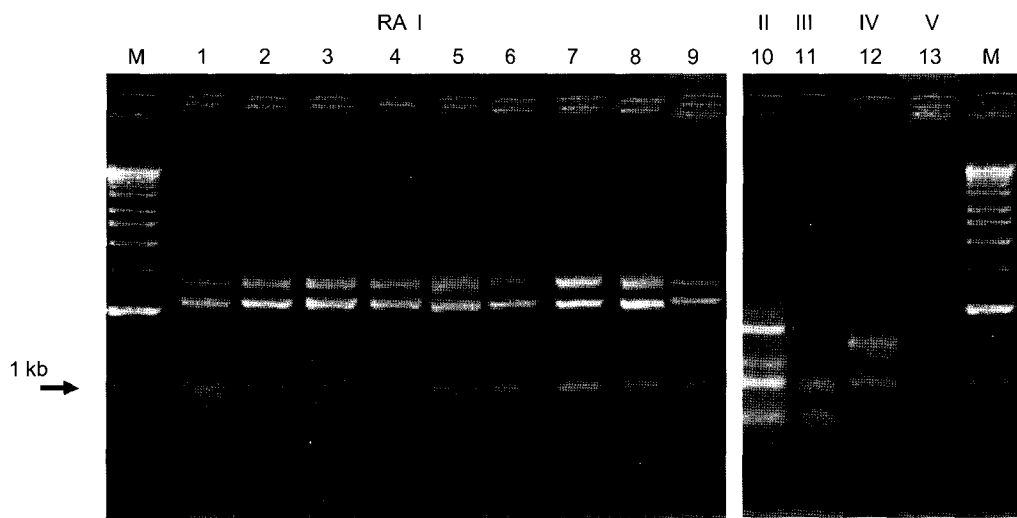


Fig. 1. Comparison of RAPD profiles obtained for streptococcal isolates from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) with primer 6. RA I, RA II, RA III, RA IV and RA V were grouped by RAPD pattern similarity. RA I group shows the RAPD fingerprint of isolates dominantly appeared. M is molecular size marker.

Lanes: 1, 69; 2, 120; 3, 124; 4, 56; 5, 135; 6, 169; 7, 150; 8, 171; 9, 29; 10, 64; 11, 63; 12, 124; 13, 53.

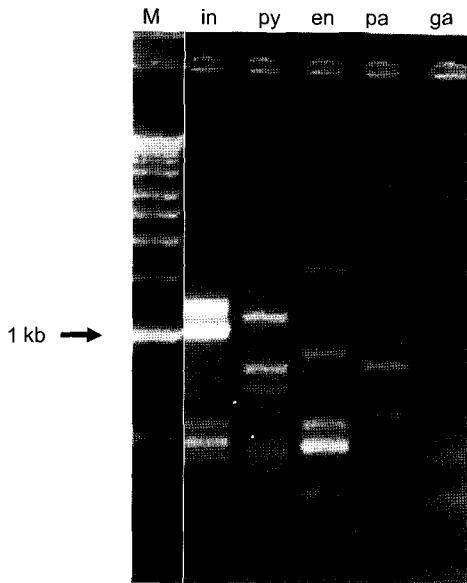


Fig. 2. RAPD fingerprints obtained for the reference streptococcal strain with primer 6. Lanes: in, *Streptococcus iniae*; py, *S. pyogenes*; en, *S. entericus*; pa, *S. parauberis*; ga, *Lactococcus garvieae*. The position of 1 kb is indicated on the left.

RAPD profile에서 main band 이외에 다양한 minor band가 나타나는 균주들이 상당수 출현하고 있어 본 그룹 내에 다양한 genotype이 있음을 암시하였다. Romalde et al. (1999)은 turbot에서 분리된 *S. parauberis* 균주들이 ribotyping에서 90% 이상의 높은 상동성을 보여 같은 ribogroup으로 분류되었다 할지라도 RAPD pattern 상에서는 유사도가 20-90%로 다양함으로써 RAPD 분석이 동일 종 내의 유전적 차이를 구분하는 민감한 방법임을 제시한 바 있다. 한편 Ravelo et al. (2003)은 어류병원성 *L. garvieae*를 molecular fingerprinting하기 위해서는 primer 5가 6보다 훨씬 세밀하게 genotype을 구분해 주지만, 유사도에 따른 group으로는 모두 3 group으로 구분해 준다는 것을 보고하였다. 그러므로 우리나라 남해안에서 양식되고 있는 넙치의 병어에서 분리되는 연쇄상구균들도 genotype으로 구분하는 것이 가능하며, 이와 같은 RAPD pattern 분석으로 연쇄상구균들의 기원, 분포 및 이동상황 등에 관한 추가 연구가 가능할 것으로 생각된다.

