

β -용혈성 *Streptococcus iniae* 포르말린 사균 백신에 대한 넙치의 면역 반응

조미영[†] · 이주석* · 이덕찬 · 최희정 · 김진우
국립수산과학원 병리연구팀, *내수면양식연구소

Immune response of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* against β -hemolytic *Streptococcus iniae* formalin-killed cells

Mi Young Cho, Joo Seok Lee*, Deok Chan Lee, Hee Jung Choi and Jin Woo Kim

Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
*Inland Aquaculture Research Institute, NFRDI, 645-806, Korea

Streptococcal infections were considered as a serious problem because of significant economic losses in fish farm industry. We evaluated the efficacies of *Streptococcus iniae* vaccines in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The vaccines were prepared from 10% neutral buffered formalin to give a final concentration of 0.3% or 3%, respectively. Fish were immunized by intraperitoneal injection of the experimental vaccines once or twice. Neither of the vaccines gave rise to any significant side effects. The antibody titers of booster immunized groups were significantly higher than those of prime immunized groups with both of the vaccines. According to formalin dosage, significantly increased antibody titers were produced by 3% formalin-killed cells (FKC) at 4 weeks and 8 weeks after prime and booster vaccination, respectively. Although the different levels of antibody production were showed by the vaccinated fish, the good protection obtained in challenge trials of the both vaccines. Fish immunized with 0.3% FKC once or twice had the relative percent survival (RPS) of 66.7% and 87.5%, respectively. Similarly, fish immunized with 3% FKC once or twice had the RPS of 70.0% and 77.0%, respectively. Further experiments are needed to study not only correlation between the antibody titers and RPS against *S. iniae* but also the side effects of high dose of formalin on antigenicity.

Key words : *Streptococcus iniae*, flounder, *Paralichthys olivaceus*, formalin-killed cells, safety, immune response

양식 어류에 발생하는 연쇄구균증 (Streptococcosis)은 아시아, 미국, 남아프리카, 호주, 이스라엘 및 유럽 등 전세계적으로 많은 피해를 야기시키는 질병으로서 원인균으로는 *Streptococcus iniae*, *S. difficle*, *Lactococcus garvieae*, *L. piscium* 및 *Vagococcus salmoninarum* 등 분류학적으로 다양한 균주들이 관여하는 것으로 알려져 있다 (Bercovier *et al.*, 1997). 이 중 *S. iniae*는 Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*에서

최초로 보고된 이후 (Pier and Madin, 1976), 니일틸라피야, *Oreochromis nilotica*, 은어, *Plecoglossus altivelis*, 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*, 뱀장어, *Anguilla japonica* 등의 담수 어류 뿐만 아니라 넙치, *Paralichthys olivaceus*, 방어, *Seriola quinqueradiata*, 터봇, *Scophthalmus maximus*, 홍민어, *Sciaenops ocellatus*, gilthead sea bream, *Sparus aurata*, European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, barramundi, *Lates calcarifer* 등 다양한 해

[†]Corresponding Author : Mi Young Cho, Tel : 051-720-2483,
Fax : 051-720-2498, E-mail : mycho@nfrda.re.kr

산 양식 어류에서 보고되고 있다 (Kitao *et al.*, 1981; Ohinish and Jo, 1981; Ugajin, 1981; Kawahara and Kusuda, 1987; Sakai *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1996; Zlotkin *et al.*, 1998; Bromage *et al.*, 1999; Eldar and Ghittino, 1999; Eldar *et al.*, 1999a; Eldar *et al.*, 1999b; Delamare-Deboutteville *et al.*, 2005).

*S. iniae*에 감염된 넙치는 체색이 검어지고 안구가 백탁 및 돌출되고, 눈 가장자리 및 지느러미가 붉어진다. 해부해보면 간장의 충혈, 비대 또는 축소, 장관의 염증 및 출혈, 뇌출혈 및 아가미 뚜껑 내부에 농창이 형성되는 것으로 알려져 있다 (전, 2005). 또한, 감염된 어류는 감염 초기에 식욕 감퇴로 인해 사료 섭취량이 급격히 감소하기 때문에 약제감수성시험에서는 여러 약제가 효과적인 것으로 나타나고 있으나 실제로 양식장에서 사용할 경우 효과적이지 못한 경우가 많다 (Bercovier *et al.*, 1997). 따라서 기존의 약물에 의한 치료 위주의 방역 대책에서 예방 백신을 이용하여 근본적이면서 새로운 개념의 어류 질병 예방 기술의 현장 도입이 강하게 요구되고 있다.

