한국어병학회지 제 18 권 제 2 호 (2005)
J. Fish Pathol., 18(2) : 167 ~ 178 (2005)

*Streptococcus iniae*의 형태학적 특성과 병원성

김현정 · 우승호 · 김진우* · 박수일†
부경대학교 수산생명의학과, *국립수산과학원 병리연구팀

Morphological Characteristics and Pathogenicity of *Streptococcus iniae*

Hyun Jeong Kim, Sung Ho Woo, Jin Woo Kim* and Soo Il Park†
Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
**Pathology Division, NFRDI, 619-900, Korea*

Streptococcus iniae is one of the major bacterial pathogens of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. This study was carried out to investigate the interaction between morphological characteristics and immune response such as phagocytosis and serum killing activity. They were differentiated phenotypically into two groups, the viscous colonies and the non-viscous colonies, 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-stained cells, while the exopolysaccharide material was absent around the non-viscous form of *S. iniae*. The viscous type strains were disclosed more virulent than those of non-viscous type for olive flounder. The viscous strains were resistant to normal serum killing activity, while the non-viscous strains were susceptible to bactericidal activity of normal serum from olive flounder. The viscous strains were more resistant to opsonophagocytosis and decreased the chemiluminescence response of head kidney macrophages of olive flounder. All of the tested non-viscous *S. iniae* strains were efficiently destroyed by the macrophage after phagocytosis. Both the viscous and the non-viscous strains invaded and replicated in cultured fish cell line (CHSE-214). This cellular invasion may contribute to the pathogenesis of invasive *S. iniae* infection.

Key words : *Streptococcus iniae*, *Paralichthys olivaceus*, Capsule, Pathogenicity, Immune response

*Streptococcus iniae*는 우리 나라를 포함한 미국, 이스라엘, 오스트레일리아, 일본 등지의 담수 및 해수 양식에 막대한 경제적 손실을 입히는 연쇄구균병의 원인체이다 (Berridge *et al*., 1998). *S. 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*, 방어, *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; Ohnish and Jo, 1981; Ugajin, 1981; Kawahara and Kusuda, 1987; Sakai *et al*., 1989; Zlotkin *et al*., 1998; Bromage *et al*., 1999; Eldar and Ghittino, 1999; Eldar *et al*., 1999). 우리 나라에서 주요 양식 어종인 넙치의 연쇄 구균병의 원인체는 *S. iniae*가 대부분을 차지하며, 지역적

†Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-620-6141, Fax : 051-628-7430, E-mail : parksi@pknu.ac.kr

으로도 넙치가 주요 양식 어종인 제주 지역에서 우점적으로 분리되는 연쇄 구균병의 원인체 중 대부분이 *S. iniae*와 관련이 있을 것으로 추정되고 있다.

현재까지 포유류에서 질병을 일으키는 streptococcal 병원체과 마찬가지로 *S. iniae*와 질병의 임상 및 병리학적 증상이 유사한 *Lactococcus garvieae*의 경우 (Eldar and Ghittino, 1999), 병원성 요인으로 capsule을 가지는 것이 확인되었으며 이는 균체의 항원 특성과도 관련이 있다 (Yoshida *et al*., 1996a, b; Ooyama *et al*., 1999). 이러한 capsules은 capsules이 없는 KG+ phenotype 항혈청과의 응집을 억제하고, 방어의 전신 phagocytes가 opsonophagocytosis하는데 있어서 저항성을 가지게 하는 것과 관련이 있을 것으로 추측되고 있다 (Yoshida *et al*., 1996a, b, 1997a, b). 또한, 교차 응집 반응 시험 결과를 통해 KG- phenotype의 capsule이 KG+ 응집 항체에 대한 binding site를 cover하고 있으며, KG- phenotype 세포를 이물질로서 인식하는데 capsule이 방해를 하는 것으로 생각되고 있다 (Alim *et al*., 1996; Ooyama *et al*., 1999). 그러나 현재까지 우리 나라에서 S. iniae에 의한 질병의 발생 빈도나 양식물에 대한 피해가 큰 것으로 알려져 있지만, 병원체에 대한 연구는 아직 미흡하며, 그 중에서도 질병 메카니즘을 파악하는데 중요한 요소인 분리 균주간의 특성과 병원성에 대한 연구는 거의 찾아 보기가 힘든 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 우리 나라의 대표적 해수 양식 대상 어종인 넙치 및 조피볼락에서 분리된 *S. iniae* 균주의 형태학적 특성과 병원성과의 관계를 밝히고 *S. iniae*의 병원성과 관련되는 기초적인 자료를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

세균의 분리 및 생화학적 성상 검사

본 연구에 사용된 균주들은 40～800 g의 넙치, *Paralichthys olivaceus*와 200 g 전후의 조피볼락, *Sebastes schlegeli*에서 연쇄구균병의 증상이 전형적으로 관찰되는 안구 주위의 농양, 복수, 뇌, 간, 비장, 신장 및 심장 등에서 분리하였다. 표준 균주로는 *Streptococcus parauberis*, KCTC 3651, *Streptococcus iniae*, KCTC 3657 및 *Lactococcus garvieae*, ATCC 49156를 사용하였다 (Table 1). 생화학적 성상 시험은 시험 균주를 1.5% NaCl 첨가 BHIA 배지에서 25℃, 48시간 배양한 다음 MacFaddin (2000)의 방법에 따라 수행하였다.

