

## *Nocardia* 감염증에 의한 양식 가물치의 대량 폐사

박명애 · 이덕찬<sup>†</sup> · 조미영 · 최희정 · 김진우  
국립수산과학원 병리연구팀

### Mass Mortality Caused by Nocardial Infection in Cultured Snakehead, *Channa arga* in Korea

Myoung-Ae Park, Deok Chan Lee<sup>†</sup>, Mi Young Cho, Hee Jung Choi and Jin Woo Kim  
Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

A new disease causing mass mortality of farmed snakehead (*Channa arga*) has emerged in Korea over the summer of 2005. The affected fish showed no specific external signs with the exception of a distended abdomen and hemorrhaging around the anus. After opening the abdomen, the visceral organs, liver, spleen and kidney, present numerous white nodular structures. Histopathological examination revealed these nodules to be evidence of granulomas in the visceral organs. A Gram-positive, filamentous bacterium was isolated from all of the affected fish. Development of primers for a genus-specific PCR assay for *Nocardia*, following analysis of the sequences of the complete 16S rRNA genes from *Nocardia* spp. and non-*Nocardia* bacterial genes, allowed identification of the causative organism as *Nocardia*. This is the first report of a nocardial infection of fish in Korea.

*Key words* : *Nocardia* sp., Snakehead, *Channa arga*, Nodular, Granuloma, Nocardial infection

가물치(*Channa arga*)는 예로부터 피로회복 또는 산모의 보혈용으로 산후조리에 다려먹는 등 약용으로 취급되는 고소득 어종으로서 우리나라 김해지역의 서부 낙동강 유역을 중심으로 양식이 시작되어 이후 전국적으로 확대 분포되었으며 최근에는 경기도 지역에서도 활발히 양식이 이루어지고 있다 (장, 1993). 1990년대 초까지 연간 생산량이 1,000 여톤에 이르렀으나 최근에는 내수면 양식의 위축 및 다양한 질병의 발생으로 인해 Table 1.에서와 같이 생산량이 크게 감소하고 있는 추세이다.

*Nocardia* spp.는 인간, 개, 고양이, 소 및 염소 등의 질병으로부터 분리되었다 (Walton and Libake, 1974; Orchard, 1979). 이러한 숙주에서 분리된 균은 주로 *N. asteroides*로서 면역 활성이

저하된 개체에서 주로 발병하며 (Young *et al.*, 1971; Backwell munksgaard 2004, 2004), 사람에게서는 주로 기도를 통하여 흡입되어 폐렴, 폐농양, 농흉 등의 폐병변을 일으키며 심각할 경우에는 뇌농양이나 신농양 등의 전신성 nocardiosis를 일으킨다 (김 등, 1995).

어류의 Nocardiosis는 열대어에서 처음으로 감염 사례가 보고되었다 (Valdez and Conroy, 1963). 이 후 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss* (Snieszko *et al.*, 1964), 강송어, *Salvelinus fontinalis* (Campbell and MacKelvie, 1968), 방어, *Seriola quinqueradiata* (Kariya *et al.*, 1968; Kubota *et al.*, 1968), 대만 가물치, *Channa maculata* (Chen, 1992), 농어, *Lateolabrax japonicus* (Chen *et al.*, 2000) 및 부세, *Larimichthys crocea* (Wang *et al.*,

<sup>†</sup>Corresponding Author : Deok Chan Lee, Tel : 051-720-2487,  
Fax : 051-720-2498, E-mail : chanii-lee@hanmail.net

**Table 1.** Production of snakehead fish for the period 1990-2004 in Korea

(Unit: M/T)

	1990	1992	1994	1996	1998	2000	2002	2004
Total	955	910	822	632	642	230	299	302
Captured Products	508	413	264	165	122	14	8	24
Cultured Products	447	497	558	467	520	216	291	278

Statistical year book of maritime affairs and fisheries, 2004.