연쇄구균증에 대한 예방 백신으로는 무지개송어를 대상으로 *S. iniae* 및 *L. garvieae*의 formalin-inactivated whole cells vaccine의 효능을 조사한 바 있으며 (Ghittino *et al.*, 1995), 틸라피아에서 발생하는 *S. difficile*에 대한 whole cells vaccine 및 bacterial protein extract의 면역 효과에 대한 보고 (Eldar *et al.*, 1995) 및 *S. iniae*의 formalin-killed cells 및 concentrated extracellular products (ECPs)의 single and combined vaccine에 대한 틸라피아의 면역반응에 대해 보고된 것이 있다 (Klesius *et al.*, 2000). 이 외에 *S. agalactiae*의 formalin-killed cells 및 ECPs를 틸라피아에 복강 주사 및 침지 면역 시킨 후 이들 백신의 효능에 대해 보고된 바 있다 (Evans *et al.*, 2004). 또한 최근에는 whole cells vaccine 및 ECPs 이외에도 live attenuated vaccine의 가능성에 대한 연

구가 시도되고 있다 (Buchanan *et al.*, 2005).

국내에서도 넙치의 연쇄구균증에 대한 예방 백신을 개발하기 위해 많은 연구가 진행되고 있으나 실용화되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 넙치 연쇄구균증에 대한 예방 백신을 개발하기 위해 양식 넙치에서 분리한 병원성 *S. iniae* 균에 대한 포르말린 불활화 백신을 제작하여 넙치에 면역시킨 후 백신의 안전성 및 면역 효능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시험어

시험어로는 *S. iniae* 균에 대한 항체가 나타내지 않은 건강한 넙치 (22.0 ~ 51.0 g)를 선정하여 실험에 사용하였다. 시험용 수조는 300 L FRP 수조를 사용하였으며, 실험 종료시까지 유수식으로 관리하였다. 수온은 시판용 가온 히터를 사용하여 20 ± 1°C로 유지하고, 넙치용 EP 사료를 1일 2회 급이하였다.

2. 백신 균주의 최소치사농도 (Minimum lethal dose, MLD) 측정

백신 제작에는 1999년 제주도의 넙치 양식장에서 분리된 *S. iniae* JSL0208 균주를 사용하였다. 먼저 동결 보존하고 있던 균주의 병원성 회복을 위하여 혈액 한천배지 (이산제약)에 배양하여 β-용혈성을 확인한 후 3회 어체 통과하였으며, 순수 분리된 세균 집락은 NaCl이 1.5% 함유된 BHI broth (Difco, USA)에 접종하여 shaking incubator (Vision, Korea)에서 150 rpm, 30°C, 48 hr 동안 배양하였다. 백신 균주의 MLD 측정을 위해 배양액을 4°C에서 8,000 rpm, 10분간 원심 분리하여 집균하고 0.85% (w/v) 멸균생리식염수를 이용하여 균액을 10⁹ CFU/ml 농도로 조정한 후 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 및 10⁻⁵까지 10배씩 단계 희석하여 희석된 균액을 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 인위감염 후 7일간 누적폐사율을 조사하여

MLD를 계산하였으며, 폐사 개체에서 분리된 균은 혈액 한천 배지에 접종하여 용혈성을 확인하였다.

3. 시험 백신의 제조 및 접종

시험 백신은 10% 증성포르말린 (Merck, Germany)을 *S. iniae* 배양액의 0.3% 및 3%가 되도록 첨가하여 shaking incubator에서 24시간동안 불활화하였다. 배양균의 불활화를 BHIA agar (Difco, USA)에서 최종 확인한 후 12,000 rpm으로 원심분리하여 멸균생리식염수로 3회 세척한 후 균체를 수거하고 최종적으로 습균체 무게를 측정하여 10 mg/ml 농도로 현탁하였다. 백신액은 멸균된 유리병에 분주하여 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 백신 접종은 시험 백신을 어체당 0.1 ml씩 복강 주사하여 최종 농도가 1 mg/fish가 되도록 하였으며, 2회 접종구는 백신투여 후 2주째에 동량의 백신을 반복 투여하였다. 대조구는 멸균생리식염수를 동량씩 복강 주사하였다.