TEM을 이용한 capsule 관찰

시료의 준비 과정은 Barnes *et al*. (2003)의 방법을 변형하여 행하였다. 각 균주를 1.5% NaCl 첨가 BHIB에 접종하여 25℃, 24시간 배양한 후 3,000 g, 10분간 원심 분리한 다음 phosphate-buffered saline (PBS: 0.2M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2M Na_2HPO_4)으로 세척하고 Macfarland 2의 탁도로 시험균을 현탁하였다. 균 현탁액은 각 균주에 대한 항혈청을 10배 희석이 되도록 첨가한 후 4℃, overnight 반응시킨 다음 3,000 g로 10분간 원심 분리하여 집균한 후 PBS로 두 번 세척하였다. pellet은 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2, 4℃)에 24시간 전고정하고 3번 세척한 다음 PBS에 재현탁하여 polycationic ferritin (Sigma)을 최종 농도가 1 mg ml^{-1}이 되도록 첨가한 후 20℃, 30분간 반응시켰다. 1% osmium tetroxide (pH 7.2)로 4℃, 2시간 동안 고정한 후 Alcohol 탈수 과정을 거쳐 propylene oxide로 치환한 다음 Epon 혼합물로 열중합 처리를 한 후 ultrathin section (60～90 ㎚)하였다. 이러한 과정을 거쳐 제작한 미세 절편을 grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 TEM (JEM 1200-Ⅱ, JEOL)으로 관찰하였다.

시험 균주의 넙치 혈청에 대한 저항성 시험

실험에 사용한 혈청은 전장 25～30 cm, 전중 140～150 g인 넙치를 아미노안식향산에틸 50 ppm으로 마취시킨 후 미부 정맥에서 채혈한 다

Table 1. Tested strains used in this study

Strain			Origin	
Reference strains(n=3)	*Streptococcus parauberis*	KCTC 3651	mastis sample milk	Williams & Collins, 1990
	Streptococcus iniae	KCTC 3657	Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*	USA, 1972
	Lactococcus garvieae	ATCC 49156	Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*	Japan, 1974
Present isolated strains(n=7)	KS 1		Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*	Tongyoung, 1998
	KS 2		Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*	Tongyoung, 1998
	KS 3		Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*	Jeju, 1999
	KS 4		Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*	Jeju, 1998
	KS 5		Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*	Jeju, 1999
	KS 6		Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*	Jeju, 1999
	KS 7		Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*	Jeju, 1999

음 상온에서 1시간 방치하고, 4℃, 3시간 정치한 후 8,000 g, 5분간 원심 분리하여 신선 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청을 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. 각 균주와 신선 혈청은 1 : 4의 비율로 혼합한 다음 20℃로 유지된 shaking incubator에서 진탕 배양하며 0, 1, 3, 6 및 12시간 경과할 때마다 반응액을 취하여 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 colony의 수를 계수하였다.

시험 균주의 식균율과 식균 지수의 측정

식균능의 실험에는 넙치의 whole blood를 사용하였으며 넙치의 미부 정맥으로부터 헤파린(Sigma)이 처리된 주사기로 어체당 0.5 ㎖씩 채혈하였다. 채혈한 혈액은 실리콘 처리한 시험관에 넣고, 상기와 같은 방법으로 처리 한 시험 균을 100 ㎎ ㎖$^{-1}$로 현탁한 다음 각 시험 균액 30 ㎕를 첨가하였다. 20℃로 유지된 shaking incubator에서 3시간 동안 반응시킨 후 시료를 취하여 slide glass에 도말한 다음 May-Grunwald Giemsa 염색법으로 염색하고 검경하였다. 식세포에 대한 식균율과 식균지수는 아래 식을 이용하여 구하였다.

식균율 (%) = [식균 작용한 식세포의 수 / 관찰한 식세포의 수] × 100

식균지수 = 식균한 식세포 내의 총 식균수 / 식균 작용한 식세포의 수

넙치 두신 macrophages에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정

1. 식균 시험용 넙치 두신 macrophages의 준비

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 (Gibco) 및 0.2% 헤파린이 함유된 L-15 배지 (Sigma) 2 ㎖씩 분주한 소형 disposable petridish에서 으깬 뒤 40 ㎛의 nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 실리콘 처리한 시험관에 미리 분주해둔 34%와 51% percoll 중층 용액 위에 조심스럽게 중층시킨 다음 500 g, 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구를 0.1% L-15 배지로 2회 세척한 다음 0.1% tryphan blue로 viability를 관찰한 후, 1×10^5 cells ㎖$^{-1}$로 조정하였다.