2005) 등의 어류에서 자연 감염 및 인위 감염에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 양식산 가물치에서 *Nocardia* sp.를 분리하고, 그 특성들을 최초 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 현장 조사 및 시료 채집

2005년 6월에 부산 근교의 가물치 양식장에서 폐사가 발생하여 현장 조사와 시료 채취를 통한 분석을 실시하였다. 현장 조사는 사육되는 가물치의 육안적 조사와 어업권자와의 대화를 통한 설문이 이루어졌으며, 현장에서 제공하는 다양한 크기의 가물치를 냉장 상태로 연구실로 운송하여 실험에 사용하였다.

### 병증 확인

외부 및 내부 증상을 확인하였으며, 병리조직학적 검사를 수행하였다. 병리조직학적 검사를 위하여 간, 비장, 신장, 심장 및 뇌조직을 10% 중성포르마린으로 고정하고 파라핀 절편을 제작하였다. 조직절편은 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였다.

### 항산성 염색

생체 내의 세균 검사를 위하여 장기 압인표본은 항산성 염색법 중 Kinyoun의 방법에 따라

실시하였다. 병든 가물치의 각 내부 장기를 절취하여 압인표본으로 제작하고 공기 건조하였다. 염색액인 basic fuchsin 4 g을 99% ethanol 20 ml에 혼합한 후 8% phenol 100 ml와 혼합한 Kynoun's carbol-fuchsin 용액을 압인표본에 충분히 올리고 3분간 염색하였다. 흐르는 물로 씻고 탈색액 (1% 황산용액)으로 염색액이 흘러나오지 않을 때까지 충분히 탈색하였다. 다시 물로 씻고 대조염색액 (0.3% methylene blue 용액)으로 2분간 염색한 후 공기 중에서 건조하고 봉입하여 현미경 (Axioskop2 plus, Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

### 병원체 배양 및 확인

원인 세균을 분리하기 위하여 병어의 폐양부위, 간, 비장, 신장 및 뇌 등 내부조직을 무균적으로 절취하여 brain heart infusion agar (BHIA, Difco), 3% Ogawa medium (아산제약) 및 Sheep blood agar (아산제약)에 도달한 후 각각 27°C 및 30°C에서 장기간 배양하여 colony의 생성 유무를 확인하였다.

### PCR amplification

순수 분리된 균주의 이화학적 및 병리조직학적 특성을 바탕으로 *Nocardia* sp.로 가동정 하고 이를 확인하기 위하여 16S rRNA의 partial sequencing을 실시하였다. Primer는 *Nocardia* spp.와 non-*Nocardia* spp.의 구분을 위하여 Laurent et

al. (1999)이 제시한 NG1 (5'-ACCGACCA-CAAGGGGG-3') 및 NG2 (5'-GGTTGTAAACC-TCTTCGA-3')를 사용하였다. Primers는 Bioneer (Korea)에 의뢰하여 합성하였으며 예상 증폭산물의 크기는 596 bp 였다. PCR에는 Accupower PCR premix (Bioneer)를 사용하였으며, 반응조건은 94°C predenaturation 5분, 95°C denaturation 1분, 55°C anealing 20초, 72°C extention 1분의 반응으로 30cycles을 증폭하였으며 마지막 72°C에서 5분간 extention을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel (in TBE buffer, 0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)을 사용하여 전기영동한 후 100 bp ladder (Takara)로 크기를 확인하였다. PCR 반응 산물은 AccuPrep™ PCR Purification Kit (Bioneer)를 사용하여 PCR product를 정제하고 AccuPrep™ PCR plsmid extraction kit (Bioneer)를 이용하여 plsmid DNA를 분리하였다. 염기 서열 결정은 (주)솔벤트에 의뢰하여 분석하고, 분리군의 염기 서열을 확인하기 위하여 N.C.B.I.의 Basic Local Alignment Search Tool을 사용하여 상동성을 비교하였다.