4. 시험 백신의 넙치에 대한 안전성 시험

넙치에 대한 시험 백신의 안전성을 조사하기 위해 시험 백신을 2 mg/fish 농도로 복강에 주사하고 3주간 주사 부위에서 화농 및 괴사 등의 부작용 여부를 관찰하고 폐사율을 조사하였다. 대조구는 멸균생리식염수를 동량 주사하였다. 시험 종료 후 생존 개체의 간, 비장 및 신장을 Bouin 액에 고정하고 통상적인 조직 처리 과정을 거친 후 H&E 염색을 실시하여 광학현미경 (ZEISS, Germany) 하에서 관찰하였다.

5. 시험 백신의 면역원성 시험

가. 응집항체가 조사

백신 접종 후 2, 4, 8 및 12주째 시험어의 미부 정맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였으며, 응집항체가는 microtiter법으로 조사하였다. 즉, 96 well microplate well (Corning, USA)에서 넙치로

부터 분리한 혈청을 멸균생리식염수로 단계 희석한 후 시험 백신을 항원으로 사용하여 동량씩 반응시킨 후 24시간 후 응집과 형성 유무를 관찰하였다. Booster 처리구의 경우에는 추가 접종 전, booster 처리 후 4, 8 및 12주째 채혈하여 응집항체가를 조사하였다.

나. 공격 시험

시험 백신이 방어력에 미치는 효과를 조사하기 위하여 백신 접종 후 3주째 1MLD의 *S. iniae* 균을 0.1 ml씩 인위감염하고 2주 동안 누적폐사율을 조사하여 대조구의 폐사율이 60% 이상일 때 백신 접종구의 상대생존율을 산출하였다. 상대생존율은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{상대생존율 (\%)} = [1 - (\text{시험구의 누적폐사율} / \text{대조구의 누적폐사율})] \times 100$$

6. 통계 처리

대조구와 각 실험구 사이의 유의성은 Student's t-test를 실시하였으며, P < 0.05의 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 시험 균주의 MLD

S. iniae 배양액을 10배씩 단계 희석하여 0.1 ml씩 넙치의 복강에 주사한 후 7일간 누적폐사율을 조사한 결과, 시험 균주의 MLD는 1×10^8 CFU/ml로 나타났다 (Table 1). 또한, 연쇄구균증의 전형적인 외부 증상인 안구 돌출 및 장출혈 등이 관찰되었으며 (Fig. 1) 폐사 개체에서 분리한 균을 혈액 한천배지에서 배양한 결과 β-용혈성을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