2. 생균 시험균 및 감작 생균 시험균 제작

시험균은 1.5% NaCl 첨가 BHIB 5 ㎖에 25℃, 24시간 배양한 생균을 대상으로 하였으며, 이를 원심 분리하고 PBS로 3회 세척한 것을 사용하였다. 감작 시험균은 시험균 습중량 0.01 g에 넙치 신선 혈청 500 ㎕를 첨가하여 25℃, 30분간 진탕 배양 후 원심 분리하고 PBS로 1회 세척하는 방법으로 제작하였다.

3. Chemiluminescence(CL) response

1×10^5 cell ㎖$^{-1}$로 조정된 macrophages를 96 well plate에 100 ㎕씩 분주한 후 실험에 사용하였으며, luminol (Sigma)은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 준비하였다. 100 ㎕의 세포액에 100 ㎕의 luminol working solution을 넣은 후 10분간 반응시킨 다음 준비한 생균 시험균과 감작 생균 시험균을 각각 50 ㎕씩 첨가하였고, 대조구에는 zymosan 첨가 Hank's balanced salt solution을 50 ㎕씩 첨가하여 Lumicount (Packard, England)로 측정하였다. 측정 시간은 50분간이었으며 각 시료에 대한 peak 값을 구하였다.

넙치 두신 macrophages의 bactericidal activity에 대한 저항성 시험

96 well plate에 부착된 macrophage monolayer에 생균 시험균을 1×10^5 cells well^{-1}로 접종한 다음 plate를 150 g, 5분간 원심 분리하여 25℃에서 0시간과 5시간 동안 배양하였다. 배양 후 상징액을 제거하고, 차가운 0.2% tween 20을 함유한 멸균 증류수 50 ㎕를 첨가하여 macrophage를 파괴하였다. 여기에 BHIB 100 ㎕를 첨가하여 25℃, 18시간 시험균을 증식시킨 후 5 ㎎ ㎖$^{-1}$ 농도로 준비된 MTT 염색액 10 ㎕를 첨가하여 가볍게 흔들어 주었으며, 15분 후 microplate reader (Packard, England)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. Macrophages내에서의 세균 생존능은 0시간째에 대한 5시간째를 백분율로 나타내었다.

어류 주화 세포에 대한 균주별 invasion activity 시험

각각의 균주가 어류 주화 세포에 침입할 수 있는지 여부를 확인하기 위한 실험은 Tang *et al*. (1993)의 방법을 따랐다. 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 배양하였다. 실험을 시작하기 2시간 전에 배지를 제거한 후 항생제가 첨가되지 않은 새로운 배지로 교체하였다. 실험에 사용된 균주는 1.5% NaCl 첨가 BHIB에서 25℃, 24시간 배양한 후 PBS로 3회 세척한 다음 EMEM 배지에 각각 현탁하여 파장 540 nm에서 흡광도 값이 0.6이 되도록 농도를 조정하였다. 각 균액은 단층 배양된 세포에 1 ㎖씩 첨가한 후 25℃, 1시간 배양한 다음 배지를 제거하였다. 세포 바깥에 존재하는 세균을 없애기 위하여 100 ㎍ ㎖$^{-1}$ gentamicin을 첨가하여 1시간 동안

반응시킨 후 2회 세척하고 0, 1 및 3시간별로 반응시킨 다음 1% Triton X-100을 첨가하여 5분간 세포를 파괴시켰다. 상징액은 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 colony 수를 계산하였으며, 어류주화세포에 대한 Invasion activity는 아래와 같은 식으로 계산하였다.

Invasion (%) = (Bacteria surviving gentamicin treatment / Bacteria added to cell monolayer) × 100.

병원성 시험

병원성 시험에는 평균 전장 11～12.5 ㎝, 전중 9～11 g의 건강한 넙치를 포항 인근의 양식장에서 분양받아 실험실의 300 L 사육 수조에서 10일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. colony의 형태와 capsule 유무를 기초로 하여 7개의 시험균주와 3개의 표준 균주에 대한 병원성의 유무와 그 정도를 조사하기 위하여 연속 3회에 걸쳐 어체 통과 시킨 각각의 균주들을 사용하여 넙치에 대한 공격 실험을 시행하였다.