#### 약제감수성

분리군의 약제 감수성 시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)의 권장 사항인 standard laboratory method를 기준으로 하여 시험하였다. Mueller-Hinton agar (Difco)를 이용하였으며 20가지의 약제 disc를 사용하여 disc 확산법으로 시험하였다 (Table 2).

이때, 배양기 내에 CO<sub>2</sub>의 공급은 하지 않았다.

## 결 과

#### 가물치의 폐사 경과 현장 조사

2005년 6월에 가물치 폐사에 대한 보고가 있어 현장 조사와 시료 채취를 통한 분석을 실시하였다. 현장 조사에서 가물치 양식은 농지에 사육하는 지수식의 노지 양식이었으며, 수온은 20-30°C 사이였다. 주로 사용하는 사료는 중국에서 수입된 냉동사료 (주로, 까나리)이며 일부 국내 회사 제조의 배합사료를 사용하는 것으로 확인되었다. 또한 올해 사육중인 가물치의 폐사 정도는 각 양어가에 따라 다르지만 감염이 심한 양어지의 경우 약 50-60% 정도 또는 그 이상이 발생하는 것으로 조사되었다 (Table 2).

#### 외부 및 내부 증상

병든 가물치의 주요 외부 증상은 복부가 팽만하고 항문의 발적이 관찰되었다 (Fig. 1-A). 주요 내부 증상은 간, 비장 및 신장에 많은 결절이 확인되었으며 (Fig. 1-B&C), 간에 출혈이 나타났고 비장 조직과 신장의 비대가 관찰되었다. 조사한 어류의 대부분은 신장 (특히, 체신)의 비대와 이 부분에 집중적으로 결정 덩어리가 형성되는 것으로 파악되었으며, 신장의 비대는 오른쪽 부분에서 주로 나타나는 것으로 조사되었다 (Fig. 1).

**Table 2.** A report on proceedings of mortalities in cultured snakehead

Date (mm/yy)	Province	Farm Form	Water Temp. (°C)	Feed	Cumulative Mortality (%)
6/2005	Busan, Korea	Pond culture	20-30	Frozen fish (mainly, an import from china; mostly, sand lances) A part, commercial feed	50-60