2. 시험 백신의 안전성

0.3% 및 3% 포르말린을 처리하여 사균화한 시험 백신을 넙치의 복강에 주사한 후 3주 동안 누적폐사율을 조사한 결과, 대조구에서는 폐사

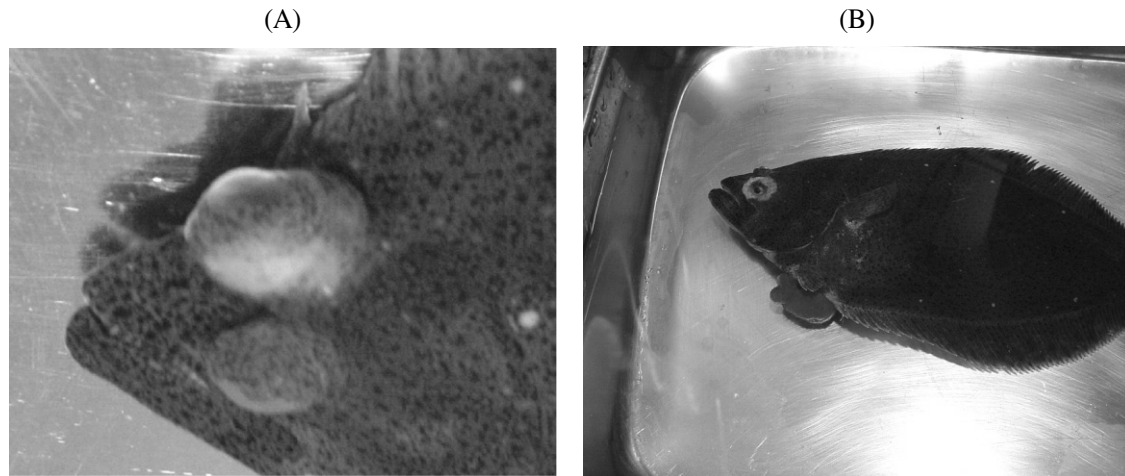


Fig. 1. Clinical signs of olive flounder artificially infected with the virulent *Streptococcus iniae* JSL0208. A, exophthalmia with opaque eye; B, hernia of intestine.

Table 1. Minimum lethal dose (MLD) of *Streptococcus iniae* JSL0208

Concentration of inoculum (CFU/ml, n=10)	Cumulative death per day after challenge							Mortality* (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
1×10^8	0	2	1	5	2	-	-	100
1×10^7	0	1	2	3	1	0	1	80
1×10^6	0	1	2	1	0	1	0	50
1×10^5	0	0	0	0	1	0	0	10
1×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0

* Mortality (%) = Cumulative death for a week/10 \times 100.

Table 2. Safety of formalin-killed *Streptococcus iniae* vaccines

Vaccines	Fish weight (g)	No. of fish tested	Route	Mean cumulative mortality (%)
0.3% formalin-killed cells	24.0~38.0	20	IP*	5
3% formalin-killed cells	30.0~48.0	20	IP	5
Control**	22.0~38.0	20	IP	0

* Fish were intraperitoneally injected with 2 mg bacterin / fish.

** Non-vaccinates received a physiological saline.

가 발생하지 않았으나, 백신 접종구에서는 두 백신 모두 각각 1마리씩 폐사하여 5%의 누적폐사율을 나타내었다 (Table 2). 시험 백신을 넙치의 복강에 주사한 후 폐사 개체 및 실험 종료 후 생존 개체의 병리조직학적 검사를 실시한 결과, 대조구 및 백신 접종구 모두에서 특기할 만한 조직학적 변화는 관찰되지 않았다. 포르말린 농도와 상관없이 백신 접종 개체의 비장 및 신장 조직에서 다소의 혈구 침윤 및 melano-

macrophage center (MMC)가 관찰되었으나, 대조구와 유사한 수준으로 판단되었으며 백신 접종에 따른 염증 소견은 관찰되지 않았다.

3. 포르말린 처리 농도별 백신에 대한 넙치의 면역 효능

가. 응집항체가

시험 백신을 1회 및 2회 접종한 후 시간 경과별 응집항체가의 변화를 조사한 결과, 0.3% 포르말린 처리 백신의 경우 1회 접종구에서 4주째 2^3 , 8주째 $2^{3.25}$ 으로 나타났으며, 2회 접종구의 경우에는 4주째 $2^{4.5}$ 으로 최고 항체가를 나타내어 1회 접종구에 비해 유의적인 증가를 나타내었으며 8주째까지 $2^{4.25}$ 으로 높은 항체가를 나타낸 후 12주째 $2^{3.25}$ 으로 감소하였다 (Fig. 3).

3% 포르말린 처리 백신의 경우, 1회 접종구에서 2주째 $2^{2.14}$, 4주째 $2^{2.37}$, 8주째 $2^{3.18}$ 으로 나타났으며, 2회 접종구의 경우에는 4주째부터 12주째까지 1회 접종구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 즉, 4주 및 8주째 각각 $2^{5.5}$, $2^{6.18}$ 으로 가장 높은 항체가를 나타낸 후 12주째까지 2^4 의 다소 높

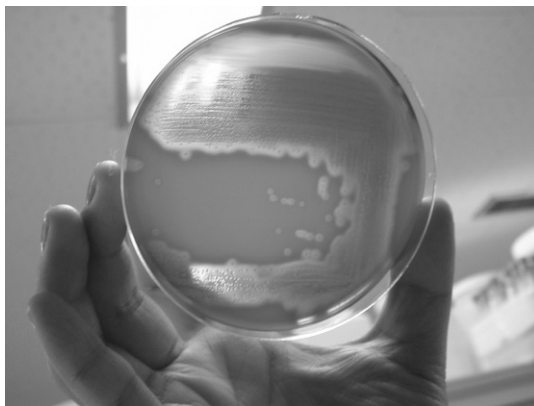


Fig. 2. β -hemolysis of *Streptococcus iniae* cultured on sheep blood agar.