API 20 Strep profile

RA1 group에 속하는 균들 중 7균주를 임의로 선택하여 API 20 Strep test를 실시한 결과를 Table 2에 제시하였다. 균주간 API profile이 다양하게 나타났으며, 이들이 동일 종에 속한다는 결과를 얻지 못하였다. Iida et al. (1991)은 API 20 Strep을 동일 균에 대하여 5회 실시하였을 때, 5회 모두 동일한 결과를 얻지 못하는 경우를 보고하였다. Romalde et al. (1999)는 전통적인 생화학적, 혈청학적 방법에 의하여 분류되어있던 연쇄상구균 종들에 있어서, 분자유전학적 분류방법으로 접근해 보았을 때 동일 종으로 분류되어 있는 균주 간에도 서로 상동성이 낮은 균주가 있는가 하면 다른 종임에도 높은 상동성을 보이는 경우가 나타나므로 연쇄상구균들의 재분류가 필요하다고 하였다. 그러므로 추후 표준 균주를 포함하는 다양한 연쇄상구균들을 대상으로 여러 가지 방법으로 분류를 시도하여 그 결과에 대한 종합적인 검토가 있어야 할 것으로 생각된다.

항균제내성 형태

연쇄상구균의 항균제 내성형태를 RA group 별로 Table 3에 제시하였다. 항균제 내성경향에 있어서 group별 특이성은 없었으며 이는 균주 마다 얻는 획득내성이 다르기 때문으로 생각된다. 한편, 전체 시험 균주가 연쇄상구균의 공통된 항균제 내성특성으로 알려져 있는 oxolinic acid (OA)에 내성이었으며, 이외에도 RA II-RA V에 속하는 균주들은 모두 flumequin (AR)과 kanamycin (KM)에 내성을 보였다. 넙치 양식현장에서 가장 빈번하게 사용되는 oxytetracycline (OTC)에 대한 내성에 있어서는 RA I 균주들의 OTC내성 출현률이 다른 group에 비하여 낮게 나타나는 경향이 있었다. RA I에 속하는 25균주 중 3균주만 OTC에 내성을 보인 반면, 기타 group에 속하는 10균주에는 6균주가 OTC 내성으로 나타났다. 이는 OTC가 넙치 양식현장에서 지속적으로 사용되고 있음에도 불구하고, 위와 같이 우점적으로 출현하는 연쇄상구균내의 OTC 내성

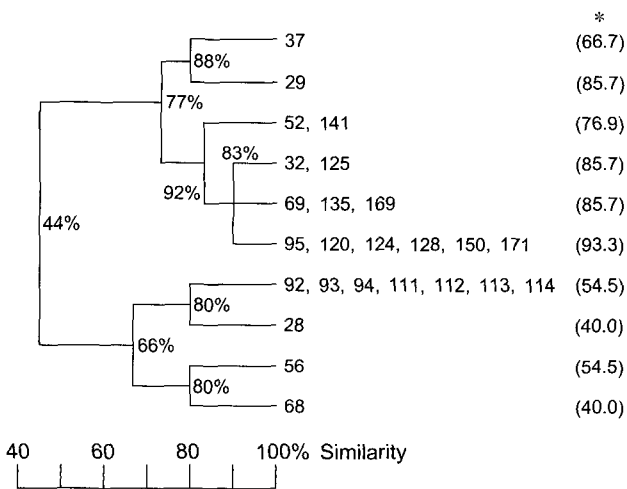


Fig. 3. Dendrogram established using Dice similarity coefficient among strains on the basis of the RAPD profiles. Strain numbers refer to table 1. The values in parenthesis are similarity between isolates of this study and *Streptococcus iniae* reference strain.

로써 (Fig. 3), *S. iniae* type이 우점적으로 출현한 종임을 시사하였다. Lee et al. (2001)은 어류병원성 연쇄상구균들 중에는 *L. garvieae*가 우점적으로 나타났다고 보고한 바 있다. 이는 사용된 균주들이 대부분 동해안에서 분리된 점으로 볼 때 세균의 분리지역, 분리어종 및 분리시기에 따라 우점적으로 출현하는 연쇄상구균종에 차이가 있음을 의미한다 볼 수 있으며, 이에 대한 지속적인 조사가 필요하다고 사료된다. 한편,

Table 2. API profiles of RA I group streptococcal strain. Results were recorded after incubation at 35°C for 24 hrs.