공격 시험에 사용한 균액은 1.5% NaCl 첨가 BHIA에 24시간 배양한 후 각각의 균주를 멸균 생리 식염수로 1×10^5 cfu ml^{-1}이 되도록 조정한 후 넙치 한 마리당 0.1 ㎖씩 복강 주사하였다. 사육 수온은 22 ± 0.5℃로 유지시켰으며 2주 동안의 누적 폐사율을 기록하였다. 각각의 균주별로 10마리씩 실험하여 누적 폐사율로 병원성을 평가하였다. 대조구에는 동일 조건하에서 멸균 생리 식염수를 0.1 ㎖씩 복강 주사하였다.

통계학적 분석

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

결 과

세균의 형태학적 및 생화학적 특성

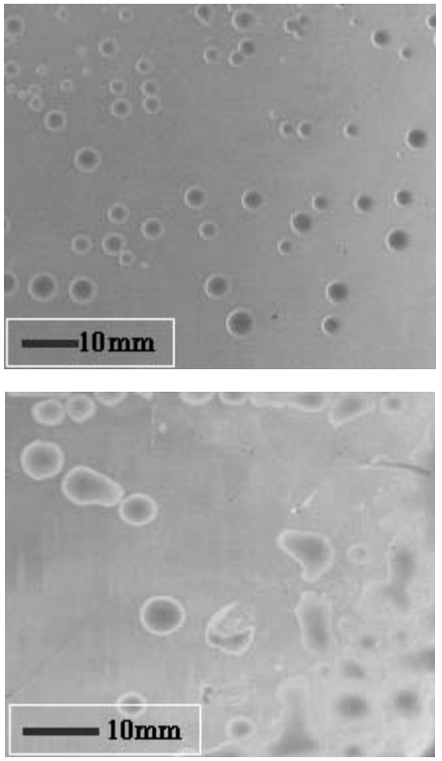

Fig. 1. The colony shape of the isolated *Streptococcus iniae* on the 1.5% NaCl added BHIA after 25℃, 48 hr culturing. a) non-viscous type, b) viscous type.

병어에서 분리된 모든 균주는 1.5% NaCl 첨가 TSA와 BHIA 배지상에서 colony의 크기가 1～3 mm이었고, 그램 양성의 연쇄상 구균으로 관찰되었다. colony의 형태는 Fig. 1과 같이 non-viscous form과 viscous form으로 구분되었고, 시험균 중 KS1, KS2 및 KS3 균주가 viscous form이었으며, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주가 non-viscous form 인 것으로 확인되었고, colony type에 따라 chain당 cell의 수에 차이를 보였다 (Table 2).

시험 균주와 표준 균주에 대한 배양 조건별 발육 시험과 생화학적 특성을 비교한 결과, 각 균주간의 생화학적 성상은 유사하였으며, arginine dihydrolase (AD) 반응성과 starch hydrolysis에서 차이를 나타내었다. KCTC 3657, KS1, KS2, KS3, KS4 균주는 AD 반응성과 starch hydrolysis가 positive이었으나 KS5, KS6, KS7 균주는 AD

Table 2. Morphological characteristics of colony

Strains	Morphology of colony	Cells[1] per chain	Arginine dihydrolase	Starch hydrolysis
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 cells which composed one bacterial chain was determined by microscopic observation of smear preparation of the bacterial suspension on slide glasses; [2], Non-viscous [3], Viscous.

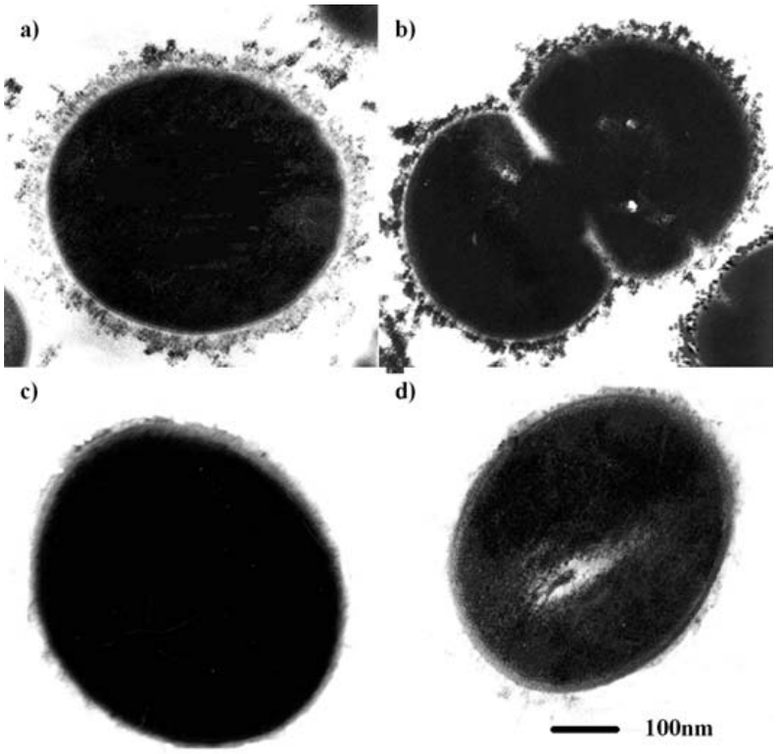

Fig. 2. Transmission electron micrograph of a) ferritin-labelled *Streptococcus iniae* strain KS1, b) KS2, c) KS5 and d) *Lactococcus garvieae* (capsule-negative control). Magnification ×50,000.