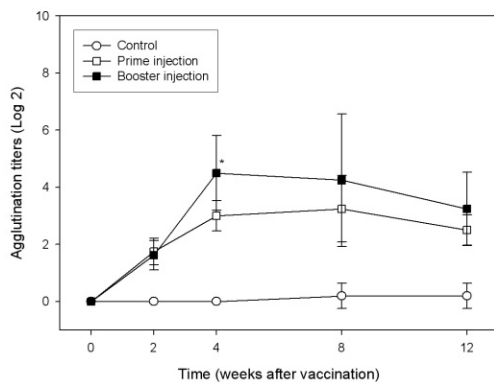


Fig. 3. Change in agglutination titers against *Streptococcus iniae* of serum collected from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected with 0.3% formalin-killed *S. iniae* vaccine. Fish were boosted with same vaccine after 2 weeks of the first injection. Control fish received a physiological saline. Values are means \pm SD. * Significantly higher than prime injection group ($P < 0.05$).

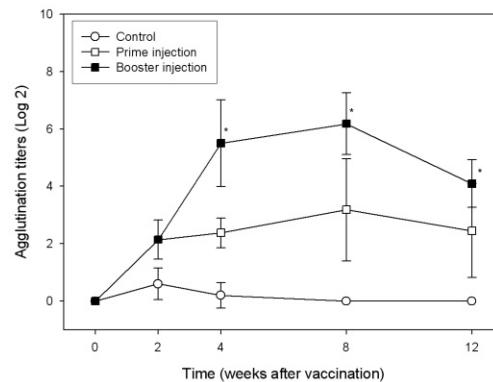


Fig. 4. Change in agglutination titers against *Streptococcus iniae* of serum collected from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected with 3% formalin-killed *S. iniae* vaccine. Fish were boosted with same vaccine after 2 weeks of the first injection. Control fish received a physiological saline. Values are means \pm SD. * Significantly higher than prime injection group ($P < 0.05$).

Table 3. Cumulative mortality and relative percent survival (RPS) of 0.3% formalin-killed *Streptococcus iniae* vaccinated olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after challenge with *S. iniae*

Treatment group	Fish weight (g)	Route	No. of fish challenged	Cumulative mortality (%)	RPS*
Prime injection (n=50)	22~38	IP	20	20	66.7
Booster injection (n=50)	24~38	IP	20	7.5	87.5
Control** (n=100)	24~36	IP	20	60	-

* RPS=[1-(cumulative mortality of vaccinated group/cumulative mortality of control group)] × 100.

** Non-vaccinates received a physiological saline.

Table 4. Cumulative mortality and relative percent survival (RPS) of 3% formalin-killed *Streptococcus iniae* vaccinated olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after challenge with *S. iniae*

Treatment group	Fish weight (g)	Route	No. of fish challenged	Cumulative mortality (%)	RPS*
Prime injection (n=50)	30~51	IP	20	20	70.0
Booster injection (n=50)	30~47	IP	20	15	77.0
Control** (n=60)	30~48	IP	20	65	-

* RPS=[1-(cumulative mortality of vaccinated group/cumulative mortality of control group)] × 100.

** Non-vaccinates received a physiological saline.

은 항체가를 유지하는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

나. 방어 효능

각 시험 백신을 1회 및 2회 접종한 후 3주째 *S. iniae* 균주로 인위감염하여 누적폐사율 및 상대생존율을 조사한 결과, 0.3% 포르말린 처리 백신의 경우 1회 접종구에서 20%의 누적폐사율을 나타내었으며 2회 접종구에서는 7.5%의 낮은 누적폐사율을 나타내었다 (Table 3).