Test	Strain	29	32	37	69	120	135	169	<i>Streptococcus iniae</i>
VP		-	-	-	-	-	-	-	-
HIP		-	+	+	-	-	-	-	-
ESC		+	+	+	+	+	+	+	+
PYRA		-	+	+	+	+	+	-	+
α GAL		-	-	-	-	-	-	-	-
β GUR		-	-	-	-	+	-	-	+
β GAL		-	-	-	-	-	-	-	-
PAL		+	+	+	+	+	+	+	+
LAP		+	+	+	+	+	+	+	+
ADH		-	-	+	+	+	-	-	+
RIB		-	-	-	-	+	-	-	+
ARA		-	-	-	-	-	-	-	-
MAN		-	+	-	-	+	+	-	+
SOR		-	-	-	-	-	-	-	-
LAC		-	-	-	-	-	-	-	-
TRE		+	+	+	+	+	+	+	+
INU		-	-	-	-	-	-	-	-
RAF		-	-	-	-	-	-	-	-
AMD		-	+	-	+	+	+	-	+
GLYG		-	-	-	+	+	-	-	+
β HEM		+	+	+	+	+	+	+	+
Result ^a		4060014	6160115	6161014	4161017	4563117	4160115	4060014	4563117

Result^a: 4060014, *S. constellatus* (92.1%, doubtful); 6160115 (unacceptable); 6161014, *S. pyogenes* (98.4%, acceptable); 4161017, *S. pyogenes* (99.5%, good); 4563117, *S. dyssequisimilis* (99.9%, acceptable); 4160115 (unacceptable).

Table 3. Drug resistance pattern of RAPD group and strain numbers showing each resistance pattern

RA group	Strain No.	ABPC*	FFN	NFLX	EM	OTC	KM	AR	OA
I	28, 32, 68, 92		+				+		+
	69				+	+			+
	93				+	+	+		+
	141				+	+	+	+	+
	113, 114				+		+	+	+
	29, 52, 94, 111, 112, 124, 125, 128, 135, 150, 169						+	+	+
	37, 56, 120							+	+
II	95	+							+
	171								+
	13, 64, 143						+	+	+
	65, 129					+	+	+	+
III	63			+		+	+	+	
IV	127						+	+	
V	53, 54, 55						+	+	

* ABPC, ampicillin; FFN, florfenicol; NFLX, norfloxacin; EM, erythromycin; OTC, oxytetracycline; KM, kanamycin; AR, flumequine; OA, oxolinic acid.

출현률이 낮으므로, 여전히 치료제로서 선호되고 있는 이유라 할 수 있겠다.

병원성 비교

RA I에 속하는 strain 37, RA II의 strain 13, 그리고 RA III에 속하는 strain 63으로 넓치에 인위감염을 실시하여 20일 간의 누적 폐사를 Fig. 4에 나타내었다. 주사 감염후 2주까지의 폐사율은 모든 실험구에서 20% 이하였으나, 그 후 폐사가 급격히

증가하였다. 이는 실험 수온이 실제 발병시기의 수온보다 낮았기 때문에 느리게 질병이 진행된 때문으로 생각되었다. 실험 종료시, 시험구별 누적폐사를 비교해 보면, control구에서는 10%의 폐사가 나타난 반면, strain 37과 63 감염 실험구는 각각 60%와 50%의 누적 폐사를 보여 대조구에 비해 유의한 차를 나타내었다. 그러나 strain 13 실험구는 20%의 폐사를 보여 대조구와 유사했다. 그러나 이러한 폐사율 차이가 group 간의 차이인지, 군주 간의 차이인지는 본 실험으로 확인할

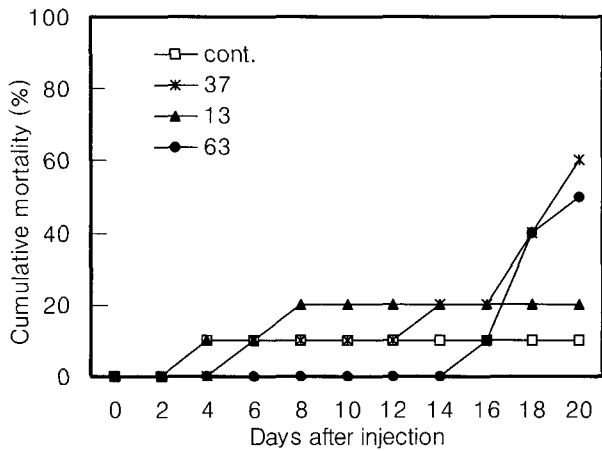


Fig. 4. Cumulated mortality of olive flounder after injection of the streptococcal strain 37 (RA group I), 13 (RA group II) and 63 (RA group III). Control group was injected with sterile saline.