반응성과 starch hydrolysis가 negative인 것으로 확인되었다 (Table 2).

TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰

시험 균주 중 viscous form에서 세균 세포의 표면에 뚜렷한 capsule층이 관찰되었으나, non-viscous form의 균주와 표준 균주인 KCTC 3657 및 negative control로서 사용한 ATCC 49156, *L. garvieae*의 세균 세포 표면에는 별다른 구조물이 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

시험균의 넙치 혈청에 대한 저항성

S. iniae 균주의 넙치 혈청에서 시간별 균수 변화를 측정한 결과 KS1, KS2 및 KS3은 넙치 신선 혈청에서 3시간 이후로 급격히 균수가 증가하였다. 그에 비하여 KCTC 3657과 KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주는 넙치 신선 혈청에서 1시간 반응에서부터 균수가 감소하기 시작하여 12시간째까지 지속되었다 (Fig. 3).

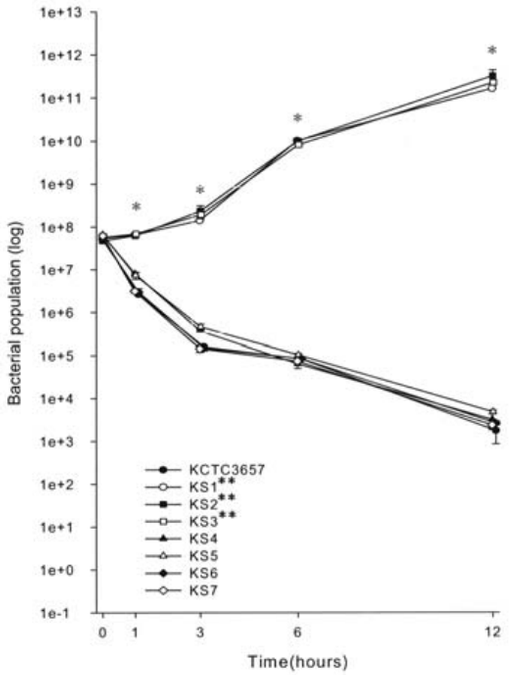

Fig. 3. Survival of various *Streptococcus iniae* strains in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.
*significant differences among reference and other strains; P<0.01.
**capsule positive strain

Whole blood에서의 균주별 식균율과 식균 지수

KCTC 3657, KS4, KS5, KS6 및 KS7 균주는 KS1, KS2 및 KS3 균주에 비해 유의적으로 높은 식균율을 나타내었다 (Fig. 4). 식균율의 결과와 함께 KS1, KS2 및 KS3 균주의 경우 다른 균주들에 비해 식균 지수가 유의적으로 낮게 나타났다 (Fig. 5).

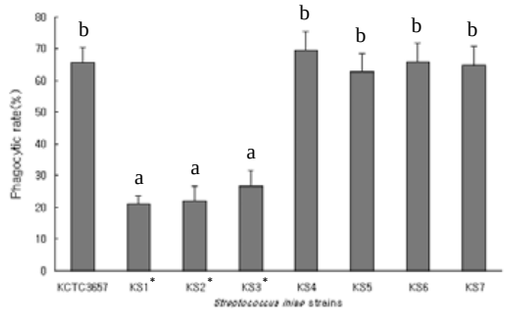

Fig. 4. The phagocytic rate of leukocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to *Streptococcus iniae* strains for 3 hr incubation.
Significantly difference between a and b (P<0.01).
*capsule positive strain

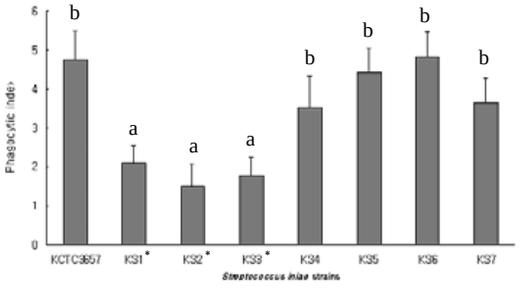

Fig. 5. The phagocytic index of leukocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to *Streptococcus iniae* strains for 3 hr incubation.
a and b; significant difference (P<0.05).
*capsule positive strain