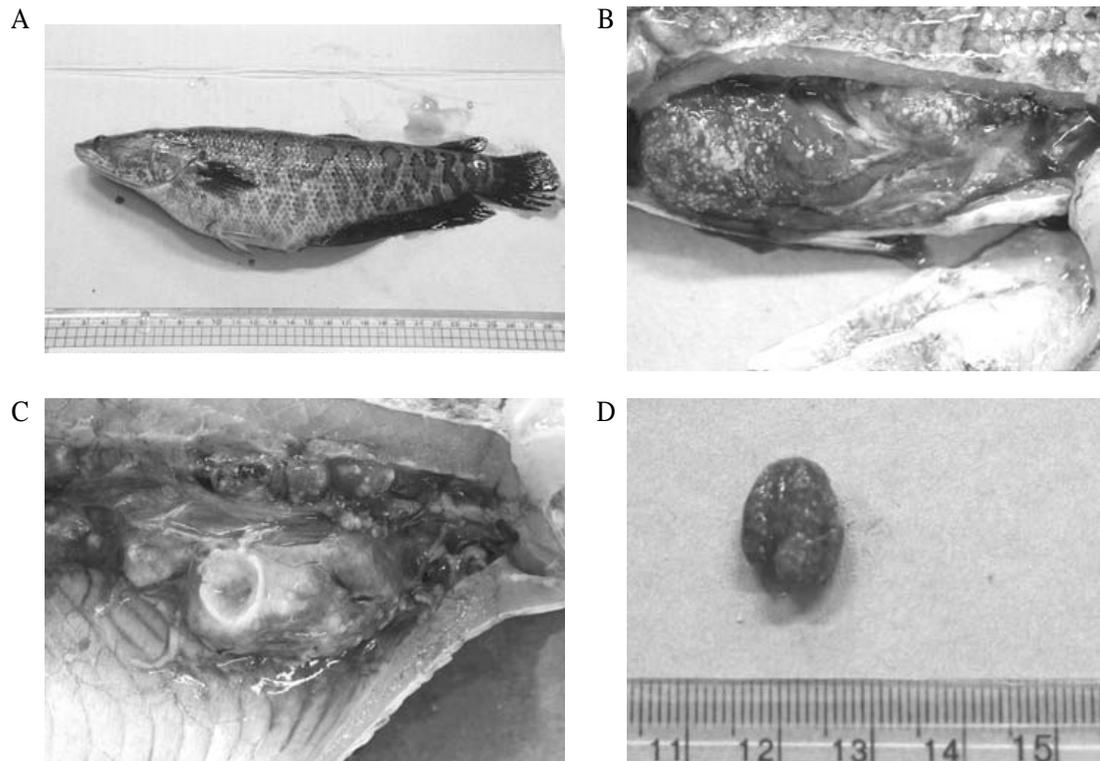


Fig. 1. External and Internal sign of the diseased snakehead. A, External signs, distended abdomen and hemorrhaging around anus are seen; B&C, Internal signs, many white nodules varying in size are seen in the internal organs; D, White nodules in the spleen.

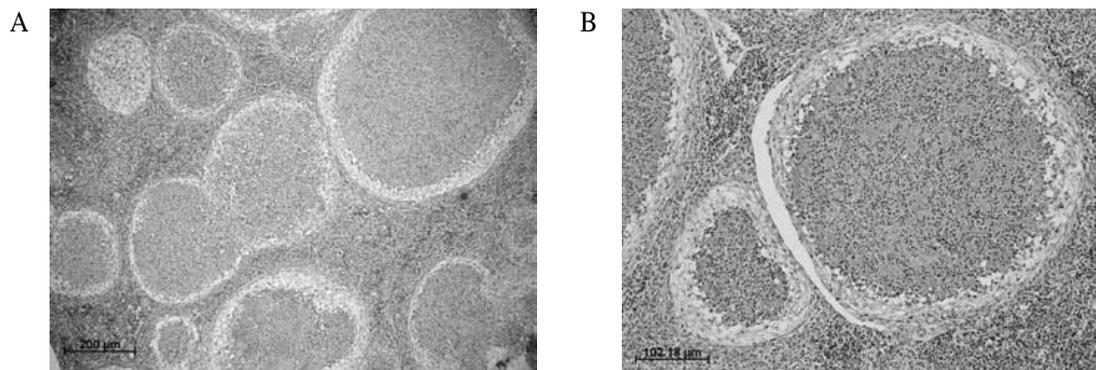


Fig. 2. Histopathological sign of nocardial infection in snakehead. Typical granuloma with marked central necrosis in the spleen (A; H&E,  $\times 100$ ) and kidney (B; H&E,  $\times 200$ ).

### 병리조직학적 증상

폐사가 발생하는 양식 가물치에 대한 병리조직학적 증상을 확인한 결과 감염어의 주요 내부 장기에 전형적인 육아종성 염증 반응이 확인되

었다 (Fig. 2). 관찰 장기 중 간, 비장, 신장 및 심장에서 결절이 확인되었으며, 결절의 중심에 세균의 식작용이 일어난 대식세포 집단과 괴사된 세포들의 덩어리를 섬유 결합 조직이 싸고 있는