수 없었다. Fuller et al. (2001)은 어류나 사람에게서 분리된 *S. iniae*의 독력이 genetic profile과 관련이 있다고 하였다. 질병을 유발하는 균주는 10^2 CFU 만으로도 충분히 발병하지만, 질병을 유발하지 않는 균주는 10^8 CFU를 접종하여도 발병하지 않았으며, 이 둘의 PFGE profile을 비교해보면, 독력이 강한 것은 genetic profile이 일정한 반면, 독력이 없는 균주들은 다양한 profile을 나타낸다고 보고하였다. 그러므로, 본 실험에서 넙치 병어에서 우점적으로 출현하는 것으로 밝혀진 RA1 group의 균주들을 중심으로 독력과 RAPD profile과의 상관관계에 대한 추가실험과 고찰이 필요하겠다.

이상의 결과에 의해 우리나라 남해안의 양식넙치 병어에서 분리되는 연쇄상구균에는 *S. iniae* type의 RA I group이 우점종으로서 남해안지역 전체에 분포하고 있음을 알 수 있었다. 혈청형이 다른 연쇄상구균들 사이의 공통항원인자를 찾는 것과 더불어 연쇄상구균을 일으키는 병원세균의 종 구성적 다양성을 아는 것은 효과적인 백신개발을 위해서도 필수적이라 할 수 있다.

사 사

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다 (KRF-2001-002-H00008).

참 고 문 헌

Aoki, T., C.I. Park, H. Yamashita and I. Hirono. 2000. Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. J. Fish Dis., 23, 1-6.
 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 space. J. Clin. Microbiol., 36, 2778-2781.
 Dodson, S.V., J.J. Maurer and E.B. Shotts. 1999. Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. J. Fish Dis., 22, 331-336.
 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.
 Eldar, A., C. Ghittino, L. Asanta, E. Bozzetta, M. Gorla, M. Prearo and H. Bercovier. 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningococcal meningitis in fish. Curr. Microbiol., 32, 85-88.
 Eldar, A., M. Gorla, 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.
 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.
 Iida, T., K. Hamasaki and H. Wakabayashi. 1991. Rapid identification for fish pathogenic streptococci by Api 20 strep. Fish Pathol., 26, 93-94. (in Japanese)
 Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C.R. Banner and J.L. Fryer. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 406-409.
 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 yellowtail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 42, 1345-1352. (in Japanese)
 Lee, C.H. 1994. Studies on the *Streptococcus* disease of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Tech. Rep. Nat'l. Fish. Res. Dev. Agency, 115, 49-63.
 Lee, D.C., J.I. Lee, C.J. Park and S.I. Park. 2001. The study on the causal agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. J. Fish Pathol., 14, 71-80. (in Korean)
 Moschetti, G., G. Blaiotta, F. Villani, S. Coppola and E. Parente. 2001. Comparison of statistical methods for identification of *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from randomly amplified polymorphic DNA Patterns. Appl. Environ. Microbiol., 67, 2156-2166.
 Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenoer, R.H. Tenover. 1999. Manual of Clinical Microbiology.

- 7th ed. 1469-1497. American Society for Microbiology, Washinton D.C., USA.
- Oh, S.P., D.W. Kim, J.J. Lee and C.H. Lee. 1998. Bacterial disease in flounder farms of Cheju island. J. Fish Pathol., 11, 23-27. (in Korean)
- Ravelo, C., B. Magarinos, S. López-Romalde, A.E. Toranzo and J.L. Romalde. 2003. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol., 41, 751-756.
- Romalde, J.L., B. Magarinos, C. Villar, J.L. Barja and A.E. Toranzo. 1999. Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. FEMS Microbiol. Lett., 459, 297-304.
- Song, J.K., J.H. Kim and E. Kim. 2003. Comparison of RAPD profiles and phenotypical characters of streptococcal strains. J. Fish Pathol., 16, 51-59. (in Korean)
- Zlotkin, A., A. Eldar, C. Ghittino and H. Bercovier. 1998a. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36, 983-985.
- Zlotkin, A., H. Hershko and A. Eldar. 1998b. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Appl. Environ. Microbiol., 64, 4065-4067.

2003년 10월 15일 접수
2003년 12월 18일 수리