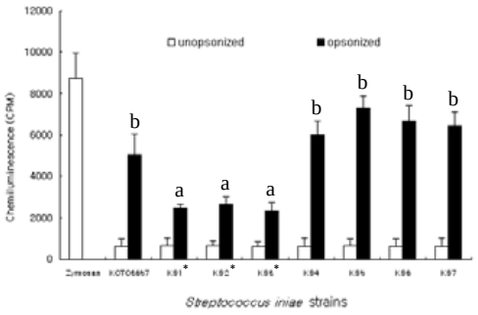

Fig. 6. Peak chemiluminescence of head kidney macrophages of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to opsonized or nonopsonized *Streptococcus iniae* strains for 30 min incubation.
a and b; significant difference (P<0.01).
*capsule positive strain

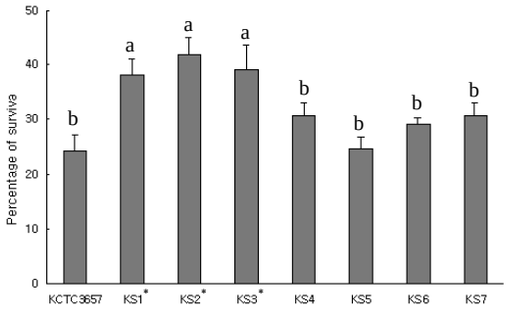

Fig. 7. Survival rate of various *Streptococcus iniae* strains incubated with olive flounder, *Paralichthys olivaceus* head kidney macrophages for 5 hr incubation.
a and b; significant difference (P<0.01)
*capsule positive strain

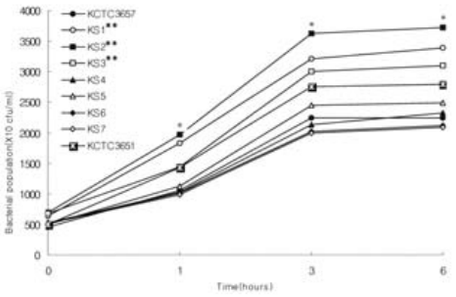

Fig. 8. Invasion activity of various *Streptococcus iniae* strains into CHSE-214 cell line.
*significant difference between viscous and non-viscous strains ; P<0.01.
**capsule positive strain

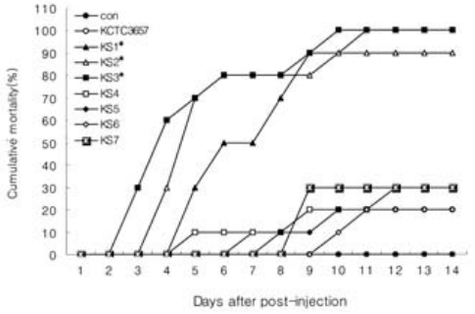

Fig 9. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, after intraperitoneal injection with the tested strains, *Streptococcus iniae*, and reference strains, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* and *Lactococcus garvieae*. The tested groups were challenged with 0.1 ㎖ of 1×10^5 cfu ㎖$^{-1}$ of bacterial cells. The control group was injected with 0.1 ㎖ saline fish^{-1}.
*capsule positive strain

넙치 두신 macrophages의 균주별 CL response

신선 혈청으로 감작하지 않았을 경우에는 zymosan을 사용한 대조구에 비해 모든 균주에서 유의적으로 활성이 낮은 것으로 나타났지만, 균주간에 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 (Fig. 6).

넙치 두신 macrophages에서의 균주별 생존능

모든 균주에서 5시간 동안 반응시킨 후의 균수가 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. 7).

어류 주화 세포에 대한 각 균주의 invasion activity

모든 균주가 CHSE-214 cell line 내로 어느 정도 invasion할 수 있었으며, 각 균주간에 유의적인 차이는 없었다. 모든 균주는 CHSE-214 cell line 내에서 3시간까지는 지속적으로 증식하다가 이후로는 더 이상 증식이 이루어지지 않았다 (Fig. 8).

병원성

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 표준 균주는 10～40%로 상대적으로 낮은 폐사율을 나타내었다 (Fig. 9).

고 찰

본 연구에서는 넙치에서 분리된 *Streptococcus iniae*의 형태학적 특성에 따른 병원성의 차이와 다른 세균에서 일반적으로 알려진 여러 가지 병원성 요인을 함께 평가하여 *S. iniae*의 병원성과 관련되는 기초적인 자료를 확립하고자 하였다.

본 연구에서 분리된 *S. iniae* 균주들 중 viscous colony type의 균주는 기존에 분리 보고되던 연쇄구균의 colony 형태와 많은 차이를 보였으며, non-viscous colony type의 균주들과 비교하여 chain 당 cell의 수가 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 form이고 capsule을 가지고 있는 β-hemolytic *Streptococcus* spp. (Yoshida *et al*., 1996b)와 유사하였다. 다른 점이 있다면 무지개송어에서 분리된 균주는 5회 이상의 계대 배양을 통해 colony의 형태가 점성이 없는 작고 흰 colony로 변화하였으나, 본 연구에서 분리된 균주는 10회 이상의 계대 배양에도 동일한 viscous form으로 유지되었다.