3% 포르말린 처리 백신의 경우 1회 접종구에서 20%의 누적폐사율을 나타내었으며 2회 접종구에서는 15%의 누적폐사율을 나타내어 각각

70.0% 및 77.0%의 높은 상대생존율을 나타내었다 (Table 4).

고 찰

현재 국내·외 양식 여건은 양적 생산성 경쟁에서 질적인 면을 기본으로 한 질병 없는 건강한 어류를 안정적으로 생산하기 위한 기술 변혁의 시점에 와 있다. 따라서 기존의 약물에 의한 치료 위주의 대책에서 백신을 이용한 근본적이며 새로운 개념의 방역 기술의 현장 도입이 강하게 기대되고 있다. 국내에서 넘치를 대상으로 개발되어 상품으로 시판되고 있는 백신으로는

에드워드 백신이 있으며, 최근에는 연쇄구균증에 대한 예방 백신을 개발하기 위해 많은 연구가 진행되고 있으나 실용화되지 못하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 넙치의 연쇄구균증의 주요 병원체중 하나인 β -용혈성 *S. iniae*에 대한 예방 백신을 개발하기 위하여 포르말린 농도를 0.3% 및 3%로 달리하여 사균 백신을 제작한 후 넙치를 대상으로 안전성 응집항체가 및 방어력을 조사하였다.

넙치에 대한 시험 백신의 안전성을 조사하기 위하여 권장 사용량의 2배 농도 (2 mg/fish)로 접종한 결과 두 종류의 백신 모두 주사 후 3주째까지 5%의 낮은 폐사율을 나타내었으며 백신 접종에 의한 염증 증상 등의 이상 소견이 관찰되지 않아 백신으로서의 안전성을 확인할 수 있었다.

또한, 시험 백신의 면역원성을 확인하기 위해 응집항체를 조사한 결과, 대조구를 제외한 백신 접종구에서는 1회 접종구에 비해 2회 접종구에서 항체가가 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 특히 0.3% 포르말린 처리 백신에서 4주째에만 유의적인 증가가 나타난 반면 3% 포르말린 처리 백신의 경우에는 4주부터 12주째까지 항체가가 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 결론적으로 0.3% 포르말린 처리 백신에 비해 3% 포르말린 처리 백신이 반복 투여할 경우 항체가의 최고값이 증가하였으며 2회 접종시 높은 항체가를 유지하는 기간도 상대적으로 긴 것을 알 수 있었다. 그러나 포르말린 처리 농도별 항체가에서 나타난 차이는 1회 접종구에서는 4주째에, 2회 접종구에서는 8주째에서만 유의성이 있는 것으로 나타났다.

또한, 두 종류의 시험 백신에 대한 방어력을 비교한 결과 응집항체가에서 나타난 차이에도 불구하고 포르말린 농도에 따른 방어력의 차이는 확인할 수 없었으나, 응집항체가에서 나타난 결과와 마찬가지로 1회 백신 접종구에 비해 2회 백신 접종구의 상대생존율이 증가한 것으로 나

타났다.

Horne and Ellis (1988)는 시판되는 사균 백신의 경우 일반적으로 0.5% 이상의 포르말린을 처리하는데 이러한 포르말린의 첨가는 항원을 변성시킬 수 있으며, 백신 제작시 독소를 불화성화시키기 위해 때때로 고농도 (예; 3%)를 사용하기도 하는데 이 경우 항원성을 변화시킬 수도 있다고 하였다. 우리 나라에서 보고되고 있는 어류 병원체에 대한 사균 백신의 경우 어종 및 균체에 따라 일반적으로 0.3 ~ 0.5%의 농도로 사균화하여 제작되고 있다. *Vibrio anguillarum*의 경우 (조 등, 2001) 0.3% 포르말린으로 사균화하여 제작하였으며, 틸라피아에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 경우 0.4% 포르말린으로 사균화하였으며 (오와 전, 1988), 뱀장어에서 분리한 *E. tarda*의 경우 0.5% 포르말린으로 사균화하여 제작하였다 (박 등, 1993). 해산어의 경우 권과 방 (2004)이 넙치에서 분리한 *E. tarda*의 백신 제작을 위해 0.5% 포르말린을 처리하여 사균화하였다. 현재까지 국내에서 넙치에 감염하는 연쇄구균의 예방 백신에 대해 보고된 바가 없으나, 외국의 경우 틸라피아에서 분리한 *S. difficile* (Eldar et al., 1995), *S. agalactiae* (Evans et al., 2004) 및 *S. iniae* (Klesius et al., 2000; Klesius et al., 2006)의 whole cells vaccine을 제작하기 위해 3%의 포르말린을 처리하였으며, 백신 접종 결과 이들 백신의 효능이 입증되었다.