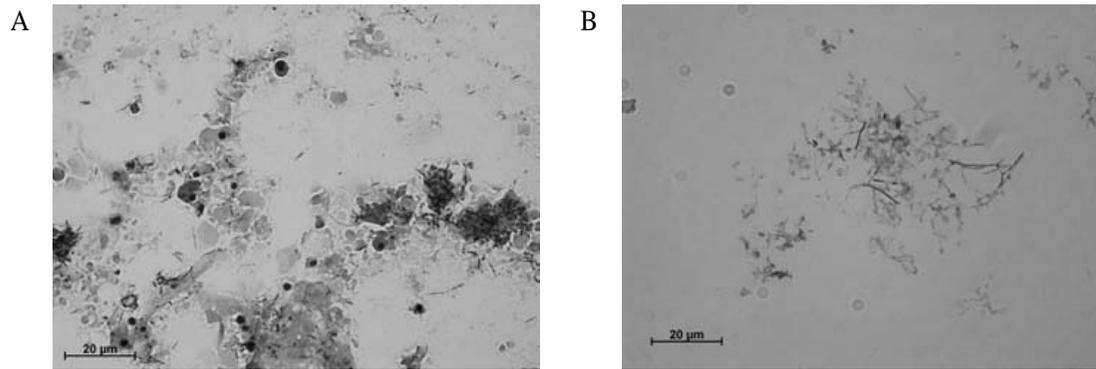


Fig. 3. Gram stain and acid-fast stain of *Nocardia* sp. A, Gram positive, branching and filamentous bacteria are seen in the specimens stained with Gram stain ( $\times 1,000$ ); B, Branched rods and fragmented mycelium in the specimens stained with Acid-fast stain ( $\times 1,000$ ).

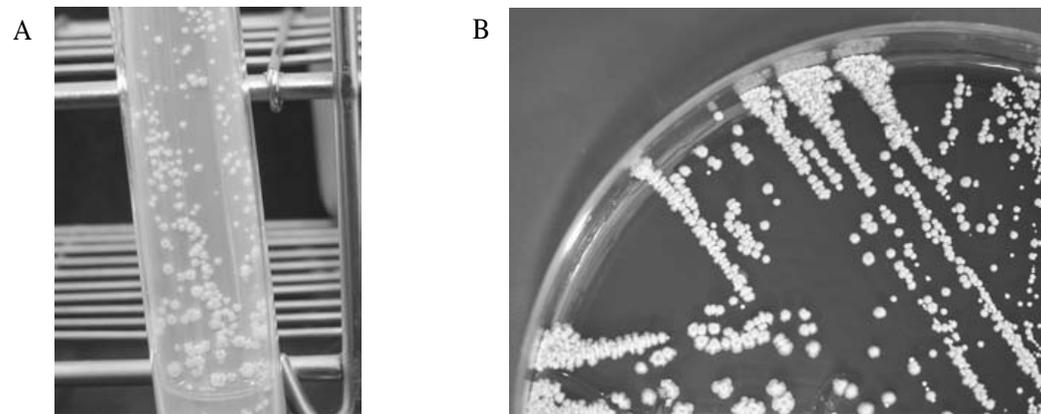


Fig. 4. Characteristics of *Nocardia* sp. A, Colonies on 3% Ogawa media (14 days old culture); B, Colonies on the sheep blood agar (30 days old culture).

것이 관찰되었다.

#### 압인표본 염색

병든 가물치를 해부하여 각 내부 장기를 적출하여 슬라이드 글라스에 압인표본으로 제작하고 Gram 염색한 결과는 Fig. 3-A와 같다. 그람 양성이며 균사상의 분지가 관찰되었다. 특히 crystal violet 색소가 세균의 세포벽 성분에 진하게 침착되는 것이 확인되었다.

또한 항산성 염색의 결과, 사상체 상의 균이 확인되었으며 적색으로 염색된 균체의 일부분에 대비 염색제인 methylene blue가 침착되는 것

이 확인되었다. 또한 이 균의 일부는 항산성 염색 양성도 나타나지만 일부에서는 음성도 나타나 섞여서 관찰되었다 (Fig. 3-B).