Bachrach *et al*. (2001)은 *S. iniae*에서 추출한 carbohydrate antigen extracts를 항혈청과 반응시켰을 때 면역 침강 반응의 pattern 변화를 확인하여 polysaccharide capsule이 존재할 가능성이 있음을 보고하였다. 본 연구에서 TEM을 통하여 cell wall 표면의 capsule 유무를 관찰한 결과 viscous form에서는 capsule이 확인되었으나 표준 균주와 non-viscous form에서는 capsule을 확인할 수 없었다. 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). 그러나, non-viscous forms과 viscous forms 사이의 형태학적 차이가 capsule의 유무에 의한 것인지는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 capsule을 가지는 *S. iniae* 균주가 capsule을 가지지 않는 균주에 비해 serum killing에 저항성을 나타내며 이 capsule이 *S. iniae* 균주의 병원성에 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 *S. iniae* 균주 중 capsule을 가지는 균주의 경우 신선 혈청으로 감작한 경우에도 macrophage에 의한 식작용을 회피할 수 있으므로 macrophage내로 세균이 internalization되는 비율도 capsule을 가지지 않는 균주보다 훨씬 낮은 것으로 확인되었다. 따라서, 위와 같은 사실들은 *S. iniae* 균주가 macrophage의 식작용 및 CL response와 같은 살균 작용에 저항성을 보이는 것이 아니라 capsule을 가짐으로써 식작용을 회피하는 능력을 가지고 있으며 이것이 병원성을 나타내는 주요한 요인으로 작용할 수 있음을 알 수 있었다.

GAS (group A streptococci), GBS (group B

streptococci), *S. pneumoniae* 및 *S. suis*와 같은 많은 streptococcal 병원체의 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 숙주 방어 기작에 대한 저항성을 나타내게 하거나 세포 보호 장벽를 손상시켜 전신 감염을 용이하게 한다. 그램 음성 세균 중에서 *P. damselae* subsp. *piscicida*의 경우 EPC (epithelioma papilosum carpio) cell lines에 부착하고 침입을 할 수 있었으며, 최대 6~9 시간까지 세포 내에 생존해 있는 것으로 확인되었고 (Lopez-Doriga *et al*., 2000), non-phagocytic cells내에서 생존하면서 macrophage respiratory burst에 의한 oxidative attack과 같은 숙주의 방어 기작이나 항생제의 영향을 피할 수 있을 것으로 보인다(Magarinos *et al*., 1996; Yoshida *et al*., 1997b; Barnes *et al*., 1999). 본 연구에서, *S. iniae*의 시험 균주 모두 CHSE-214 cell line내로 invasion할 수 있었으며 세포 내에서 어느 정도 증식할 수 있는 것으로 확인되었다. 이것은 *S. iniae*가 숙주의 방어 기작을 피하기 위하여 non-phagocytic cell내로 침입하는 것으로 보이며 세포 내에서 증식할 수 있는 것은 *S. iniae*가 주위 세포나 조직으로 감염이 확산될 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 *S. 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 특성으로는 숙주의 방어 기작에 대한 저항성이나 병원성 차이를 구분할 수 없었으나 형태학적으로 큰 차이를 있음을 알 수 있었다. 즉, V+인 경우 cell wall 표면에 capsule이 존재하지만 V-에서는 capsule이 존재하지 않는 것으로 확인되었다. V+는 넙치 혈청에서 증식할 수 있지만 V-는 넙치 혈청에 의해 살균되는 것으로 나타나 capsule의 유무에 따라 넙치의 체액성 면역 요소에 대한 저항력에서 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 또한, V+는 넙치 신선 혈청으로 감작한 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. 이들 결과는 앞으로의 백신 개발에 유용한 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구의 일부는 국립수산과학원의 연구지원사업에 의해 수행되었음을 밝힙니다.

참 고 문 헌

Alim, A. R., Kawai, K. and Kusuda, R.: Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. J. Fish Dis., 19: 39-46, 1996.

Bachrach, G., Zlotkin, A., Hurvitz, A., Evans, D. L. and Eldar, A.: Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Sterptococcus* vaccine. Infect. Immun., 67: 3756-3758, 2001.

Barnes, A. C., Young, F. M., Horne, M. T. and Ellis, A. E.: *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Dis. Aquat. Org., 53: 241-247, 2003.