본 연구에서도 사균화를 위한 포르말린 농도를 0.3% 및 3%로 달리하여 백신을 제작하여 넙치에 접종한 결과, 0.3% 포르말린 처리 백신을 접종한 시험구에 비해 3% 포르말린 처리 백신을 접종한 시험구에서 1회 접종시 항체가가 다소 감소한 것으로 나타났으나 반복 투여한 경우 응집항체가가 유의적으로 증가한 것을 알 수 있었다. 또한 3% 포르말린 처리 백신을 접종한 후 넙치의 각 장기를 적출하여 병리조직학적으로 조사한 결과 백신 접종으로 인한 염증 소견이 관찰되지 않아 백신으로서의 안전성을 확인할 수 있었다. 결론적으로 본 연구에서 사용한

0.3% 및 3% formalin-killed *S. iniae* whole cells vaccine은 안전성 및 면역 효능에서 매우 효과적인 백신으로 확인되었으나 1회 접종구에서 나타난 항체가의 감소와 관련하여 3% 이상 고농도의 포르말린 처리가 백신의 항원성과 세포성 면역에 미치는 영향에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단된다.

본 실험에서 사용한 주사법은 많은 노동력을 필요로 하지만 높은 항체가 유도과 백신의 사용량을 줄일 수 있어 효과적인 방법으로 인식되고 있다. 그러나 넙치의 크기가 작을 경우 백신 접종시 내부 장기가 손상될 위험이 있어 가능하면 최소 30 g 이상의 다소 큰 개체에 적용하는 것이 좋으며, 백신 처리로 인한 스트레스로 넙치의 저항력을 약화시키는 단점이 있다 (Barton and Iwama, 1991). 따라서 종묘 생산장에서 생산된 넙치 치어를 입식하여 성어기까지 양성하는 우리나라 넙치 양식 시스템에서는 입식과 함께 치어기에 대량으로 백신을 처리할 수 있는 방법인 침지법의 개발이 요구되고 있으나 침지법의 경우 처리 농도 및 시간 등 백신을 처리하는 조건에 따라 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Nakanishi and Ototake, 1997). 따라서 양식 시스템과 병원체의 발병 기전에 맞는 효과적인 백신 처리법에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한, 효과적인 백신 및 접종 방법 개발과 더불어 인력 동원 및 스트레스를 최소화할 수 있는 자동 백신 투여 시스템이 개발된다면 질병 치료에 소요되는 제반 경비의 절감 및 생산성 향상으로 어업인의 소득 증대에 크게 기여할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 넙치에 대한 β -용혈성 *Streptococcus iniae* 백신의 효능을 조사하였다. 시험 백신은 10% 중성포르말린을 이용하여 최종 농도가 0.3% 및 3%가 되도록 첨가하여 제작하였으며 건강한 넙치의 복강에 1회 또는 2회 주사하

였다. 그 결과, 두 종류의 백신 모두 어떠한 심각한 부작용도 야기하지 않았다. 또한 1회 접종구에 비해 2회 접종구에서 응집항체가가 유의적으로 증가하였으며, 포르말린 농도별로 비교한 결과 저농도인 0.3%에 비해 고농도인 3% 포르말린 처리 백신을 접종한 경우 1회 접종구에서는 4주째에, 2회 접종구에서는 8주째 응집항체가가 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 항체 생성에서 나타난 차이에도 불구하고 두 종류의 백신 모두 공격 실험 결과 방어력이 인정되었다. 즉, 0.3% 포르말린 처리 백신의 1회 접종 및 2회 접종구의 경우 각각 67% 및 87.5%의 상대생존율을 나타내었으며, 3% 포르말린 처리 백신의 1회 접종 및 2회 접종구에서는 각각 70% 및 77%의 상대생존율을 나타내었다. 따라서 추후 응집항체가와 방어력 사이의 상관성뿐만 아니라 고농도의 포르말린 처리가 항원성의 변형에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 (넙치 연쇄구균증 불활화 백신의 산업화 연구, RP-2006-AQ-006)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