#### 분리균의 집락 형태

병든 가물치로부터 분리한 균을 여러 배지에 배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 3% Ogawa 배지에서 14일간 성장한 균은 노란색 colony를 형성하였다 (Fig. 4-A). 또한 면양혈액배지에서 배양할 경우 흰색의 집락을 형성하였으며 (Fig. 4-B), 장기간 배양할 경우 부분적으로 colony 덩어리를 형성하였다.

### PCR amplification

*Nocardia* spp.와 non-*Nocardia* 균의 complete DNA 염기 서열의 분석으로 차이나는 부위를 선택하여 제조한 primer를 이용하여 PCR assay를 한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. NG1 및 NG2 primers를 사용하여 colony PCR을 실시한 결과 596 bp의 fragment를 확인할 수 있었으며, 염기 서열 분석 결과 부세, *Larimichthys crocea* (Wang *et al.*, 2005)에 보고된 *Nocardia seriola*와 99% 일치하는 결과를 나타내었다.

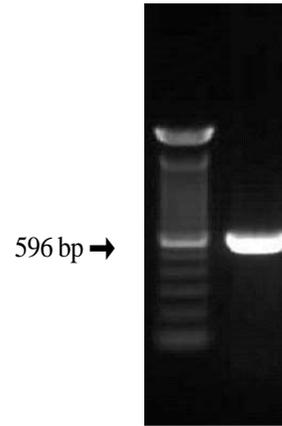


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of PCR product of *Nocardia* strain by using primers NG1 and NG2. Left lane, size marker; Light lane, DNA from cultured colony on BHI medium.

### 약제 감수성 시험

디스크확산법에 의한 약제 감수성 시험 결과

**Table 3.** Susceptibility of *Nocardia* sp. isolate to chemotherapeutants

Antimicrobial Agent	Clear Zone (diameter, mm)	Susceptibility
Amoxicillin	0	R
Ampicillin	0	R
Cephalothin	0	R
Chloramphenicol	38	S
Ciprofloxacin	30	S
Clindamycin	19	I
Doxycycline	24	S
Enrofloxacin	34	S
Erythromycin	32	S
Gentamicin	33	S
Kanamycin	26	S
Nalidixic acid	0	R
Nitrofurantoin	21	S
Norfloxacin	26	S
Novobiocin	0	R
Oxytetracycline	26	S
Penicillin	0	R
Streptomycin	22	S
Sulfisoxazole	0	R
Tetracycline	27	I

R, resistant; I, intermediate; S, susceptible.

는 Table 3에 나타내었다. 20 가지의 약제 중 7종의 약제 (Amoxicillin, Ampicillin, Cephalothin, Nalidixic acid, Novobiocin, Penicillin, Sulfisoxazole)에 대하여 저항성을 나타내며, 2종의 약제 (Tetracycline, Clindamycin)는 중간 정도의 감수성을 나타내었고 이외의 11종에 대해서는 감수성을 나타내었다.

## 고 찰

부산 소재 양어장에서 각 내부 장기에 결절을 형성하며 대량 폐사가 발생하는 가물치의 폐사 원인을 규명하고자 하였다. 폐사 당시의 가물치는 복부팽만과 항문 주위 출혈의 외부 증상을 보였으나 복강을 절개하여 내부 장기를 관찰하면 수많은 흰색 결절이 확인되었다. 특히 체신 부위의 결절이 크게 나타났으며 농의 형성이 심한 것으로 관찰되었는데 이는 대만의 snakehead에서의 증상 (Chinabut, 1999)과 유사한 것이었다. 또한 경감염 어류의 경우에도 신장과 비장에서의 결절이 많았다. 이러한 결과로 미루어 가물치의 대량 폐사는 신장과 비장의 문제에 의하여 초래되는 것으로 판단된다.