Barnes, A. C., Balebona, M. C., Horne, M. T. and Ellis, A. E.: Superoxide dismutase and

catalse in *Photobacterium damselae* subsp. piscicida and their roles in resistance to reactive oxygen species. Microbiol., 145: 483-494, 1999.

Berridge, B. R., Fuller, J. D., Azavedo, J., Low, D. E., Bercovier, H. and Frelier, P. F.: Development of specific nested oilgonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. J. Clin. Microbiol., 36: 2778-2781, 1998.

Bromage, E. S., Thomas, A. and Owens, L.: *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi, *Lates calcarifer*. Dis. Aquat. Org., 36: 177-181, 1999.

Charland, N., Nizet, V., Rubens, C. E., Kim, K. S., Lacouture, S. and Gottschalk, M.: *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. Infect. Immun., 68: 637-643, 2000.

Danon, D. L., Goldstein, L., Marikovsky, Y. and Skutelsky, E.: Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. J. Ultrastruct. Res., 38: 500-510, 1972.

Eldar, A and Ghittino, C.: *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis. Aquat. Org., 36: 227-231, 1999.

Eldar, A., Perl, S., Frelier, P. F. and Bercovier, H.: Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. Dis. Aquat. Org., 36: 121-127, 1999.

Johnson, J. A., Panigrahi, P. and Morris, J. G.: Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance and virulence in mice. Infect. Immun., 60: 864-869, 1992.

Kawahara, E. and Kusuda, R.: Direct fluorescent antibody technique for differentiation between α- and β-hemolytic *Sterptococcus* spp. Fish Pathol., 22: 77-82, 1987.

Kitao, T., Aoki, T. and Sakoh, R.: Epizootic caused by β-hemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. Fish Pathol., 15: 301-307, 1981.

Lopez-Doriga, M. V., Barnes, A. C., dos Santos, N. M. and Ellis, A. E.: Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. Microbiol., 146: 21-30, 2000.

MacFaddin, J. F.: Biochemical test for identification of medical bacteria, 3rd ed., Williams, L. and Wilkins, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2000.

Magarinos, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L. and Toranzo, A. E.: Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. FEMS Microbiol. Lett., 138: 29-34, 1996.

Miles, A. A. and Misra, S. S.: The estimate of the bacterial power of the blood. J. Hygiene, 38: 873-885, 1938.

Ohinishi, K. and Jo, Y.: 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, 1981.

Ooyama, T., Kera, A., Okada, T., Inglis, V. and Yoshida, T.: The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. Dis. Aquat. Org., 37: 121-126, 1999.

Pier, G. B. and Madin, S. H.: *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from and Amazon freshwater dolphin,

Inia geoffrensis. Int. J. Syst. Bacteriol.., 26: 545-553, 1976.

Ring, A., Weiser, J. N. and Tuomanen, E. I.: Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. J. Clin. Invest., 102: 347-360, 1998.

Rubens, C. E., Smith, S., Hulse, M., Chi, E. Y. and van Belle, G.: Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. Infect. Immun., 60: 5157-5163, 1992.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M.: Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with β-hemolytic streptococcal bacterin. Fish Pathol., 24: 169-173, 1989.

Scott, A. L. and Klesius, P. H.: Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. Dev. Biol. Stand., 49: 243-254, 1981.

Secombes, C. J.: Isolation of salmonids macrophages and analysis of their killing activity., Technique in Fish Immunology, vol. 1, pp. 137-154, eds., Stolen, S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Robertson, B. S. and van Muiswinkel, W. B., SOS Publications, Fair Haven, USA, 1990.

Tang, P., Foubister, V., Pucciarelli, G. M. and Finlay, B. B.: Methods to study bacterial invasion., J. Microbiol. Meth., 18: 227-240, 1993.

Ugajin, M.: 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, 1981.

Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I. and Yoshida, S. I.: *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, 1998.

Yoshida, T., Endo, M., Sakai, M. and Inglis, V.: A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Org., 29: 233-235, 1997a.

Yoshida, T., Inglis, V., Misawa, N., Kruger, R. and Sakai, M.: In vitro adhesion of *Pasteurella piscicida* to cultured fish cells. J. Fish Dis., 20: 77-80, 1997b.

Yoshida, T., Eshima, T., Wada, Y., Yamada, Y., Kakizaki, E., Sakai, M., Kitao, T. and Inglis, V.: Phenotypic variation associated with an anti-phagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. Dis. Aquat. Org., 25: 81-86, 1996a.

Yoshida, T., Yamada, Y. and Sakai, M.: Association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in β-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health, 8: 223-228, 1996b.

Zlotkin, A., Hershko, H. and Eldar, A.: Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Appl. Environ. Microbiol., 64: 4065-4067, 1998.

Manuscript Received : June 14, 2005
Revision Accepted : July 26, 2005
Responsible Editorial Member : Tae-Sung Jung
(Gyeongsang Univ.)