- Barton, B. B. and Iwama, G. K.: Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish dis.*, 1: 3-26, 1991.
- Bercovier, H., Ghittino, C. and Eldar, A.: Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Dev. Biol. Stand.*, 90: 153-160, 1997.
- Bromage, E. S., Thomas, A. and Owens, L.: *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi, *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.*,

- 36: 177-181, 1999.
- Buchanan, J. T., Stannard, J. A., Lauth, X., Ostland, V. E., Powell, H. C., Westerman, M. E. and Nizet, V.: *Streptococcus iniae* phospho- glucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infect. Immun.*, 73(10): 6935-6944, 2005.
- Delamare-Deboutteville, J., Wood, D. and Barnes, A. C.: Response and function of cutaneous mucosal and serum antibodies in barramundi (*Lates calcarifer*) acclimated in seawater and freshwater. *Fish Shellfish Immunol.*, 21(1): 92-101, 2006.
- 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., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H.: Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1005-1008, 1999a.
- 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, 1999b.
- Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. and Bercovier, H.: Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protect tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. *Vaccine*, 13: 867-870, 1995.
- Evans, J. J., Klesius, P. H. and Shoemaker, C. A.: Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine*, 22: 3769-3773, 2004.
- Ghittino, C., Eldar, A., Prearo, M., Bozzetta, E., Livvof, A. and Bercovier, H.: Comparative pathology and experimental vaccination in diseased rainbow trout infected by *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*. In *Diseases of fish and shellfish*. Eur. Ass. Fish Pathol., VII Int Conf, Palma de Mallorca, p. 27, 1995.
- Horne, M. T. and Ellis, A. E.: Commercial production and licensing of vaccines for fish. In *Fish vaccination* (ed. Ellis, A. E.), p. 52, Academic press, 1988.
- Kawahara, E. and Kusuda, R.: Direct fluorescent antibody technique for differentiation between α and β -hemolytic *Streptococcus* 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.
- Klesius, P. H., Evans, J. J., Shoemaker, C. A. and Pasnik, D. J.: A vaccination and challenge model using calcein marked fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 20-28, 2006.
- Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Evans, J. J.: Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolated vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188: 237-246, 2000.
- Moreno, M., Cillins, D. and Dominguez, L.: *Streptococcus* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, 19: 33-38, 1996.
- Nakanishi, T. and Ototake, M.: Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In *Fish vaccinology*, (ed. Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P. J. and Brown, F.), pp. 59-68, Karger press, 1997.
- 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.
- 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.
- Sakai, M., Atsuta, S. H. and Kobayashi, M.: Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with β -hemolytic streptococcal bacterin. *Fish Pathol.*, 24: 169-173, 1989.
- 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.
- 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.
- 권문경, 방종득 : 다양한 농도의 에드워드드 백신 액에 대한 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 침지 투여 효과. *한국어병학회지*, 17(3): 171-177, 2004.
- 박수일, 최윤정, 이주석 : 어류 병원성 세균 *Edwardsiella tarda*에 대한 뱀장어의 면역 반응. *한국어병학회지*, 6(1): 11-20, 1993.
- 오명주, 전세규 : 틸라피아에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 특성과 항원성에 대하여. *한국어병학회지*, 1(2): 77-85, 1988.
- 전세규 : 넙치의 질병과 치료 p108-110, *한국수산신문사*, 2005.
- 조동윤, 김용기, 장용기, 허원, 권창희 : 어류 비브리오균 백신의 면역원성 및 안전성. *한국실험동물학회지*, 17(4): 291-296, 2001.

Manuscript Received : January 12, 2006

Revision Accepted : March 13, 2006

Responsible Editorial Member : Joon-Ki Chung
(Pukyong Univ.)