원인 규명을 위하여 생물체의 존재를 확인하였다. 즉 가물치에서 알려져 있는 virus와 관련된 유전적 정보를 바탕으로 PCR을 이용한 원인체 검출을 시도하였으며, 세균 배양과 기생충 검사를 병행하여 시험하였다. virus와 기생충의 검사에서, 검사 결과는 음성으로 확인되었으나, 세균 배양에서는 BHIA 배지 상에서 노란색의 소형 colony를 형성하는 세균이 검출되었다. 이 균은 그람 양성의 사상체 형태를 하고 있으며, 육안적으로 세균 집락의 관찰이 가능한 기간이 4-5일 정도로 어류에서 분리되는 보통의 Gram 양성 및 음성균에 비하여 성장 속도가 느린 것으로 확인되었다. 그리고 3% Ogawa 배지에 배양한 결과 노란색의 집락을 형성하며 성장할수록 집락에 주름이 관찰되었다.

조직병리학적 시험에서 가물치의 각 장기에

다수의 결절이 현미경 상에서 확인되었으며, 결절 내에 세균의 존재가 확인되었다. 이러한 결절의 형성으로 인하여 각 조직과 기관의 압박에 의한 생리 활동과 대사 활동의 장애가 발생하였을 것으로 판단된다. 만성적 결절 형성은 식욕부진 (anorexia), 쇠약 (emaciation) 및 복부팽만 (distension) 등이 나타나는 원인이 된다는 보고가 있다 (Kariya *et al.*, 1968; Chen, 1992; Chen *et al.*, 2000). 본 조사 및 연구에서도 이러한 증상이 확인되었으며, 장거리의 이동 후 폐사의 발생이 증가하는데 이는 결절 형성에 의한 영향으로 생각된다.

어류에 질병을 일으키는 세균 중 Gram 양성에 사상체이며 결절 병소를 생성하는 것으로는 대표적으로 *Mycobacterium* sp.와 *Nocardia* sp.가 있다. 이들 대부분의 감염 어류의 경우, 무기력하며 체표에 병소를 가지고 있고 Gram 및 항산성 염색에서 양성을 나타낸다. 그러나 mycobacteria는 사상체가 아니며, 가지상의 증식을 하지 않는다는 보고 등으로 미루어 (Ribelin and Migaki, 1975; 이 등, 1992), 본 연구에서 분리한 균은 *Nocardia* sp.로 판단되며, 더욱이 *Nocardia* spp.와 non-*Nocardia* 균이 가지는 염기 서열 중 차이가 나는 부위의 primer를 사용한 PCR 시험에서 596 bp의 생성물이 나타났다 (Laurent, 1999). 또한 이 PCR 생성물의 염기 서열 분석 결과 *Nocardia seriolae*와 99% 일치하는 결과를 확인할 수 있었다.

유효한 약제 사용을 위한 감수성 시험 결과, 다수의 약제가 효과적인 것으로 확인되었다. 그러나 Chinabut (1999)은 Nocardiosis에 대한 유효한 약제가 없다고 하였다. 이것은 아마도 *Nocardia*가 배지에서는 다양한 약제에 대하여 감수성을 보이지만 어류에 감염되어 결절이 형성하면, 이 결절의 외부에 섬유세포 등에 의한 막 (fibrous capsule)을 형성하므로 약제의 유효 농도가 결절 중앙의 세균에게 영향을 미치지 어렵다고 판단한 것으로 생각된다.

이러한 결과에 의하여 2005년 여름에 부산 근

교에서 발생한 가물치의 대량 폐사 원인체는 *Nocardia* sp.로 사료되며, 이는 국내의 어류 질병과 관련한 nocardiosis에 대한 첫 보고 사례이다. 이후의 연구는 분리 균주의 가물치에 대한 병원성 검증 시험이 우선되어야 할 것이다. 또한 *Nocardia* 속 내의 정확한 종 (genus)의 규명이 필요하며, 특히 인수 공통 감염의 가능성에 대한 검사가 필요할 것으로 사료된다.

### 요 약

2005년 여름에 국내에서 사육되는 가물치에서 대량폐사를 수반하는 새로운 질병이 발견되었다. 감염 어류는 복부팽만과 항문 주위 출혈 이외의 특이한 외부 증상을 나타내지 않았으나 복부를 절개하면 많은 수의 백색 결절이 간, 비장 및 신장을 포함한 내부 장기에서 관찰되었다. 특히 내부 장기의 조직병리학적 관찰에서 granuloma가 관찰되었다. 이들 감염 어류에서 Gram 양성의 사상균이 분리되었다. 분리균은 *Nocardia* spp.와 non-*Nocardia* 균의 16S rRNA 염기 분석에 기초한 *Nocardia* 특이 primer를 사용한 PCR 방법으로 확인하였다. 이것은 어류에서 발생한 *Nocardia* 감염증의 국내 첫 사례이다.

### 감사의 글

본 연구는 국립수산과학원(양식생물 질병 모니터링 및 역학연구, RP-2005-AQ-024)의 지원에 의해 운영되었습니다.

### 참 고 문 헌

- Blackwell munksgaard 2004: *Nocardia* infection. In American journal of transplantation 2004, 4: pp. 47-50, 2004.
- Campbell, G. and MacKelvie, R. M.: Infection of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by nocardiae. J. Fish Res. Board Can., 25: 423-525, 1968.
- Chen, S.C.: Study on the pathogenicity of *Nocardia asteroides* to the Formosa snakehead, *Channa maculata* (Lacepède), and largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepède). J. Fish Dis., 15: 47-53, 1992.
- Chen, S. C., Lee, J. L., Lai, C. C., Gu, Y. M., Wang, C. T., Chang, H. Y. and Tsai, K. H.: Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan. J. Fish Dis., 23: 299-307, 2000.
- Kariya, T., Kubota, S., Nakamura, Y. and Kira, K.: Nocardial infection in cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata* and *S. Purpurascens*) I. Bacteriological study. Fish Pathol., 3: 16-23, 1968.
- Laurent, F. J., Provost, F. and Boiron P.: Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J. Clin. Microbiol., 37: 99-102, 1999.
- Orchard, V. A.: Nocardial infections of animals in New Zealand, 1976-1978. New Zealand Vet. J., 27: 159-165, 1979.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Dunbar, C. E. and Pettijohn, L. L.: Nocardial infection in hatchery-reared fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Bacteriol., 88: 1809-1810, 1964.
- Valdez, I. E. and Conroy, D. A.: The study of a tuberculosis-like condition in Neon tetras (*Hyphessobrycon innessi*). II. Characteristics of the bacterium isolated. Microbiologia Espanola, 16: 249-253, 1963.
- Wang, G. L., Yuan S. P. and Jin, S.: Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson). J. Fish Dis., 28: 339-345, 2005.
- Walton A. M. and Libake, K. G.: Nocardiosis in animals. Vet. Med. Small Anim. Clinic, 69: 1105-1107, 1974.

Chinabut, S.: Mycobacteriosis and nocardiosis. In Fish diseases and disorders, Viral, bacterial and fungal infection (eds. by Woo, P.T.K. and D.W. Buruno), CABI Publishing, 3: 319-340, 1999.

Young, L. S., Armstrong, D., Belevins A. and Lieberman, P.: *Nocardia asteroides* infection complicating neoplastic disease. Am. J. Med., 50: 356-367, 1971.

김승곤, 김충환, 김태운, 이건설, 정경석: 최신병원

미생물학. 고문사, 1995.

이덕찬, 김도형, 박수일: 어류에 발생하는 *Mycobacterium* 속 세균성 질병에 대하여. 한국어병학회지, 14: 107-128, 2001.

장계남: 담수어 양식. pp. 107-146, 오성출판사, 1993.

---

Manuscript Received : June 16, 2005

Revision Accepted : July 30, 2005

Responsible Editorial Member : Jung-Woo Park  
(Ulsan Univ.)